

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**UNIDAD DE BIOMEDICINA**

***Modulación en la expresión de VEGF  
mediada por la exposición a nanopartículas  
de dióxido de titanio***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A**

***ERICK MAURICIO FLORES JIMÉNEZ***

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ**

**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2014**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Agradezco la realización de esta tesis al Programa de Apoyo a  
Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de  
la Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA) con el  
número de proyecto IB201112, llevada a cabo en el laboratorio 10  
de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios  
Superiores Iztacala.**

## ***Agradecimientos***

A la UNAM por permitirme estar en tus aulas donde aprendí lecciones que no olvidare, conocí a personas que nunca abandonare y darme la oportunidad de ser alguien mejor para el mundo. Mi amada universidad eres mi segunda casa y siempre me has dado lo mejor de ti, te llevé por siempre en mi corazón.

A la Dra Yolanda, mi tutora, por compartir todo su conocimiento conmigo pero en especial por toda la paciencia que me ha brindado ante mis miedos, inseguridades y dudas para dar este último pasó, sin su interés en mi nunca lo hubiera logrado, nunca le olvidare.

A la Dra. Norma, que desde que entre al laboratorio su cariño siempre ha sido incondicional, le quiero mucho y aprecio su cariño, consejos, bromas, risas, enojos y sobretodo su alegría. Sin usted el laboratorio se sentiría vacío.

A mis compañeros de laboratorio, por siempre tener una crítica constructiva e ideas para mejorar mi trabajo, pasar el tiempo con ustedes fue muy divertido los estimo mucho y es mi más grande deseo que todos sueños y metas se cumplan.

A Laura, eres mi mejor amiga, la persona que siempre me ha ayudado en los momentos más difíciles de mi vida, has sido mi apoyo cuando más lo he necesitado, siempre has encontrado la forma de hacerme fuerte y resistir. Laura eres de lo mejor que me pudo pasar y no existen palabras para decirte lo mucho que te quiero y me alegro que en el último paso de esta etapa hayas estado ahí para darme contigo, no imagino la vida sin tu amistad.

A mis amigos, Tomas y Karen hemos compartido tantas cosas que es imposible no decirles cuanto los quiero, fue una bendición haber coincidido en esta etapa de nuestras vidas simplemente no pude haber pedido mejor compañía que ustedes. Siempre me han inspirado a ser mejor y quiero que sigamos juntos ante los nuevos retos que nos aguardan. A Izumy, Mario, Michael y a Oscar, la hemos pasado muy bien juntos y aunque no estuvimos en un salón de clases por un tiempo siempre han estado ahí para escucharme y aconsejarme. Me agrada saber que nuestra amistad sigue tan firme como al principio, cuentan con mi apoyo y mi cariño en cualquier momento.

A Celina conocerte y enseñarme tanto, por brindarme tu confianza, compartir lo mejor de ti conmigo y ser un apoyo incondicional te estaré eternamente agradecido. Llegaste en un momento en que no te esperaba pero si en el que más te necesitaba, eres muy importante en mi vida y siempre tendrás un lugar especial en ella.

Finalmente a todas las personas, compañeros y amigos que han estado y han compartido aunque sea un poco de su vida conmigo de corazón les doy las gracias.

*No luches para vivir, vive para luchar.*

## *Dedicatoria*

Mamá no se que hubiera sido de mi si tu no hubieras estado conmigo todo este tiempo. En este momento si alguien debe estar orgulloso debo ser yo pero no por este logro sino por tener a la mejor mamá del mundo conmigo, eres el mejor ejemplo que nadie me podía haber dado y eres tan fuerte que ante mis ojos nadie se compara contigo. Te dedico este logro que lleva tanto de ti. Te adoro mamá y no hay día en que no lo pueda hacer.

Papá ojala supieras la falta que le has hecho a mi vida en todos estos años, he necesitado tanto de tu presencia, te extraño. Te dedico este logro en el cielo porque a pesar de todo el recordar tus consejos me han llenado de fuerza para seguir, aunque fue poco el tiempo también me educaste bien, Te quiero.

A mis hermanos, Amaury y Gabriela este logro es mas suyo que mío porque ustedes me han dado fuerzas para no flaquear en los momentos más duros y sin saberlo me han animado con sus sonrisas y peleas. Agradezco tener a unos hermanos tan geniales como ustedes y desearía regresar el tiempo para nunca verlos crecer hermanitos. En verdad los quiero y los adoro, sin su luz mi vida estaría vacía.

A mi familia, cada uno de ustedes ha creído en mí desde siempre, sin su apoyo nunca lo hubiera logrado. Agradezco a mi mamá, tío Gabriel, tío Fermín y tía Laura, entre todos, ustedes han dado la cara por mi mamá y mis hermanos por eso les dedico en especialmente esta tesis que lleva mucho de ustedes. Tienen mi gratitud y mi cariño. ¡GRACIAS!.

## CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b>	
La nanotecnología .....	2
Nanomateriales y las nanopartículas.....	3
Nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO <sub>2</sub> ) .....	5
Exposición a las NPs-TiO <sub>2</sub> .....	6
Efectos tóxicos de las NPs-TiO <sub>2</sub> .....	7
Efectos adversos en el pulmón por la exposición NPs-TiO <sub>2</sub> .....	8
Proceso inflamatorio por exposición a NPs-TiO <sub>2</sub> .....	9
El óxido nítrico (NO <sup>*</sup> ) .....	10
El factor inducible de hipoxia (HIF 1- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) .....	12
<b>Justificación</b> .....	13
<b>Hipótesis</b> .....	14
<b>Objetivos</b> .....	14
<b>Materiales y métodos</b>	
Materiales .....	15
Caracterización de las NPs-TiO <sub>2</sub> .....	15
Cultivo celular de neumocitos tipo II .....	16
Tratamientos con NPs-TiO <sub>2</sub> .....	17
Tinción de hematoxilina y eosina.....	17
Captación de NPs-TiO <sub>2</sub> por citometría de flujo .....	18
Producción de IL-6 en ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	19
Producción de NO <sup>*</sup> por reacción de Griess.....	20
Marcaje intracelular de HIF 1- $\alpha$ -VEGF por citometría de flujo.....	22
Panorama general de experimentación .....	23
<b>Resultados</b>	
Caracterización de las NPs-TiO <sub>2</sub> .....	24
Morfología de neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO <sub>2</sub> .....	25
Captación de NPs-TiO <sub>2</sub> .....	26
Determinación en la producción de NO <sup>*</sup> .....	27
Determinación en la producción de IL-6 .....	28
Expresión de HIF 1- $\alpha$ por citometría de flujo.....	29
Expresión de VEGF por citometría de flujo.....	32
<b>Discusión</b>	
Caracterización de NPs-TiO <sub>2</sub> .....	35
Captación de NPs-TiO <sub>2</sub> .....	36
Producción de NO <sup>*</sup> .....	37
Producción de IL-6 .....	38
Expresión de HIF 1 $\alpha$ -VEGF .....	39
<b>Conclusiones</b> .....	42
<b>Bibliografía</b> .....	43

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación general de los tipos de nanomateriales.....	3
<b>Figura 1.</b> Comparación del tamaño de NPs con estructuras celulares .....	4
<b>Figura 2.</b> Las tres formas cristalinas naturales del TiO <sub>2</sub> .....	5
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de las NPs-TiO <sub>2</sub> en el ambiente .....	7
<b>Figura 4.</b> Enfermedades asociadas a la exposición de NPs y su distribución en el cuerpo .....	10
<b>Figura 5.</b> Síntesis del óxido nítrico.....	11
<b>Figura 6.</b> Cuadrante de la cámara de Neubauer .....	16
<b>Figura 7.</b> Gráfica de “dot plot” .....	18
<b>Figura 8.</b> Curva patrón de IL-6.....	20
<b>Figura 9.</b> Reacción de Griess .....	20
<b>Figura 10.</b> Curva patrón de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	21
<b>Figura 11.</b> Micrografía electrónica de transmisión de NPs-TiO <sub>2</sub> .....	24
<b>Figura 12.</b> Fotografía de neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO <sub>2</sub> .....	25
<b>Figura 13.</b> Captación de NPs-TiO <sub>2</sub> en neumocitos tipo II .....	26
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de neumocitos tipo II que mostraron un aumento en su granularidad .....	27
<b>Figura 15.</b> Producción de NO <sup>*</sup> .....	28
<b>Figura 16.</b> Producción de IL-6 .....	29
<b>Figura 17.</b> Expresión de HIF1-α en neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO <sub>2</sub> .....	30
<b>Figura 18.</b> Expresión de HIF1-α en porcentaje celular de neumocitos tipo II .....	31
<b>Figura 19.</b> Expresión de HIF1-α en intensidad de fluorescencia en neumocitos ..	31
<b>Figura 20</b> Expresión de VEGF en neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO <sub>2</sub> .....	33
<b>Figura 21.</b> Expresión de VEGF en porcentaje de celular de neumocitos tipo II....	34
<b>Figura 22.</b> Expresión de VEGF en intensidad de fluorescencia en neumocitos ..	34



## LISTA DE ABREVIACIONES

**A549.** Neumocitos tipo II, células alveolares.

**Ang.** Angiotensina II.

**ATCC.** La Colección de Cultivo Tipo Americano.

**CAT.** Catalasa.

**C60.** Fullerenos.

**CO<sub>2</sub>.** Dióxido de carbono.

**eNOS.** Óxido nítrico sintasa endotelial.

**ELISA.** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

**F12K.** Medio de cultivo modificado por Kaigh.

**FBS.** Suero fetal bovino.

**FSC.** Tamaño celular.

**GSH.** Glutati6n.

**H.** Horas

**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.** cido fosf6rico.

**HIF.** Factor inducible de hipoxia.

**HO-1.** Hemoxigenasa 1.

**IARC.** Agencia Internacional de Investigaci6n del Cáncer.

**IL.** Interleucina.

**INF.** Interfer6n.

**iNOS.** Oxido nítrico sintasa inducible.

**NFκβ.** Factor necr6tico kappa beta.

**Nrf2.** Factor nuclear derivado de eritroide 2.

**nNOS.** Oxido nítrico sintasa neural.

**NO.** xido nítrico.

**NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>.** Nitritos y nitratos.

**NOS.** Oxido nítrico sintasa.

**NPs.** Nanopartículas.

**NPs-TiO<sub>2</sub>.** Nanopartículas de di6xido de titanio.

**NPs-Ag.** Nanopartículas de plata.

**NPs-SiO<sub>2</sub>.** Nanopartículas de di6xido de sílice.

**NPs-HAP.** Nanopartículas de hidroxiapatita.

**NPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.** Nanopartículas de magnetita.

**NT.** Nanotubos.

**PBS.** Buffer fosfato salino.

**RNS.** Especies reactivas de ntr6geno.

**ROS.** Especies reactivas de oxigeno.

**SSC.** Granularidad.

**TF.** Factor tisular.

**TiO<sub>2</sub>.** Di6xido de titanio.

**TEM.** Microscopia electr6nica de transmisi6n.

**TNF-α.** Factor necr6tico tumoral- alfa.

**VEGF.** Factor de crecimiento endotelial vascular.

**RPM.** Revoluciones por minuto.

**TGF.** Factor crecimiento tumoral.

## RESUMEN

**Introducción.** Las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO<sub>2</sub>) son usadas como pigmento blanco en la fabricación de colorantes, cosméticos, pinturas, papel, plásticos, pastas dentales y bloqueadores solares. Los trabajadores que sintetizan NPs-TiO<sub>2</sub> son el sector de la población con mayor riesgo de exposición a ellas, al inhalarlas pueden ser captadas y almacenadas en los neumocitos tipo II. En este estudio se evaluó los cambios provocados por la exposición subtóxica a NPs-TiO<sub>2</sub> en la expresión de moléculas pro-inflamatorias y pro-angiogénicas en neumocitos tipo II.

**Materiales y métodos.** Los neumocitos tipo II fueron expuestos a 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 7 días. Las NPs-TiO<sub>2</sub> fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y mediante citometría de flujo se evaluó su captación. Las concentraciones de interleucina 6 (IL-6) y óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) se detectaron después del cuarto y séptimo día de exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y reacción de Griess, respectivamente. Los cambios en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor inducible de hipoxia (HIF) en las células que fueron expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub> se determinaron por fluorescencia en citometría de flujo.

**Resultados.** Los neumocitos tipo II internalizaron NPs-TiO<sub>2</sub> de manera concentración dependiente a los tratamientos de 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> favoreciendo un aumento en su granularidad. La producción de NO<sup>•</sup> aumentó significativamente al cuarto día de exposición a 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub>, mientras que la exposición En cambio, al séptimo día de exposición a 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> la producción de NO<sup>•</sup> y de IL-6 disminuyó significativamente. La expresión de VEGF en las células aumentó significativamente ante la exposición durante siete días a 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub>. La expresión de HIF no mostró cambios significativos.

**Conclusiones.** Los neumocitos internalizan NPs-TiO<sub>2</sub> de manera concentración dependiente. La exposición subtóxica de 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> durante cuatro días aumenta la producción de NO<sup>•</sup>, mientras que la exposición durante 7 días a 10 µg/cm<sup>2</sup> disminuye la producción de IL-6, NO<sup>•</sup> y favorece la expresión celular de VEGF.

## INTRODUCCIÓN

### ***La nanotecnología***

El hombre siempre ha estado en busca de nuevos materiales y tecnologías que mejoren su estilo de vida. Como una respuesta a estas necesidades, la nanotecnología ha emergido como una estrategia prometedora para resolverlas. Durante las últimas 3 décadas ha generado nuevas tecnologías e innovaciones en diversas ramas de la ciencia (Albanese *et al.*, 2012).

En Europa, la Iniciativa Nacional de Nanotecnología la define como el estudio y control de material con 1 o más dimensiones de 1 a 100 nm, donde su propósito es generar nuevas aplicaciones (Hubbs *et al.*, 2011). La producción de nanomateriales tiene como objetivo mejorar y revolucionar sectores de la industria y la tecnología como: informática, energía, ciencias ambientales, alimenticia, medicina, transporte, entre muchos otros (Stone *et al.*, 2010; National Nanotechnology Initiative, 2012).

El rápido crecimiento de la nanotecnología y el uso de sus productos tienen un creciente impacto económico. En el 2015, se esperan ganancias económicas por el empleo de estos productos de poco más de 2 trillones de dólares (Hubbs *et al.*, 2013). Según Nanowerk existen 1282 marcas registradas a nivel mundial que generan productos derivados de la nanotecnología usados en alimentos, energía, cosméticos, medicina, industria automotriz e incluso industrias verdes. Sin embargo, ha provocado una problemática sobre los posibles efectos adversos que pudieran causar estos novedosos productos.

Para generar productos nanotecnológicos que sean seguros, se ha sugerido la formación de equipos multidisciplinario con la finalidad de garantizar la seguridad en el diseño de los productos a nanoescala (Hubbs *et al.*, 2011; Fenoglio *et al.*, 2013), así como para evaluar y manejar los riesgos asociados con la exposición de cada tipo de estos nanoproductos (Fenoglio *et al.*, 2013).

### **Nanomateriales y nanopartículas**

Los nanomateriales son definidos por la Unión Europea como cualquier material natural, incidental o manufacturado que contenga partículas, en forma dispersa o como agregados o aglomerados; donde el 50% o más de las partículas exhibidas posean dimensiones de 1 a 100 nm de diámetro (Calzolari *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013). Las nanopartículas (NPs) también son un producto de la nanotecnología, pero a diferencia de los nanomateriales, son definidas como un material con 2 o más dimensiones entre 1 a 100 nm que posean inusuales propiedades fisicoquímicas relacionadas con su tamaño, forma y composición química (Fadeel y Garcia-Bennett, 2010).

Hay una gran diversidad y complejidad de nanomateriales que han entrado en el mercado, por lo que evaluar su seguridad representa un complicado reto debido a sus distintas propiedades (Lai *et al.*, 2012), las cuales las hacen atractivas para emplearlas en el mercado y en productos que están en contacto con el humano (Li *et al.*, 2010; Truel *et al.*, 2012; Hubbs *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013). Distintos autores clasifican a los nanomateriales por su naturaleza química. Wang *et al.* (2012) las clasificaron en cuatro categorías mostradas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación general de los tipos de nanomateriales.

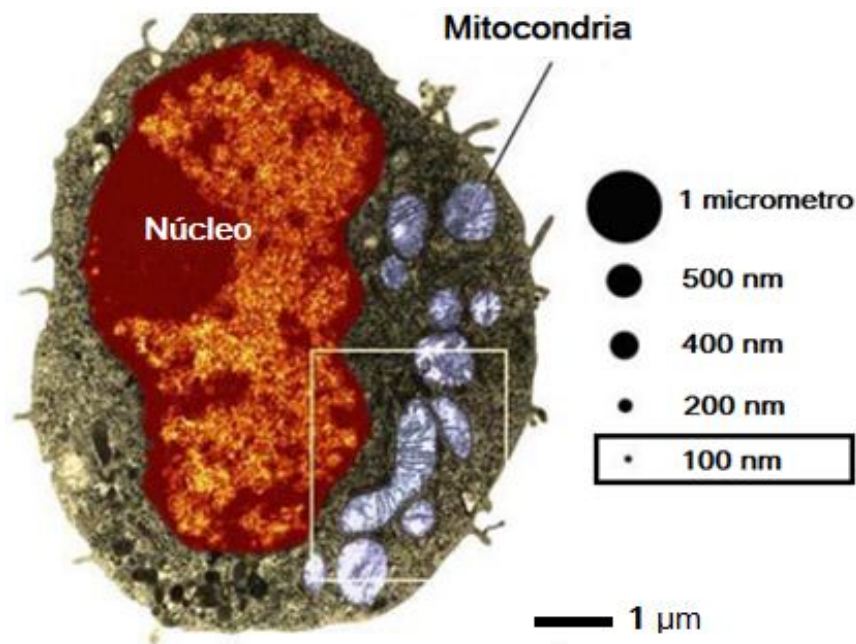
Tipo de nanomaterial	Ejemplo
<b>Nanomateriales a base de carbón</b>	Nanotubos de carbono (CNT) y fullerenos (C60)
<b>Nanomateriales a base de metal</b>	Dióxido de titanio (TiO <sub>2</sub> ) y óxido de zinc (ZnO)
<b>Dendrímeros</b>	Polímeros en nanoescala
<b>Compuestos de distintos nanomateriales</b>	NPs con centro de sílice-platino

Los productos con estas NPs son utilizados en la industria automovilística, electrónica, aeroespacial, electrónica, energética, alimenticia, construcción, farmacéutica y cosmética (Buzea *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012). Es importante considerar el riesgo de exposición

a estos nanomateriales debido a que Las NPs pueden internalizarse en el cuerpo y distribuirse a otros órganos, causando efectos adversos a la salud (Li *et al.*, 2010).

En comparación con estructuras celulares como las mitocondrias que miden 1 a 3  $\mu\text{m}$ , las NPs son más pequeñas (Buzea *et al.*, 2007) (Fig.1), así que sus efectos tóxicos pueden ser atribuidos a su pequeño tamaño, a su reactividad química y a su capacidad de internalizarse en tejidos, células individuales y en organelos celulares (Fadeel y Garcia-Bennett, 2010; Shukla *et al.*, 2011; Hubbs *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013).

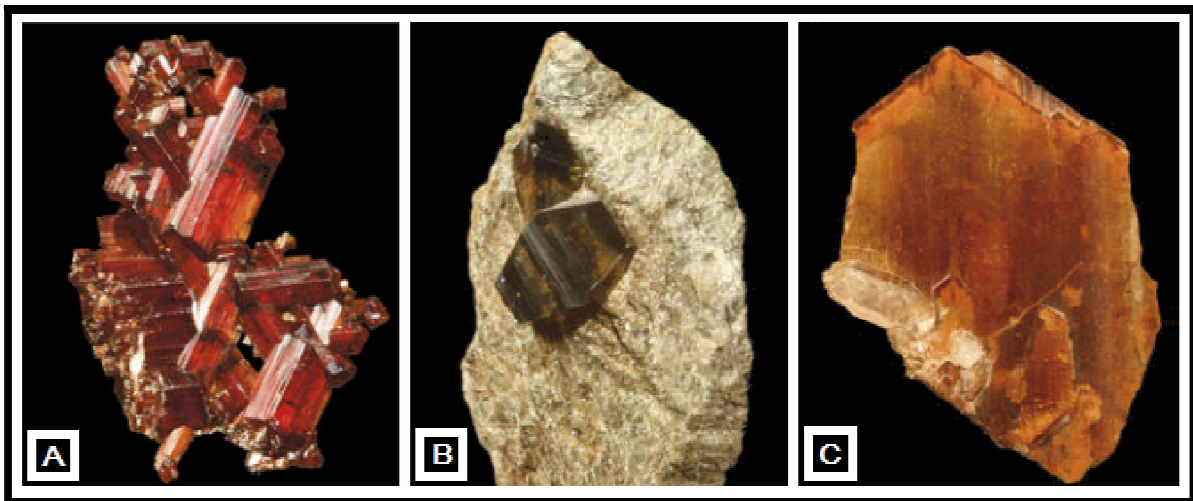
Entre las NPs con mayor preocupación por su volumen de producción y su mayor potencial de exposición, están las de plata (NPs-Ag), los nanotubos de carbono (NTC), fullerenos C60 (C60) y las NPs de dióxido titanio (NPs-TiO<sub>2</sub>) (Hendren *et al.*, 2011). Esta última tiene el 70% de la producción mundial de pigmentos (Husain *et al.*, 2013).



**Figura 1. Comparación del tamaño de NPs con estructuras celulares.** Macrófago de rata comparado con partículas de 1000, 500, 400, 200 y nanopartículas de 100 nm (encerrada en el recuadro). Los macrófagos humanos son dos veces más grandes que los macrófagos de rata. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM); teñido en rojo el núcleo, en azul las mitocondrias. Imagen tomada de Buzea *et al.*, 2007.

### **Nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO<sub>2</sub>)**

En la naturaleza el TiO<sub>2</sub> se presenta en 3 estructuras cristalinas: anatasa, rutilo y broquita (Fig. 2) (Skocaj *et al.*, 2011; Fries y Simkó, 2012). La forma anatasa comparada con el rutilo, es la forma más empleada comercialmente además de ser la más reactiva. El rutilo presenta un arreglo más denso y estable de átomos (lavicoli *et al.*, 2011; Skocaj *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013).



**Figura 2. Tres formas cristalinas naturales del TiO<sub>2</sub>.** A) Rutilo, B) Anatasa y C) Broquita.

Tomado de Fries y Simiko, 2012.

El TiO<sub>2</sub> es también conocido como titania, titanio óxido (IV), ácido titánico anhídrido o titanio blanco (Shi *et al.*, 2013). Durante muchas décadas fue considerado como un material seguro e inerte (Skocaj *et al.*, 2011). Pero con el desarrollo de la nanotecnología se cambió el tamaño del TiO<sub>2</sub> a escalas nanométricas (<100 nm de diámetro) modificando sus propiedades fisicoquímicas iniciales (Shi *et al.*, 2013).

Las NPs-TiO<sub>2</sub> tienen una buena resistencia al desgaste y a la corrosión, presentan excelente rendimiento óptico, maquinabilidad, biocompatibilidad, blancura, fotocatalisis y propiedades eléctricas. Las NPs- TiO<sub>2</sub> son empleadas como un aditivo, pigmento blanco en las pinturas, colorante en alimentos, en bloqueadores solares, en cremas cosméticas, en la descontaminación del aire, agua y suelo, y año con año se ha incrementado su manufactura y su aplicación (lavicoli *et al.*, 2011; Skocaj *et al.*, 2011).

La producción de las NPs-TiO<sub>2</sub> incrementa año con año colocándolo entre las cinco NPs más empleadas en los productos de consumo (Shukla *et al.*, 2011; Husain *et al.*, 2013). Tan sólo en Estados Unidos en el 2006 se produjeron 40,000 toneladas de NPs-TiO<sub>2</sub>, pero, debido a su demanda en el mercado, se ha estimado que para el 2025 la producción de NPs-TiO<sub>2</sub> será de 2.5 millones de toneladas (Zhang *et al.*, 2012).

### ***Exposición a las NPs-TiO<sub>2</sub>***

El incremento en la manufacturación de NPs-TiO<sub>2</sub>, tendrá como consecuencia que parte de estos materiales sea liberado al ambiente, afectando a la biosfera y la cadena alimenticia (Robichaud *et al.*, 2009). Conocer el ciclo de vida que tienen estos nanomateriales nos ayuda a entender el riesgo de exposición que existe (Fig. 3) (Robichaud *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

La exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> ocurre por ingestión, inhalación, contacto dermal o por aplicaciones medicas. La exposición oral puede ocurrir a través del consumo de productos alimenticios que las contienen. La exposición inhalatoria la sufren principalmente los trabajadores que las sintetizan, también tiene lugar en el empleo de aerosoles que las contienen, como algunos bactericidas y bloqueadores solares. El contacto dermal puede ocurrir a través de la aplicación de cosméticos y bloqueadores solares. La exposición por aplicaciones médicas ocurre por el uso de implantes de TiO<sub>2</sub> y por el uso de NPs-TiO<sub>2</sub> como excipiente en fármacos durante el tratamiento médico (Teow *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013).

La constante exposición a NPs puede tener como consecuencia daños adversos a la salud. Durante su manufacturación los sitios con mayor riesgo de exposición son las zonas de empaque, limpieza y mantenimiento. En estas zonas se ha indicado que puede haber una concentración de 15, 000 a 156, 000 partículas de TiO<sub>2</sub>/cm<sup>3</sup>, con un diámetro de 20 y 30 nm y variaciones en su tamaño de 25 a 100 nm (Liao *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2013; Skocaj *et al.*, 2013).

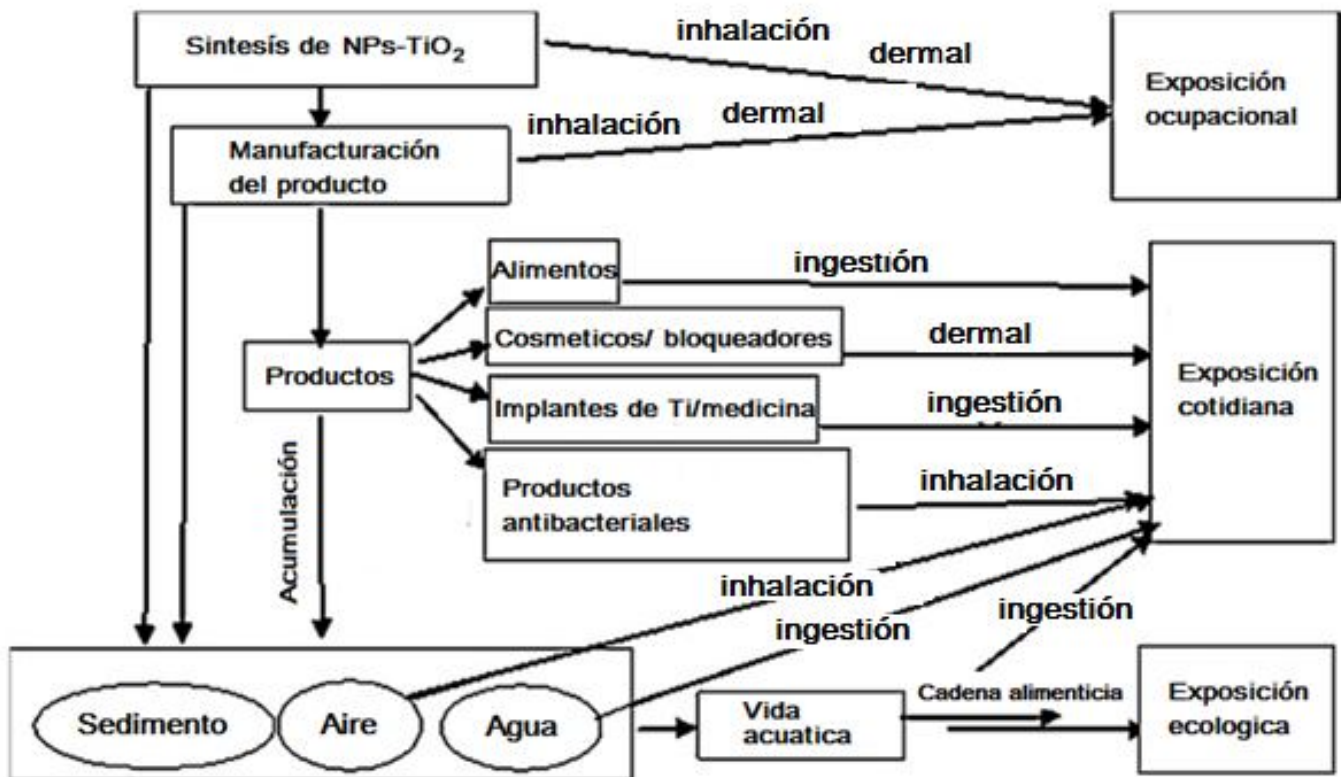


Figura 3. Ciclo de vida de las NPs-TiO<sub>2</sub> en el ambiente. Potencial de liberación, exposición y acumulación de las NPs-TiO<sub>2</sub> en el ecosistema. Imagen tomada de Zhang et al., 2012.

### Efectos tóxicos de las NPs-TiO<sub>2</sub>

Las NPs-TiO<sub>2</sub> son usadas en bloqueadores solares por qué puede reflejar los rayos UV de la piel, pero es importante considerar que se usan las diferentes formas cristalinas en diversos productos. La exposición a las diferentes formas cristalinas de las NPs-TiO<sub>2</sub> tienen distintos efectos tóxicos. La toxicidad que poseen las NPs-TiO<sub>2</sub> se debe a su pequeño tamaño, la forma cristalina, reactividad química, área superficial, estado de agregación cuando están resuspendidas facilidad por adentrarse en distintos tipos de células, capacidad por generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y prolongada exposición a ellas (Pan et al., 2009; Shukla et al., 2011; Zang et al., 2012). Debido a los diversos factores que influyen en la toxicidad de las NPs-TiO<sub>2</sub> es importante hacer una caracterización de las NPs usadas en los estudios toxicológicos (Werheit, 2013).



En 1986 Yamadori y colaboradores mostraron que en un trabajador de 53 años empleado como empacador de  $\text{TiO}_2$  durante 13 años desarrolló adenocarcinoma en el pulmón, además de mostrar la presencia de titanio acumulado alrededor de los bronquiolos. Lo anterior es un dato relevante pues en humanos existe poca evidencia de los efectos tóxicos que provoca tener una exposición a NPs- $\text{TiO}_2$ . Por el contrario en modelos animales hay evidencia de su toxicidad y efecto carcinógeno (Zhang *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013).

La exposición a NPs- $\text{TiO}_2$  genera citotoxicidad, ROS, especies reactivas de nitrógeno (RNS), rompimiento en las cadenas del ADN, alteración en el ciclo celular, formación de micronúcleos, apoptosis en diversos tipos de células, incremento en la liberación de citocinas pro-inflamatorias, sobreproducción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ), y una disminución en la generación de antioxidantes (Zhao *et al.*, 2009; Hubbs *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Husain *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013).

Esta información ha promovido que la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) clasifique a las NPs- $\text{TiO}_2$  en el grupo 2B como posible carcinógeno en humanos (IARC, 2010). Es importante descubrir el potencial tóxico que tienen las NPs- $\text{TiO}_2$  en humanos, pues se ha convertido en una preocupación urgente debido a su creciente demanda en el mercado (Zhang *et al.*, 2012).

### ***Efectos adversos en el pulmón por la exposición a NPs- $\text{TiO}_2$***

Las NPs- $\text{TiO}_2$  pueden ser inhaladas del medio ambiente y alojarse en el tracto respiratorio generando efectos tóxicos (Li *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2012; Truel *et al.*, 2013).

Las partículas después de entrar al sistema respiratorio pueden quedar atrapadas en mucosas o ser fagocitadas por macrófagos del sistema respiratorio. Las partículas que quedan libres pueden dirigirse a células epiteliales e internalizarse en ellas, iniciando la producción de citocinas pro-inflamatorias. También se ha observado que las partículas libres pueden cruzar la barrera alveolo-sangre, e incorporarse al torrente circulatorio y translocarse a cerebro, corazón, hígado, bazo y riñones (Fig. 4) (Skocaj *et al.*, 2012).

En ratas se ha demostrado que la exposición por instilación intratraqueal durante prolongados tiempos a altas concentraciones de TiO<sub>2</sub>, provoca el desarrollo de cáncer de pulmón (Husain *et al.*, 2013). En ratas expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub> durante 2 años por la vía inhalatoria, se observó que en el pulmón hay una acumulación dosis dependiente de NPs-TiO<sub>2</sub>, hiperplasia en neumocitos, proteinosis alveolar y la aparición de adenomas bronquio alveolares (Park *et al.*, 2009).

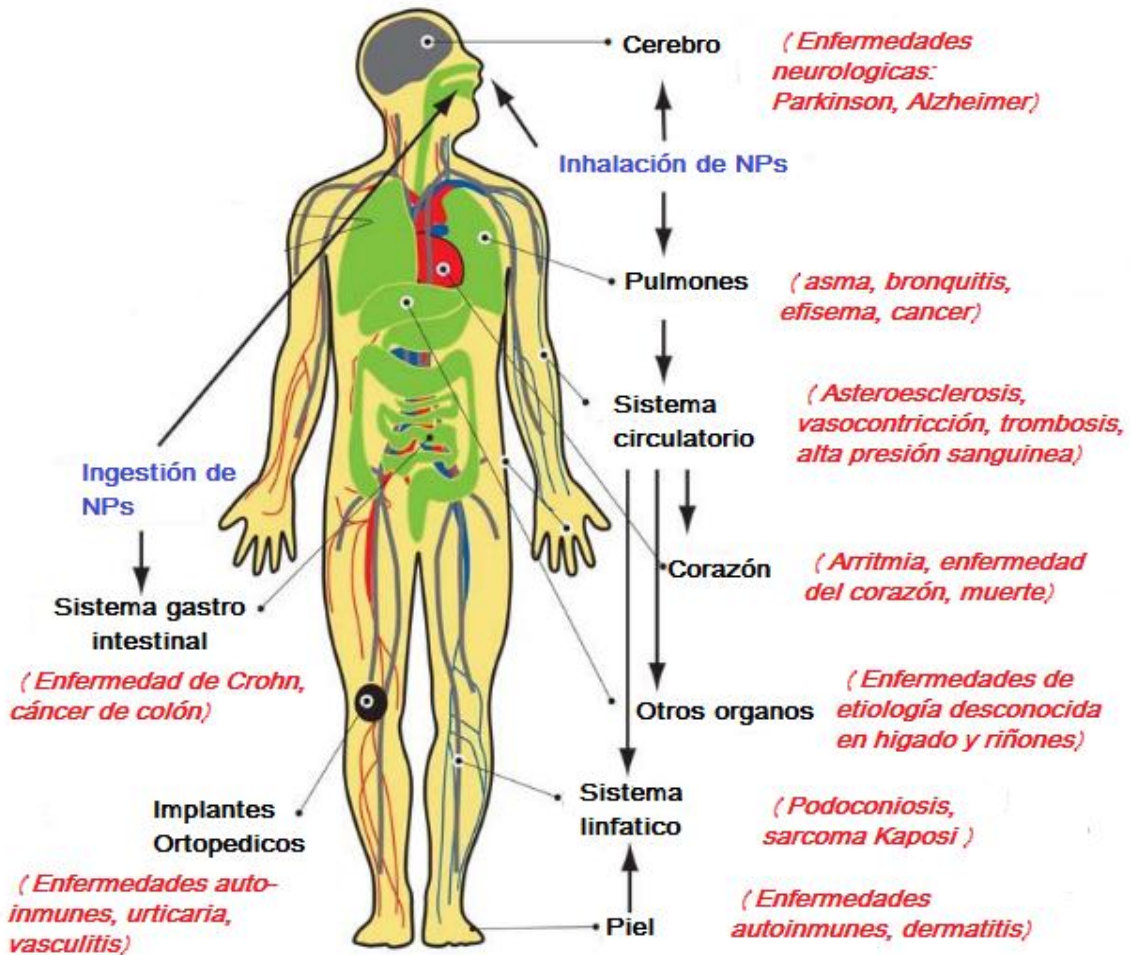
La exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> puede iniciar respuestas inflamatorias en pulmones (Skocaj *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Husain *et al.*, 2013). Se ha demostrado que ratones expuestos a 2.5, 5 y 10 mg/kg de NPs-TiO<sub>2</sub> por instilación intratraqueal durante 90 días provoca daño pulmonar asociado a procesos inflamatorios, liberación de citocinas inflamatorias, generación de estrés oxidante y la activación del factor nuclear kappa beta (NF-κβ) (Sun *et al.*, 2012).

### **Proceso inflamatorio por exposición a NPs-TiO<sub>2</sub>**

Park *et al.* (2009) demostraron que en ratones expuestos por instilación intratraqueal a 5, 20 y 50 mg/kg de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 14 días hay una inflamación crónica y la inducción de citocinas inflamatorias. Se observó que la inducción de IL-1, IL-6 y TNF-α fue de manera dosis dependiente a la exposición de las NPs. En ratones expuestos a 5, 10, 50, 100 y 150 mg/kg a NPs-TiO<sub>2</sub> durante 14 días, existe un aumento en la expresión de NF-κβ, TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-4 (Shi *et al.*, 2013).

La exposición a NPs puede activar otros mecanismos que inicien el proceso inflamatorio. Ramos-Godínez *et al.* (2013) demostraron, que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> en células endoteliales provoca que la respuesta inflamatoria inicie con el reclutamiento de monocitos y macrófagos. Lo anterior provoca el incremento de ROS, la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, E y P-selectinas y la sobreexpresión de moléculas pro-angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiotensina II (All), y factor tisular (TF). Lo anterior es interesante pues no hay estudios suficientes que evidencien la asociación entre procesos inflamatorios y la

formación de nuevos vasos sanguíneos o también conocido como angiogénesis (Ono et al., 2008).

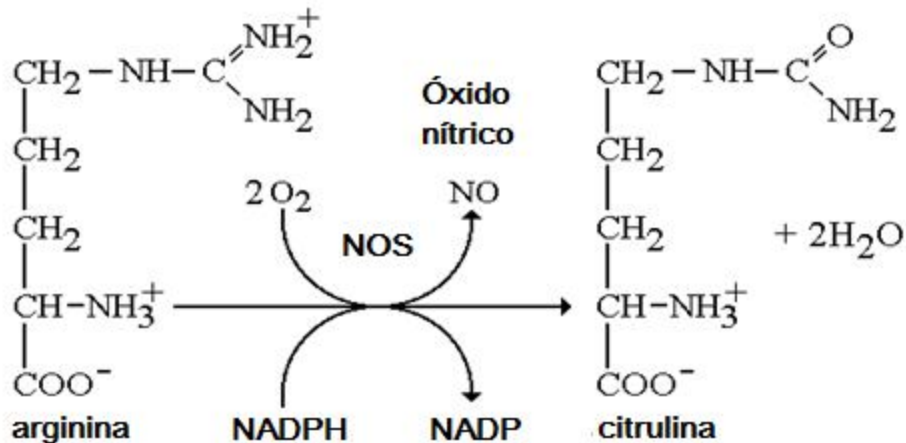


**Figura 4. Enfermedades asociadas a la exposición de NPs.** Esquema del cuerpo humano con las distintas vías de exposición a NPs y su distribución en el cuerpo. Órganos afectados y asociados a enfermedades en estudios “in vivo” por exposición a NPs. Imagen tomada de Buzea et al., 2007.

### Óxido nítrico (NO<sup>•</sup>)

El NO<sup>•</sup> es una molécula producida principalmente por células epiteliales del tracto respiratorio, células endoteliales y células inflamatorias (Gelb et al., 2012). El NO<sup>•</sup> es

formado a partir de isoenzimas de la óxido nítrico sintasa (NOS), las cuales tienen la función de convertir la L-arginina en L-citrulina y NO<sup>•</sup> (Fig. 5) (Ricciardolo *et al.*, 2004).



**Figura 5. Síntesis del óxido nítrico.** En presencia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), oxígeno y NOS, catalizan la transformación de L-arginina a citrulina y NO<sup>•</sup>. La citrulina puede ser reciclada para formar L-arginina y el NO<sup>•</sup> puede tener efectos autocrinos como una retroalimentación negativa en la NOS.

La NOS es un familia que se compone de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la óxido nítrico sintasa neural (nNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La iNOS a diferencia de la eNOS y la nNOS no es constitutivamente expresada, pero puede ser inducida por distintos estímulos, esto provoca la sobreproducción de NO<sup>•</sup> lo cual implica efectos pro-inflamatorios (Ricciardolo *et al.*, 2004). Por este motivo se ha evidenciado que la sobreproducción de NO<sup>•</sup> es un marcador de inflamación.

La acumulación de NPs en el pulmón causa un aumento en los niveles de NO<sup>•</sup>, reclutamiento de células inflamatorias y sobreproducción de citocinas inflamatorias (Manke *et al.*, 2013). En otros estudios se ha visto que en pulmones hay un incremento significativo en los niveles de NO<sup>•</sup> después de ser expuestos a nanopartículas de dióxido de sílice (NPs-SiO<sub>2</sub>) y cuarzo (Carter y Driscoll *et al.*, 2001). Esta molécula reacciona rápidamente con el O<sub>2</sub>, por este motivo se cuantifican sus metabolitos estables NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub> (Adarmes *et al.*, 2009). Actualmente no hay estudios demuestran que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub>, en células epiteliales de pulmón provoquen cambios en los niveles de NO<sup>•</sup>.

### ***El factor inducible de hipoxia (HIF 1- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)***

La angiogénesis es un proceso fisiológico, que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos preexistentes. Este proceso es regulado por señales pro y anti-angiogénicas en tejidos normales (Chetty *et al.*, 2009).

El VEGF es el principal inductor angiogénico en el desarrollo embrionario y en la angiogénesis tumoral (Shubbar *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha encontrado que los procesos inflamatorios y angiogénicos junto con la expresión de VEGF, están asociados en enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Crohn, diabetes, artritis reumatoide u obesidad (Ono *et al.*, 2008). Por otro lado se ha observado que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> puede intervenir en la expresión de moléculas inflamatorias y angiogénicas.

Montiel-Dávalos *et al.* (2012) demostraron que células endoteliales expuestas a 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 48 h provocan el incremento de ROS, la activación de NF- $\kappa\beta$  y un incremento en la expresión de VEGF.

La producción de VEGF es controlada a través de respuestas celulares, sin embargo, en niveles bajos de oxígeno o hipoxia, se incrementa la formación de ROS y se activa la transcripción del factor inducible de hipoxia (HIF). Este es un factor de transcripción importante que puede regular la expresión de VEGF (Shubbar *et al.*, 2011). Las NPs-TiO<sub>2</sub> generan ROS relacionadas con las señalizaciones que ocasionan hipoxia, lo cual provocaría un aumento en la transcripción de HIF y en la concentración citosólica de VEGF (Al-Melhdi *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012). Este aumento del HIF y el VEGF es de nuestro interés, debido a que pueden ser un importantes reguladores de la angiogénesis (Choi *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011; Shubbar *et al.*, 2011).

Las ROS han sido implicadas en diversas enfermedades vasculares asociadas con el funcionamiento de membranas endoteliales. La formación de ROS contribuyen a la estabilidad de HIF esto genera una vía de señalización ROS-HIF-VEGF (Irwin *et al.*, 2009). Por lo que evaluar si las NPs-TiO<sub>2</sub> pueden actuar en la vía HIF-VEGF es de nuestro interés.

## JUSTIFICACIÓN

La creciente producción de NPs-TiO<sub>2</sub> implica que puedan acumularse en agua, suelo o suspendidas en el aire pero el sector de la población con mayor riesgo de exposición la enfrentan los trabajadores que las sintetizan. Las NPs-TiO<sub>2</sub> que son inhaladas pueden llegar a los alvéolos y ser internalizadas por neumocitos tipo II. La citotoxicidad que tienen las NPs-TiO<sub>2</sub> en neumocitos tipo II está siendo investigada, sin embargo, estos estudios no son representativos debido a que son a altas concentraciones y en tiempos muy cortos de exposición (48 h). Por lo que es representativo de la exposición ambiental investigar los efectos tóxicos que tienen a NPs-TiO<sub>2</sub> en concentraciones bajas y a mayores tiempos de exposición.

Se ha propuesto que la inflamación y la angiogénesis están asociadas, se ha estudiado la la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> en el pulmón pero las alteraciones en la expresión de moléculas proinflamatorias (IL-6 y NO\*) y proangiogénicas (HIF 1-α y VEGF) que pudiera tener la exposición subtóxica a 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> durante siete días en neumocitos tipo II no ha sido observado. Por lo que, esta tesis tiene como finalidad demostrar los cambios en la expresión de IL-6, NO\*, HIF 1-α y VEGF por la exposición subtóxica a NPs-TiO<sub>2</sub> durante siete días.

## **HIPÓTESIS**

La exposición subtóxica a 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NPs-TiO<sub>2</sub> durante siete días en neumocitos tipo II será capaz de provocar cambios en la expresión de moléculas proinflamatorias (IL-6 y NO<sup>•</sup>) y proangiogénicas (HIF 1- $\alpha$  y VEGF).

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

- Evaluar la expresión de factores pro-inflamatorios y pro-angiogénicos en neumocitos tipo II expuestos a concentraciones sub-tóxicas de NPs-TiO<sub>2</sub> durante cuatro y siete días.

### ***Objetivos particulares***

- Caracterizar el potencial Z y el tamaño de las NPs-TiO<sub>2</sub> resuspendidas en medio de cultivo F12K + FBS.
- Evaluar la captación de NPs-TiO<sub>2</sub> por citometría de flujo en neumocitos tipo II expuestos a 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NPs-TiO<sub>2</sub> durante siete días.
- Determinar la producción de NO<sup>•</sup> por reacción de Griess en neumocitos tipo II expuestos a 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NPs-TiO<sub>2</sub> durante cuatro y siete días.
- Determinar la expresión de IL-6 por ELISA en neumocitos tipo II expuestos a 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NPs-TiO<sub>2</sub> durante cuatro y siete días.
- Determinar la expresión de HIF 1- $\alpha$  y de VEGF por citometría de flujo en neumocitos tipo II expuestos a 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NPs-TiO<sub>2</sub> durante siete días.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### ***Materiales***

Medio F12K (IX) modificado por Kaighit con L-glutamina y bicarbonato de sodio (In vitro S.A.), tripsina-EDTA-4Na al 0.05% y EDTA-4Na al 0.02% (In vitro S.A.), suero fetal bovino (Biowest US1520), NPs-TiO<sub>2</sub> titanio (IV), anatasa de < 25 nm de diámetro, purificado 99.7% de base metálica (Sigma Aldrich), anticuerpo contra HIF1- $\alpha$  (H-206) 200  $\mu$ g/ml sc-10790 (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo contra VEGF (VG-1) sc-53462 200  $\mu$ g/ml (Santa Cruz Biotechnology), cajas estériles para cultivo celular adherente (STARTED). Citómetro FACScalibur (Beckson Dickinson, San Jose CA).

### ***Caracterización de las NPs-TiO<sub>2</sub>***

#### Tamaño

Sin importar el tamaño de las nanopartículas primarias reportadas por el distribuidor (25nm), cuando las partículas primarias entran en contacto con el medio de cultivo, forman interacciones que permiten la formación de aglomerados con diferente tamaño, forma, Potencial Z, entre otras características fisicoquímicas. Por ello fue necesario conocer las características de los aglomerados formados en el medio de cultivo. El tamaño, se determinó utilizando dos métodos: 1) Diámetro hidrodinámico (mediante dispersión dinámica de luz, DLS; utilizando el NS-Zeta nanosizer, Malvern, USA) y 2) Por microscopía electrónica de transmisión TEM (JEOL-JEM-1010, JEOL Japón).

#### Potencial Z

Se determinó utilizando el analizador de Potencial Z (Zeta Plus Analyser, Broekhaven, USA). Para ello se utilizaron  $3.43 \times 10^{-3}$   $\mu$ g TiO<sub>2</sub> NP/ $\mu$ l Medio de cultivo.



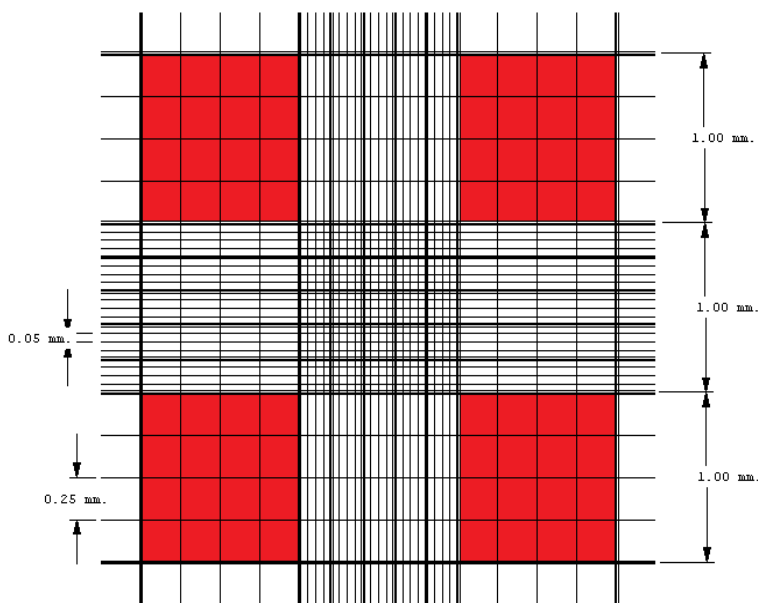
### ***Cultivo celular de neumocitos tipo II***

Se usaron neumocitos tipo II, conocidos como la línea celular A549 y que fueron obtenidas de la Colección de Cultivo Tipo Americano (ATCC). Su origen data de 1972 cuando el Dr. Giard D.J. realizó una extracción de células de tejido pulmonar con carcinoma de un hombre caucásico de 58 años. Estas células son adherentes y son responsables de la difusión de sustancias, como agua y electrolitos.

Los neumocitos tipo II fueron sembrados en cajas de 75 cm<sup>2</sup> diámetro para cultivo celular adherente. Los cultivos se mantuvieron en una confluencia de  $2 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  de células por cm<sup>2</sup>, se suplementaron con medio de cultivo F12K al 90% y suero fetal bovino (FBS) al 10%, en una ambientación de 37° C y 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Se realizaron subcultivos de 250, 000 neumocitos con la finalidad de mantenerlos en crecimiento. Para despegar a las células se usó tripsina 0.05% y EDTA al 0.02 %. Las células despegadas se centrifugaron a 1, 300 revoluciones por minuto (RPM) durante 6 min, la pastilla se resuspendió en 1 ml de medio F12K y FBS.

El conteo celular se realizó tomando 20 µl de las células resuspendidas en el medio de cultivo, los cuales se mezclaron con 60 µl de azul tripano. El homogenizado quedó en una disolución 1:4, de la cual posteriormente se tomó 10 µl y se colocó en una cámara de Neubauer. La cuantificación se realizó en los cuadrantes de las esquinas de la cámara (Fig. 6).



**Figura 6. Cuadrante de la cámara de Neubauer.** Se señala en rojo los cuadrantes donde se llevó a cabo la cuantificación de células.

La fórmula empleada para determinar el número de células es la siguiente:

$$\frac{\text{(Sumatoria total de las células) (Volumen final) (Factor de dilución) (10 000)}}{4}$$

4

### **Tratamiento con NPs-TiO<sub>2</sub>**

Los neumocitos tipo II se expusieron a distintas concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 4 y 7 días dependiendo del experimento. Se hicieron cuatro grupos experimentales. El grupo 1 se conformó de células control, el grupo 2 de células expuestas a 1 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub>, el grupo 3 de células expuestas a 5 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> y el grupo 4 de células expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub>.

Se pesó 1 mg de NPs-TiO<sub>2</sub> y se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo, quedando a una concentración 1 µg/1µl. Posteriormente las NPs-TiO<sub>2</sub> fueron sonicadas a 60 Hertz durante 30 min, esto con la finalidad de disgregarlas. Para cada cultivo se usaron 250, 000 células en cajas de 24 cm<sup>2</sup> por lo que para exponer a los neumocitos se agregó para el grupo 1, 24 µl, al grupo 2, 120 µl y para el grupo 3, 240 µl de las NPs-TiO<sub>2</sub> resuspendidas.

### ***Tinción de hematoxilina y eosina***

Se colocaron cubreobjetos estériles en el interior de las cajas de cultivo celular. Posteriormente en cada caja se sembraron 100, 000 células con sus respectivas concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Luego de 7 días de exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> se recuperó el cubreobjetos, el cual tenía adheridas las células a evaluar.

Las células en el cubreobjetos fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 1 hora, después se tiñeron con hematoxilina por 10 min y enjuagadas con PBS. Posteriormente se tiñeron con eosina por 10 min y se enjuagaron con PBS. Las células se montaron en portaobjetos y se observaron en microscopio de campo claro, se enfocaron a 63 aumentos y se tomaron fotografías.

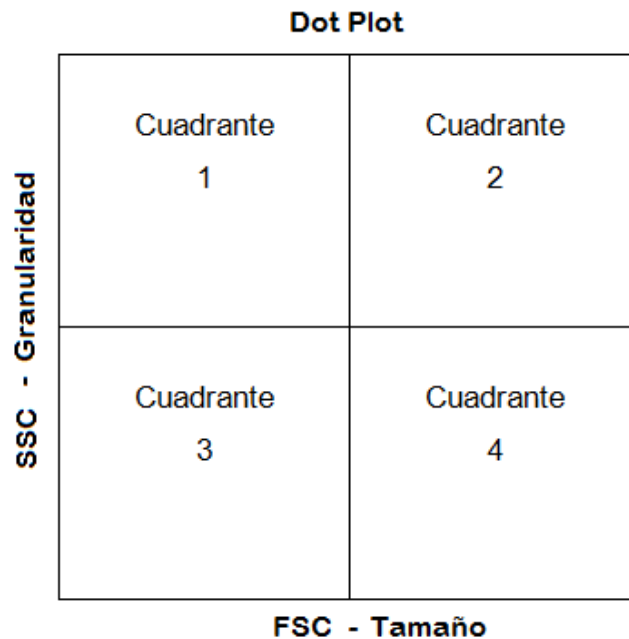
Esta tinción además de facilitar la observación de morfología celular también permitió visualizar a las NPs-TiO<sub>2</sub> que fueron internalizadas, debido al contraste generado por la hematoxilina que tiñe el núcleo de morado y la eosina que tiñe el citoplasma de rosa.

### ***Captación de NPs-TiO<sub>2</sub> por citometría de flujo***

Los neumocitos después de estar expuestos siete días a NPs-TiO<sub>2</sub> se despegaron con PBS-EDTA a 1 mM y fueron fijados en alcohol al 70% durante 12 h. Después fueron centrifugados 2 veces a 1, 200 rpm durante 7 min, la pastilla resultante se resuspendió en 300 µl de FacsFlow hasta ser leídas en el citómetro de flujo.

Se evaluó la captación de NPs-TiO<sub>2</sub> en 10,000 células de cada grupo experimental. Se usó el software Cells Quest-Pro para ajustar en cada lectura los parámetros de side scatter (350-SSC) y de forward scatter (E001-FSC). Las intensidades obtenidas por 350-SSC y E001-FSC son respectivamente proporcionales a la complejidad intracelular y al tamaño celular.

Los datos obtenidos por el citómetro de flujo fueron analizados con el programa WinMDI 2.9 y por medio del mismo se marcó en un panel “dot plot” cuatro cuadrantes en los que se observó los cambios en la granularidad de los neumocitos que fueron expuestos a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> (Fig. 7).



**Figura 7. Gráfica de “dot plot”.** En la gráfica de “dot plot”, el eje de las “X” refleja la intensidad de FSC en escala lineal. El eje de las “Y” corresponde al SSC que es el la granularidad celular en escala lineal. Para determinar la captación de NPs-TiO<sub>2</sub> se comparó el incremento de la densidad intracelular (SSC) de los neumocitos tipo II controles, con los neumocitos tipo II que fueron expuestos a 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub>.

Después de evaluar las poblaciones celulares, se seleccionó el cuadrante 4 como la población de los neumocitos tipo II que no fueron expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>. Los neumocitos tipo II son capaces de internalizar NPs-TiO<sub>2</sub> en su citoplasma, esto provoca que la población celular del cuadrante 4 se desplace a los cuadrantes 1 y 2. En el cuadrante 3 se indica la presencia de detritos y restos celulares. En las gráficas se tomó en cuenta el

porcentaje de células que se localizaron en el cuadrante 2 debido a que aumentaron su granularidad.

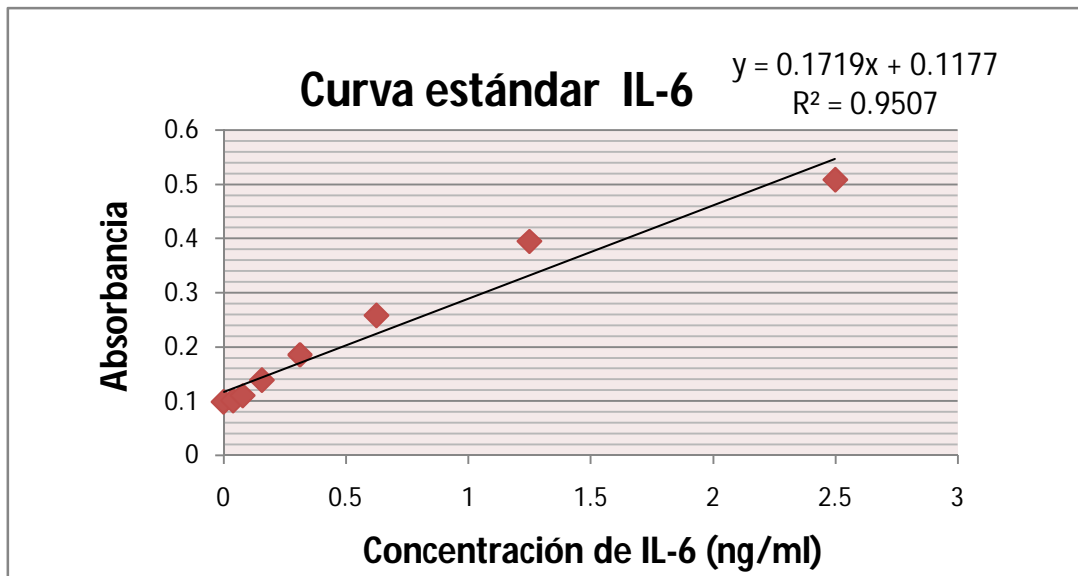
### ***Producción de IL-6 en ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)***

Los medios de cultivo de cada grupo experimental se analizaron después de estar expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub> durante 4 y 7 días. Se tomó una alícuota 1.5 ml de los medios de cultivo, posteriormente fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Se evaluó la concentración de IL-6 por ml mediante una prueba de ELISA.

La ELISA se preparó diluyendo el anticuerpo de captura para IL-6 a una concentración de 2 µg/µl, en 10 ml de PBS. Posteriormente se agregó el anticuerpo de captura en una caja de 96 pozos, distribuyendo 100 µl de la dilución en cada pozo. Al finalizar la placa fue cubierta con aluminio para prevenir la evaporación y se incubó toda la noche a 4 °C.

El exceso del anticuerpo de captura se eliminó mediante 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1% a temperatura ambiente. Después se dejó secar y se bloqueó la inespecificidad del anticuerpo de captura al agregar 200 µl de PBS/FBS al 1%. La placa se cubrió con papel aluminio y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente se lavó la placa 3 veces con PBS /Tween 20 al 0.1%.

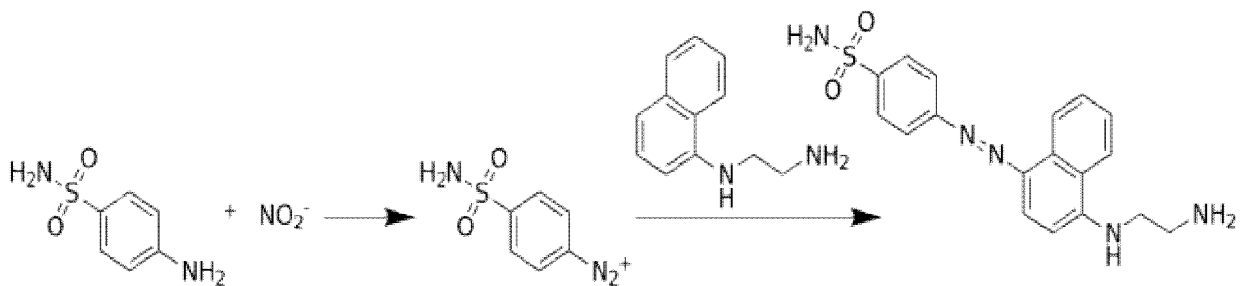
Finalmente se realizó la curva estándar (Fig. 8) y se agregaron las muestras a analizar, a cada pozo se agregó 100 µl de la muestra. La placa fue cubierta con aluminio y se incubó toda la noche a 4°C.



**Figura 8.** Curva patrón del ensayo ELISA para cuantificar la liberación IL-6 de neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>.

### Producción de NO<sup>+</sup> por reacción de Griess

La determinación de la concentración de NO<sup>+</sup> por reacción de Griess (Fig. 9) se realizó tomando 1.5 ml del medio de cultivo durante el cuarto y séptimo día de exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> de cada grupo experimental. El sobrenadante fue almacenado a -20 °C hasta su análisis.

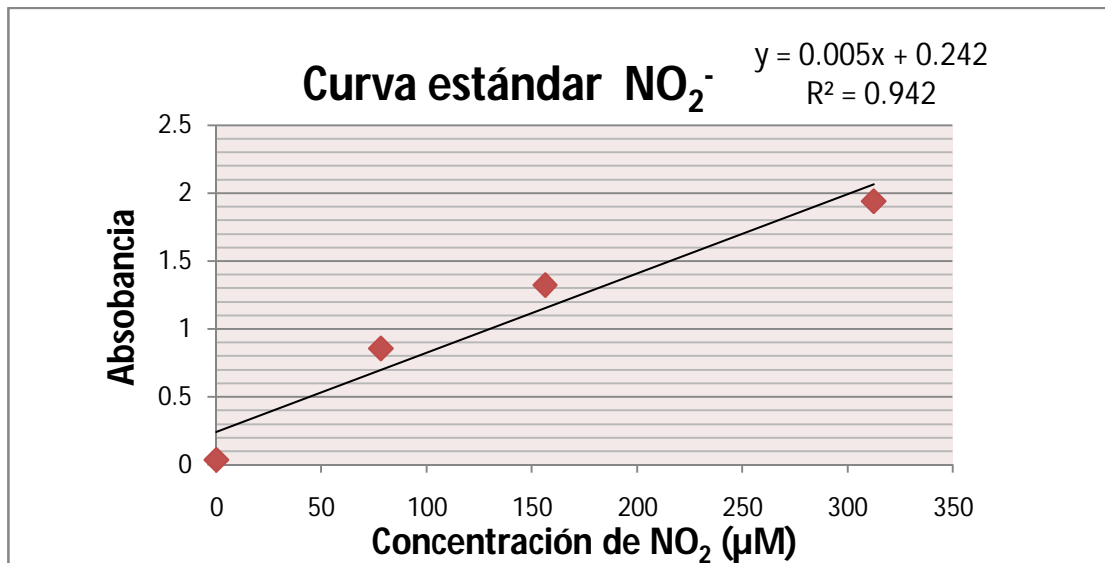


**Figura 9. Reacción de Griess.** El ácido sulfanílico (1 % de sulfanilamida en 5% de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) reacciona con los NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de la muestra, dando lugar a la formación de la sal diazonio. La reacción de la naftilendiamina con la sal diazonio forma un color rosado.

Para la detección de NO<sup>•</sup> se prepararon 2 reactivos, la solución A y la solución B. La primera contenía 0.1 % de naftilenodiamina en agua destilada, la segunda contenía 1 % de sulfanilamida en 5% de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, al mezclar soluciones en una dilución 1:1 se obtuvo el reactivo de Griess.

En una placa de 96 se adicionaron 100 µl de los sobrenadantes colectados de cada grupo experimental. A cada muestra problema se le agregaron 70 µl del reactivo de Griess y se incubó 15 min. Se observó que la reacción dio una tonalidad rosa.

La concentración de NO<sub>2</sub> en los sobrenadantes se determinó mediante una curva patrón (Fig. 10) adicionando 312, 156, 78, 39, 19.5 y 0 µM de NaNO<sub>2</sub> en un volumen de 100 µl a los cuales se les agregaron 70 µl del reactivo de Griess. Finalmente se analizaron las muestras por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm.



**Figura 10. Curva patrón de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.** Curva estándar para cuantificar la liberación nitritos y nitratos de neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>.

### **Marcaje intracelular de HIF 1- $\alpha$ y VEGF por citometría de flujo**

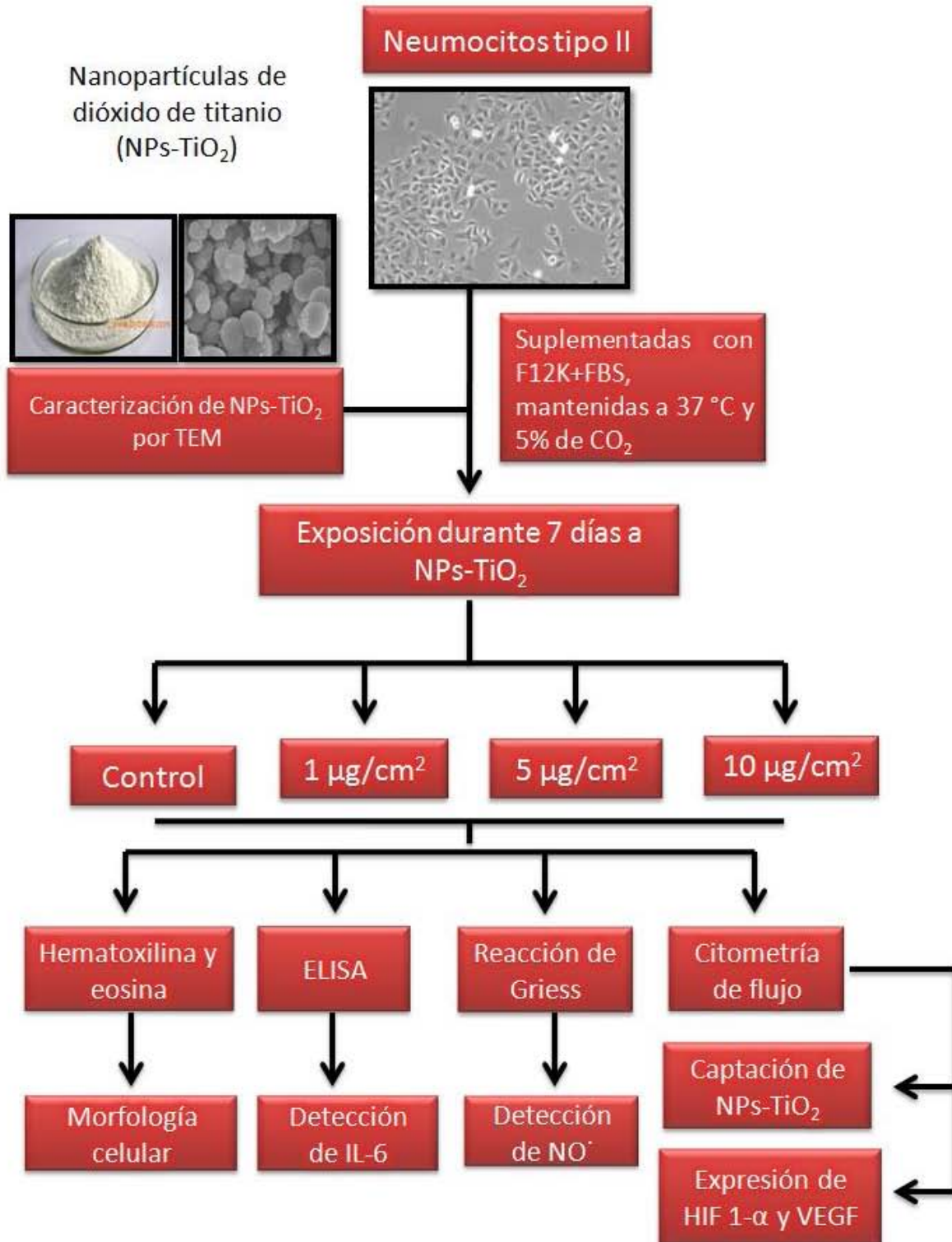
La expresión de HIF y VEGF de los cuatro grupos experimentales se evaluó por citometría de flujo. Las células se despegaron con 2 ml de PBS-EDTA a 1 mM. Después fueron centrifugadas a 1, 300 rpm durante 7 min y lavadas con PBS tres veces. La pastilla fue fijada con alcohol al 70% durante 12 horas a -20 °C.

Posteriormente se quitó el alcohol y para poder realizar la tinción intracelular las células fueron permeabilizadas con 1ml de PBS-Tween al 0.2% durante 15 min a 37 °C. Después se retiró el PBS-Tween 20 al 0.2% de las células y se incubaron con los anticuerpos de HIF o VEGF en una proporción de 1:50 diluido en PBS/albúmina (BSA) al 1% durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación las células fueron centrifugadas a 1, 300 rpm durante 10 min. La pastilla resultante se lavó 3 veces con PBS y se centrifugó a 1, 300 rpm durante 10 min. Las células restantes se incubaron con el anticuerpo secundario FITC en una proporción 1:50 diluido en PBS/BSA al 1% durante 30 min a 4 °C. Posteriormente las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 300  $\mu$ l de FACS flow hasta ser leídas por citometría de flujo.

Se formaron cinco grupos experimentales para analizar los datos obtenidos. El primer grupo fueron células que no fueron marcadas con anticuerpos, por lo que no emitían fluorescencia (neumocitos blanco). Los cuatro grupos restantes fueron marcados con los anticuerpos y la fluorescencia detectada fue determinada en histogramas. En los histogramas se marcó la zona que cuantificó el porcentaje y la intensidad de fluorescencia emitida por VEGF o HIF1- $\alpha$ .



**Panorama general de experimentación**



## RESULTADOS

### Caracterización de las NPs-TiO<sub>2</sub>

Las NPs-TiO<sub>2</sub> (3.43 x10<sup>-3</sup> µg TiO<sub>2</sub>/µl) fueron resuspendidas en medio F12K+FBS y se observó que los aglomerados tienen formas irregulares con un diámetro hidrodinámico de 588 ± 4.3 nm en promedio, mientras que al medir el diámetro de los aglomerados en las imágenes obtenidas por TEM, se observó que tienen un diámetro de 17.62 nm (Fig. 11). Asimismo se observó un Potencial Z de -20.9 ± 0.7.

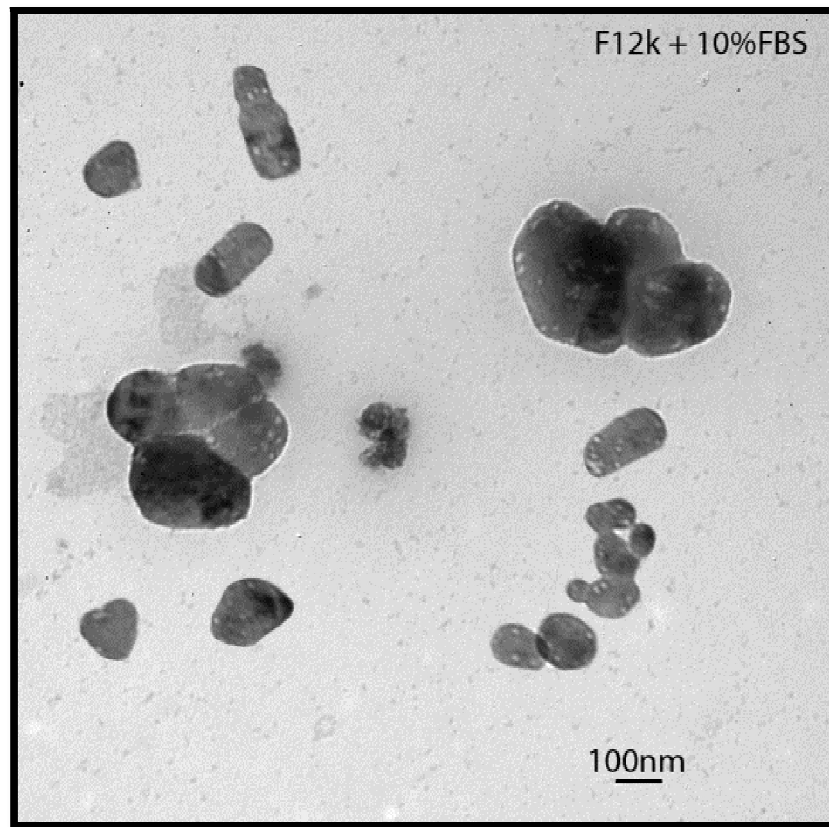
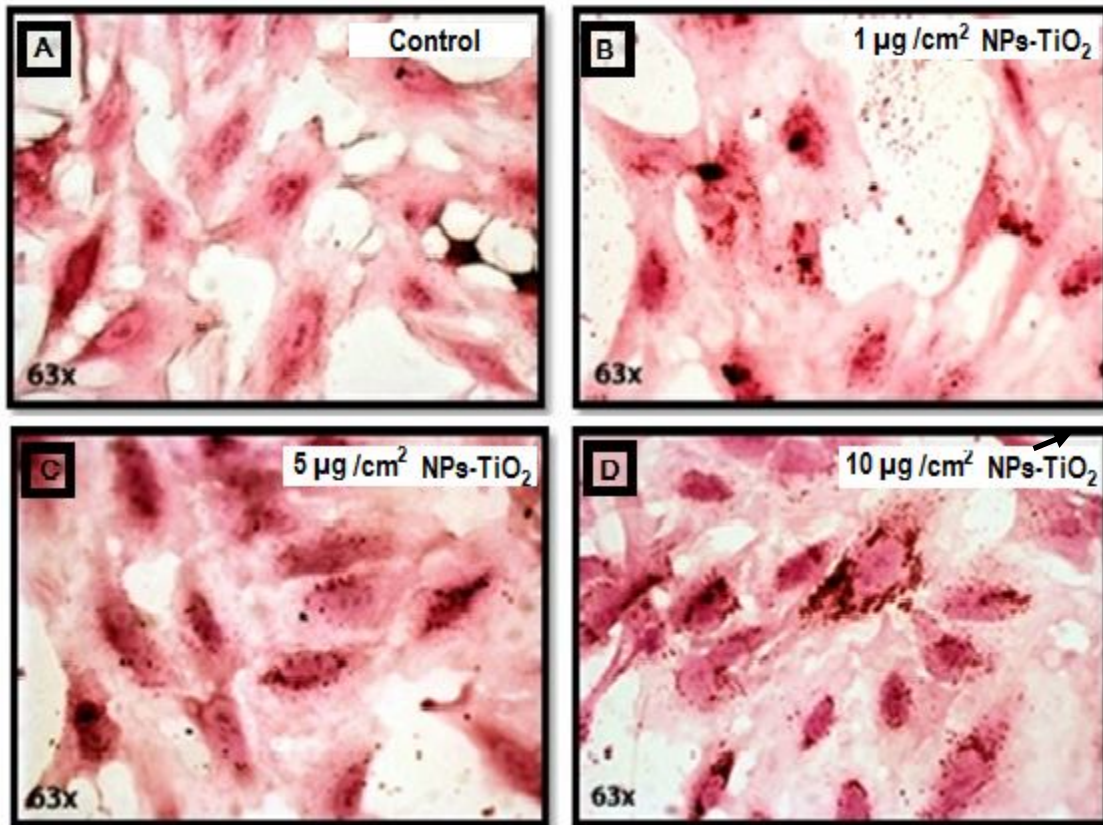


Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión de NPs-TiO<sub>2</sub>, 75000X, 60kV.

### Morfología de neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>

La evaluación en la morfología de los neumocitos no mostró cambios estructurales en ningún tratamiento con NPs-TiO<sub>2</sub>. Sin embargo, debido al contraste generado por la H y E se pudo observar a las NPs-TiO<sub>2</sub> en la periferia del núcleo como puntos negros (Fig.12).

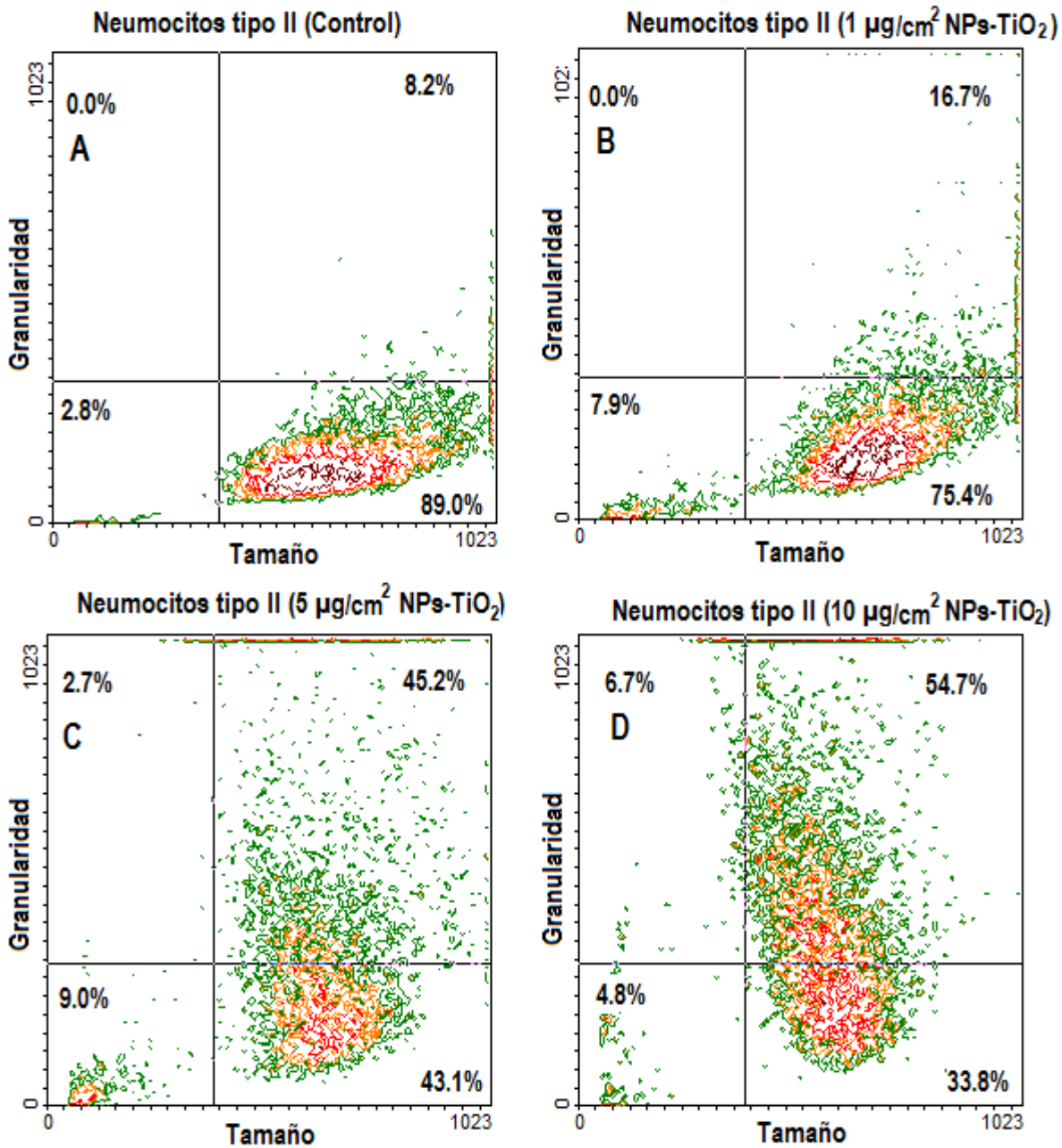


**Figura 12. Fotografía de neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>.** Tinción de hematoxilina y eosina que evidencia la internalización en neumocitos tipo II expuestos durante siete días a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. En la periferia de los núcleos aparecen NPs-TiO<sub>2</sub> internalizadas.

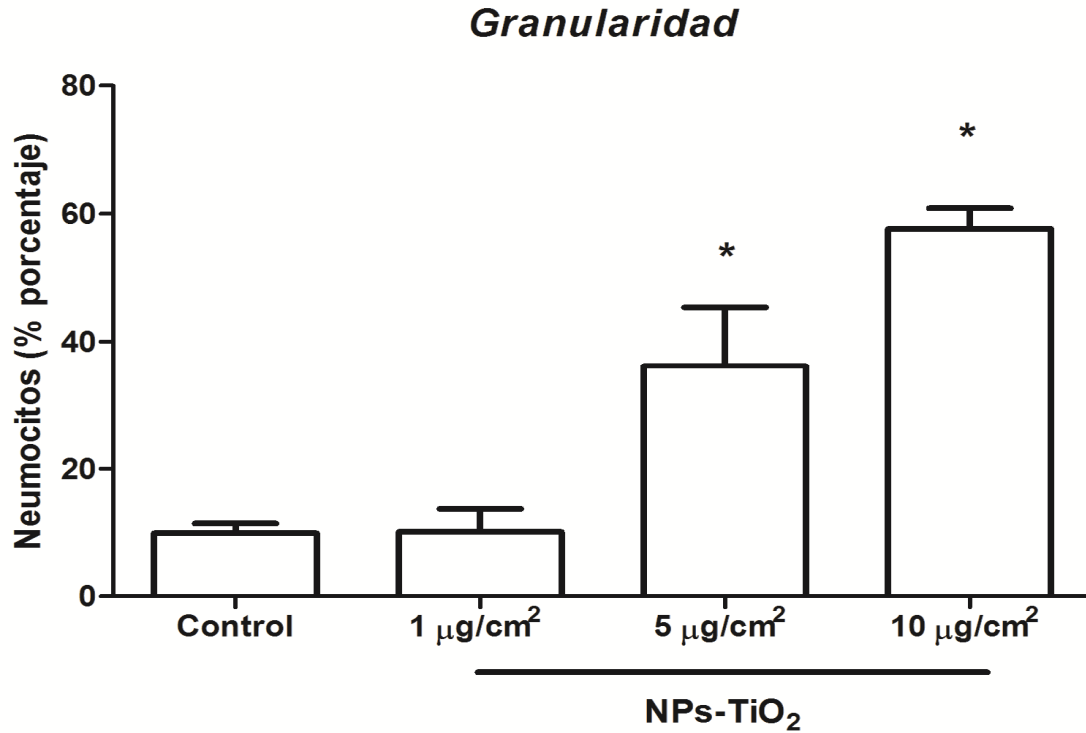
### Captación de NPs-TiO<sub>2</sub>

Los neumocitos expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub> mostraron un incremento en su granularidad de manera concentración dependiente (Fig. 13). En las células control, el 8.5% de la población celular se localizó en el cuadrante 2. Las células que fueron tratadas con 1, 5 y

10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> mostraron que el 10, 36 y 57% respectivamente cayeron en el cuadrante 2 (Fig. 14).



**Figura 13. Captación de NPs-TiO<sub>2</sub> en neumocitos tipo II.** Captación de NPs-TiO<sub>2</sub> por citometría de flujo. Se observa en los paneles B (16.7 %), C (45.2 %) y D (54.7 %) un mayor porcentaje con respecto al panel A de células en el cuadrante 2. Las células localizadas en el cuadrante 2 mostraron un aumento en su granularidad.

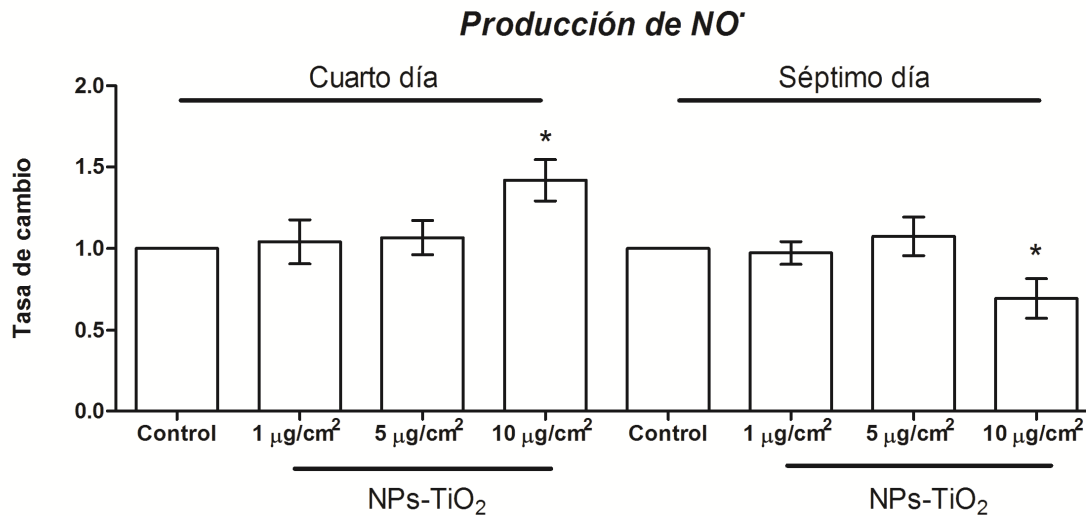


**Figura 14.** Porcentaje de neumocitos tipo II que mostraron un aumento en su granularidad. El incremento de la granularidad de las células es debido a la captación de NPs-TiO<sub>2</sub>. Las células fueron expuestas durante 7 días a distintas concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. La información fue representada con media ± D.E. (n=3). \* Estadísticamente diferente con respecto al control  $p < 0.05$ .

#### **Determinación en la producción de NO<sup>•</sup>**

La concentración de NO<sup>•</sup> producido (Fig. 15) mostró un aumento significativo al cuarto día y una disminución significativa al séptimo día de exposición a NPs-TiO<sub>2</sub>. Se normalizaron las concentraciones de NO<sup>•</sup> con los controles con la finalidad de analizar con mayor facilidad las tasas de cambio.

Durante el cuarto día de exposición el tratamiento de 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvo una tasa de cambio a 1.41 de NO<sup>•</sup>, lo cual mostró ser significativo respecto al control. Los tratamientos de 1 y 5 µg de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron una tasa de cambio a 1.04 y 1.06 de NO<sup>•</sup> respectivamente, esto no fue significativo.



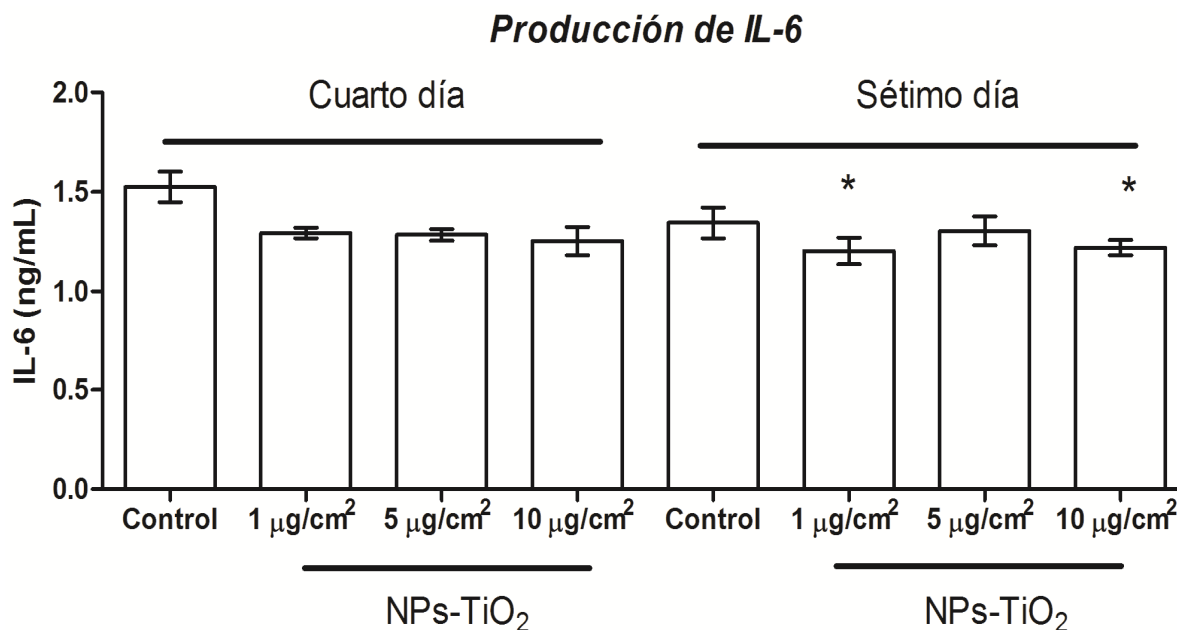
**Figura 15. Tasa de cambio en la producción del NO' en neumocitos tipo II.** Las células fueron expuestas a distintas concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> durante cuatro y siete días. La información fue representada con media ± D.E. (n=6). \* Estadísticamente diferente con respecto al control p < 0.05.

Durante el séptimo día de exposición observamos que el tratamiento de 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvo una tasa de cambio a 0.69, lo cual mostró tener diferencia significativa con respecto al control. Con los tratamientos de 1 y 5 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron una tasa de cambio a 0.97 y 1.07 de NO<sub>2</sub>, por lo que no fue estadísticamente significativo.

#### **Determinación en la producción de IL-6**

Las células expuestas cuatro días a 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron una producción de IL-6 de 1.29, 1.28 y 1.25 ng/ml respectivamente, lo cual no mostró diferencia significativa contra el control que produjo 1.45 ng/ml (Fig. 16).

Durante el séptimo día de exposición, los tratamientos de 1 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> mostraron diferencias significativas contra el control que produjo 1.52 ng/ml. Las células expuestas 7 días a 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> produjeron 1.20, 1.25 y 1.22 ng/ml de IL-6 respectivamente.



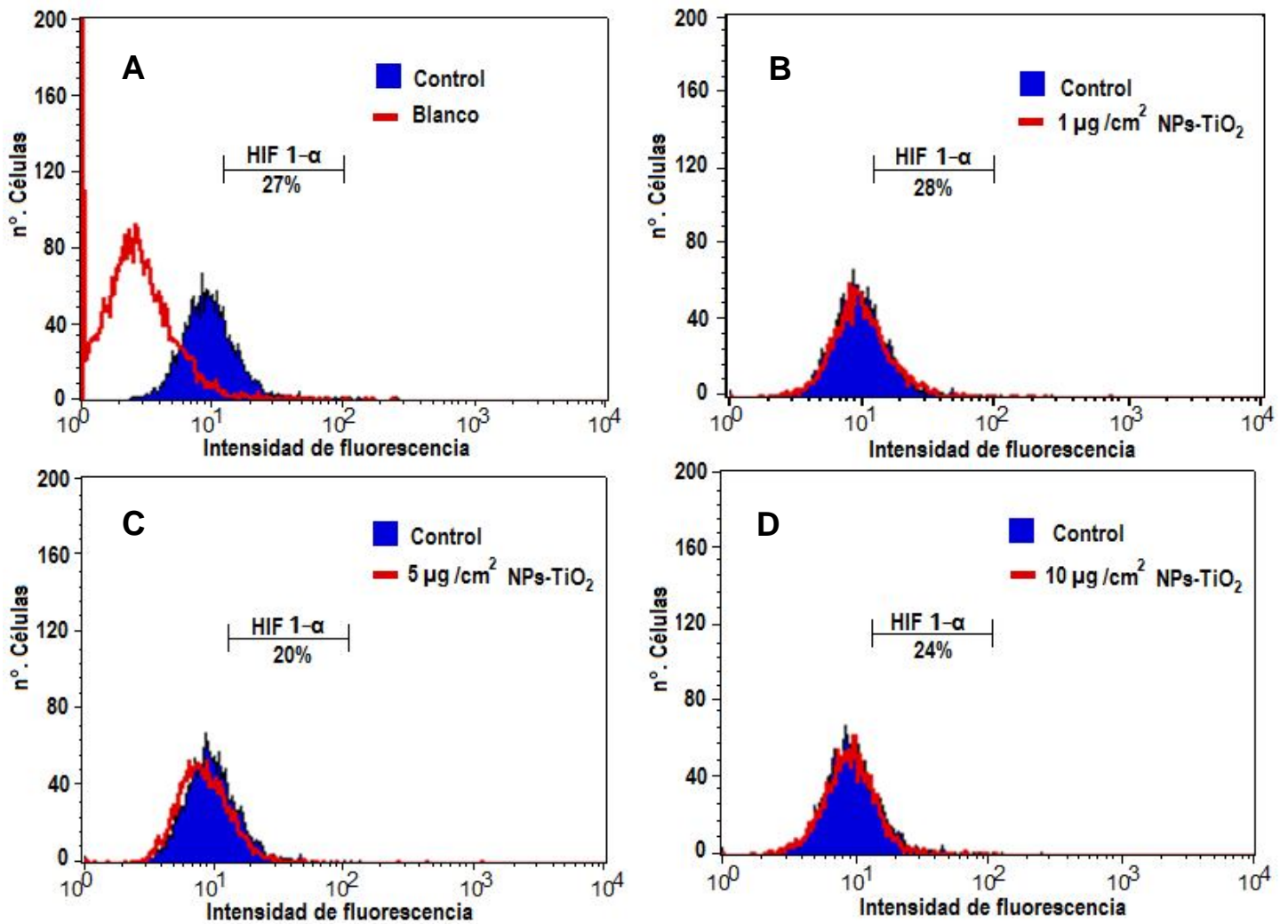
**Figura 16. Concentración de IL-6 producido en neumocitos tipo II.** Las células fueron expuestas durante cuatro y siete días a NPs-TiO<sub>2</sub>. La información fue representada con media ± D.E. (n=5). \* Estadísticamente diferente con respecto al control p < 0.05.

### **Expresión de HIF 1-α por citometría de flujo**

El número de células y la intensidad de fluorescencia en la expresión de HIF1-α no mostraron diferencias significativas, como se muestra en los histogramas de citometría de flujo (Fig. 17).

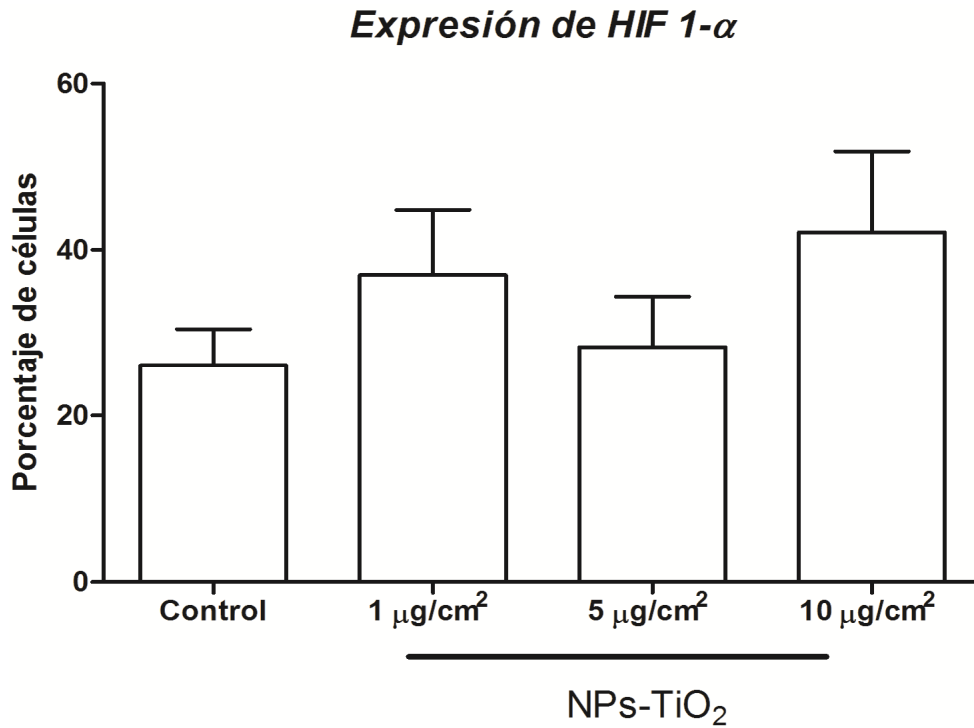
Se realizaron histogramas y se marcaron las zonas que representan el porcentaje de células que expresan HIF1-α, estos porcentajes fueron graficados (Fig. 18). El tratamiento control mostró que el 26% de las células expresaban HIF1-α. Los neumocitos tratados con 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> mostraron que el 37, 28 y 42% de las células expresaban HIF1-α respectivamente.

En cuanto a la intensidad de fluorescencia de HIF1-α en neumocitos tratados con 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron una intensidad de 22, 23 y 23 respectivamente (Fig. 19), lo cual no fue estadísticamente significativo con respecto al control 22.

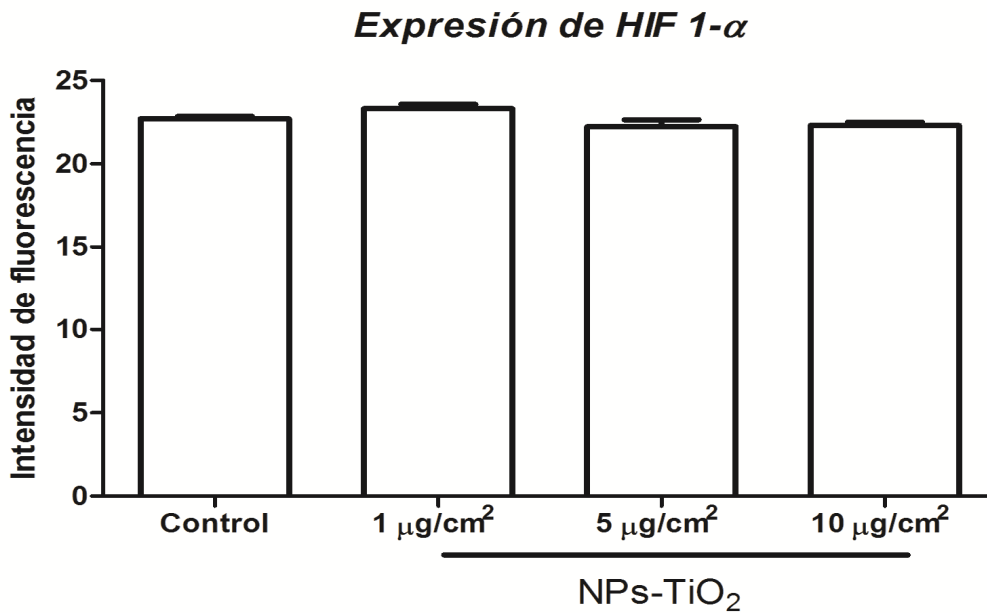


**Figura 17. Expresión de HIF1- $\alpha$  en neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>.** La curva representa la fluorescencia emitida en neumocitos tipo II sin ser expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>. La curva en rojo representa la fluorescencia emitida en neumocitos expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>. En el panel A en rojo se muestra la curva de fluorescencia de neumocitos tipo II blanco (sin fluorescencia). En los paneles B, C y D se observa la curva de fluorescencia en los neumocitos expuestos a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. El área de fluorescencia se representado por la barra (—) esta barra representa la expresión de HIF 1- $\alpha$  (% celular e intensidad de fluorescencia).





**Figura 18.** Expresión de HIF1- $\alpha$  en porcentaje celular de neumocitos tipo II. La información fue representada con media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ). \* Estadísticamente diferente con respecto al control  $p < 0.05$ .



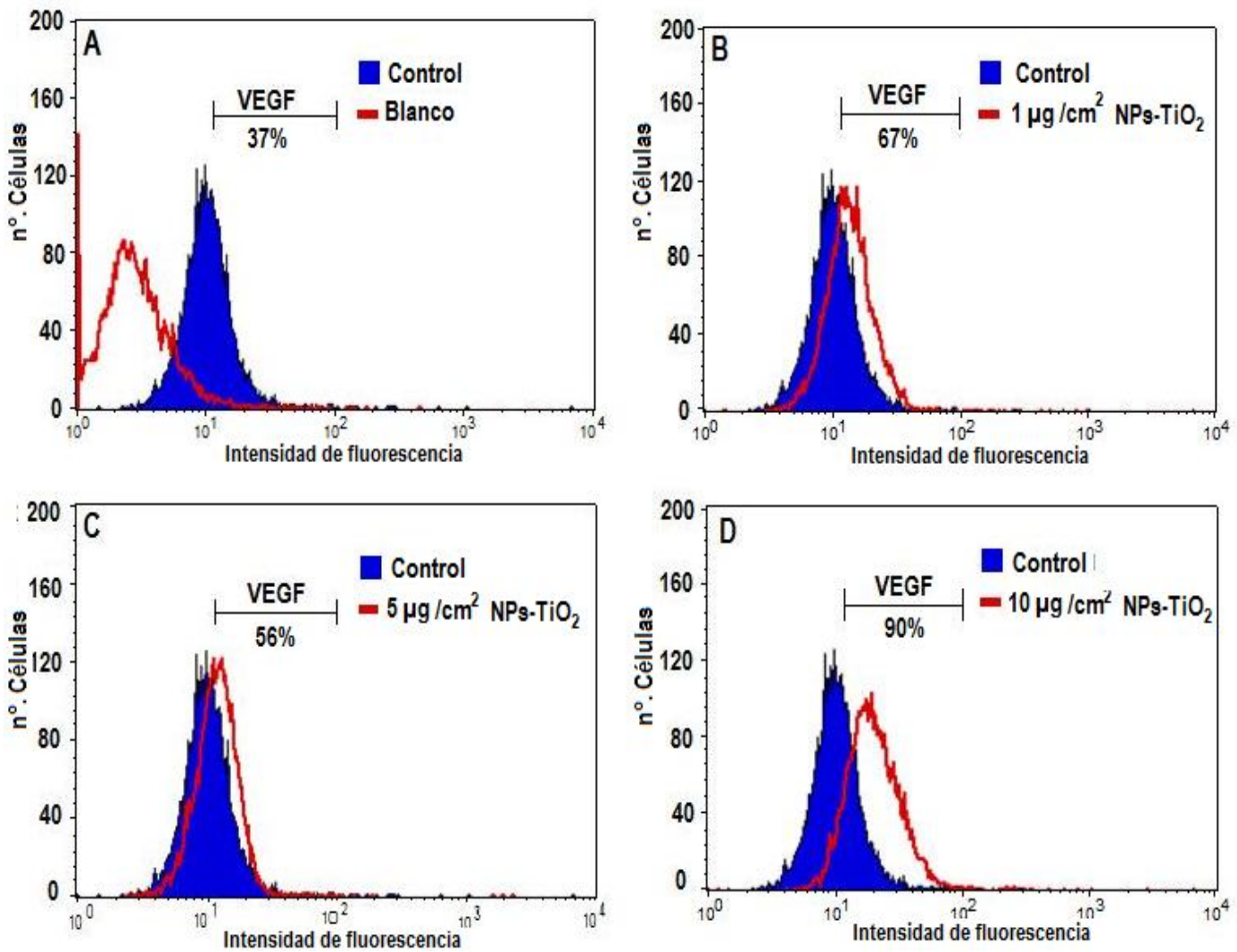
**Figura 19.** Expresión de HIF1- $\alpha$  en intensidad de fluorescencia en neumocitos tipo II. La información fue representada con media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ). \* Estadísticamente diferente con respecto al control  $p < 0.05$ .

### **Expresión de VEGF por citometría de flujo**

En los histogramas de citometría de flujo (Fig. 20) se observó que el tratamiento de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> mostró un aumento significativo en el porcentaje de células que expresaron VEGF.

En las células que no fueron expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub> se observó que el 33% de células expresaban VEGF (Fig. 21). En cambio, los neumocitos que fueron tratados con 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> el 62, 52 y 87% respectivamente expresaron VEGF. El tratamiento de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> fue el único que tuvo un aumento significativo en la expresión de VEGF.

La intensidad de fluorescencia de VEGF (Fig. 22) en las células control fue de 16, en las células tratadas con 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron una intensidad de 16, 17 y 25 respectivamente, lo cual no fue estadísticamente significativo.



**Figura 20. Expresión de VEGF en neumocitos tipo II expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>.** La curva representa la fluorescencia emitida en neumocitos tipo II sin ser expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>. La curva en rojo representa la fluorescencia emitida en neumocitos expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>. En el panel A en rojo se muestra la curva de fluorescencia de neumocitos tipo II blanco (sin fluorescencia). En los paneles B, C y D se observa la curva de fluorescencia en los neumocitos expuestos a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. El área de fluorescencia se representado por la barra (┆) esta barra representa la expresión de VEGF (% celular e intensidad de fluorescencia).

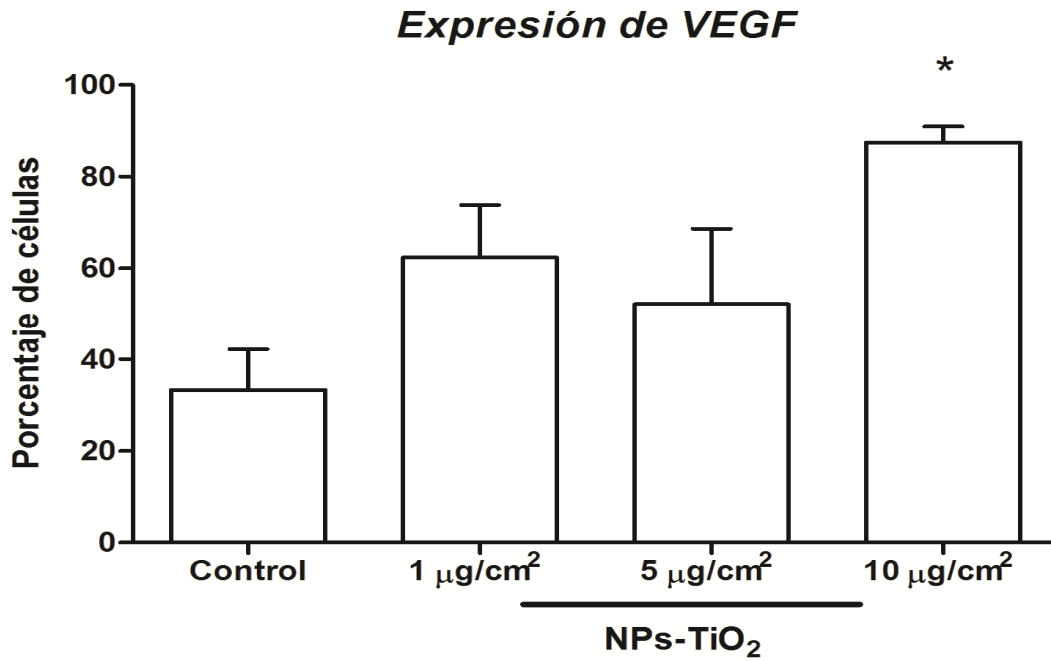


Figura 21. Expresión de VEGF en porcentaje de celular de neumocitos tipo II. La información fue representada con media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ). \* Estadísticamente diferente con respecto al control  $p < 0.05$ .

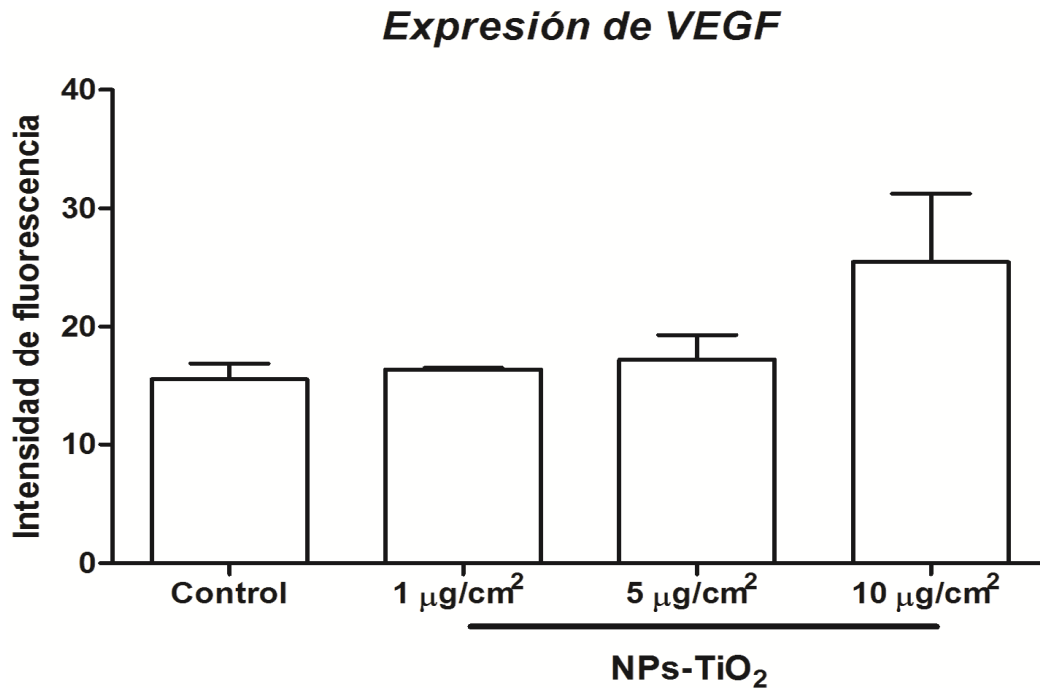


Figura 22. Expresión de VEGF en intensidad de fluorescencia en neumocitos tipo II. La información fue representada con media  $\pm$  D.E. ( $n=3$ ). \* Estadísticamente diferente con respecto al control  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

### ***Caracterización de NPs-TiO<sub>2</sub>***

Antes de realizar estudios toxicológicos de NPs, es necesario que se evalúen algunas de sus propiedades fisicoquímicas como su estructura, pureza, tamaño y distribución en el medio que se esté utilizando. En un estudio donde se expusieron ratas por vía intratraqueal durante 24 h, 1 semana, 1 mes y 3 meses a 1 y 5 mg/kg a dos tipos de NPs-TiO<sub>2</sub> rutilo y anatasa/rutilo 80/20, se observó que la forma combinada de anatasa/rutilo tuvo un mayor efecto inflamatorio y citotóxico que la forma rutilo. Las distintas formas del TiO<sub>2</sub> pueden provocar cambios en los efectos tóxicos (Werheit, 2013), por lo que la falta en la caracterización de las NPs limitaría la significancia de los estudios toxicológicos y a su vez no son comparables o complementarios a otros estudios con similares o idénticos tipos de NPs (Werheit, 2013).

Las NPs-TiO<sub>2</sub> utilizadas en este estudio tenían la forma anatasa, esta forma es la más usada en el mercado, particularmente en aplicaciones catalíticas debido a que es mucho más reactivo que la forma rutilo (Werheit, 2013). Por otro lado, en estudios citotóxicos se ha encontrado que las NPs-TiO<sub>2</sub> en la forma anatasa son 100 veces más tóxicas que su forma equivalente rutilo debido a que estas NPs producen más ROS (Sayes *et al.*, 2006).

En la caracterización de las NPs-TiO<sub>2</sub> usadas en este estudio observamos la formación de agregados. En la literatura se ha reportado que la formación agregados ocurre una vez que las NPs-TiO<sub>2</sub> se han introducido en un medio biológico, lo cual incrementa el tamaño de las NPs usadas en un principio (Bruno *et al.*, 2013). Los efectos que tienen las NPs pueden depender del tamaño de sus agregados, los cuales están influenciados por la fuerza iónica de la solución donde son resuspendidos (Zhang *et al.*, 2012).

Las NPs-TiO<sub>2</sub> con un diámetro de 100 nm pueden formar agregados de > 1,000 nm en soluciones con gran fuerza iónica (PBS) (Zhang *et al.*, 2012). El motivo por el que se forman agregados tan grandes es porque estas soluciones reducen las cargas eléctricas y electrostáticas de repulsión entre las NPs. Se ha visto que las NPs-TiO<sub>2</sub> Degussa 25 resuspendidas en agua destilada pueden formar agregados de 542 nm, en cambio si son

resuspendidas en medio Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) presentan agregados de 3,500 nm (Zhang *et al.*, 2012).

### **Captación de NPs-TiO<sub>2</sub>**

La captación de NPs-TiO<sub>2</sub> se ha observado en distintos tipos de células. Vranic *et al.* (2012) expusieron células de pulmón HCl-H292 a 20 y 40 µg de NPs-TiO<sub>2</sub> y por citometría de flujo observaron que las células incrementaron su granularidad acorde a la concentración de los tratamientos. En células gliales C6 y U373 expuestas a 5 y 20 µg de NPs-TiO<sub>2</sub> aumentaron su granularidad de manera concentración dependiente (Márquez-Ramírez *et al.*, 2013). Estos estudios concuerdan con nuestros resultados, mostrando que las NPs de TiO<sub>2</sub> pueden internalizarse en distintos tipos de células de manera concentración dependiente.

La endocitosis es uno de los procesos que permite el ingreso de material extracelular al interior de las células (Doherty y McMahon, 2008). Se ha visto que la mayoría de las células pueden captar NPs por cuatro mecanismos; macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina y endocitosis independiente de clatrina y caveolina (Treuel *et al.*, 2013). Para activar estos mecanismos de internalización, las NPs interactúan con biomoléculas. Esta interacción se ha observado que es dependiente del medio en que se encuentren (Shemetov *et al.*, 2012).

Las NPs son capaces de interactuar con proteínas, carbohidratos y lípidos, estas biomoléculas forman una capa alrededor de la NP llamada proteína corona. Esta corona se forma antes de que la NP tenga contacto con las membranas celulares. En consecuencia, los receptores de la superficie celular que activan mecanismos de endocitosis, se activan al encontrarse con las biomoléculas que recubren a las NPs provocando su captación (Treuel *et al.*, 2013).

El tipo de interacción que pueda tener una NP con biomoléculas es modulada por sus propiedades fisicoquímicas incluyendo tamaño, forma y área superficial (Shemetov *et al.*, 2012; Treuel *et al.*, 2013). Se ha comparado la afinidad de NPs-TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub> y de carbón con albúmina, fibrinógeno e inmunoglobulinas. Se observó que las NPs de carbón

tienen mayor afinidad a las proteínas evaluadas que las NPs óxido metálicas. Sin embargo, entre las proteínas estudiadas, el fibrinógeno mostró tener la mayor afinidad a las NPs-TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub> y de carbón (Ruh *et al.*, 2012).

La internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> en neumocitos tipo II aún no es clara. Sin embargo, mediante el uso de inhibidores específicos de los mecanismos de endocitosis se ha visto que la principal ruta de captación de NPs-TiO<sub>2</sub> es la endocitosis mediada por clatrina seguido de la endocitosis mediada por caveolina (Cai *et al.*, 2012).

### ***Producción de NO<sup>•</sup>***

Los neumocitos expuestos durante 4 días a 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron un incremento significativo en la producción de NO<sup>•</sup>, este incremento se ha visto en otros tipos de células expuestas a NPs. Xue *et al.* (2012) expusieron células gliales a cuatro distintos tipos de NPs (NPs-SiO<sub>2</sub>, NPs-TiO<sub>2</sub>, NPs-HAP y NPs-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) y demostraron que las NPs-TiO<sub>2</sub> y NPs-hidroxiapatita (HAP) por concentración dependencia afectan significativamente a la expresión en las vías de señalización asociadas con la producción de NO<sup>•</sup>.

En neumocitos se ha demostrado que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub>, provoca un incremento significativo de ROS de manera concentración dependiente y una disminución en los niveles de glutatión (GSH) y catalasa (CAT) (Srivastava *et al.*, 2012). También se ha observado que en células alveolares y en neumocitos tipo I que el estrés oxidante incrementa la expresión de la iNOS (Ricciardolo *et al.*, 2004). En otro estudio Manke *et al.* (2013) observaron que las ROS generadas por las NPs pueden promover la sobreexpresión de MAPK, NFκβ, iNOS y un incremento en la formación de NO<sup>•</sup>.

El incremento en las ROS podría explicar porqué los neumocitos tratados con 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> durante cuatro días tuvieron un incremento significativo en la liberación de NO<sup>•</sup>. Otra explicación es que las ROS pueden activar distintas vías de señalización, las cuales pueden causar una activación de JNK y ERK e inducir la sobreactivación de iNOS (Biswas *et al.*, 2012).

Los neumocitos expuestos durante 7 días a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron una disminución significativa en la producción de NO<sup>•</sup>. Actualmente, no hay estudio que evidencie que las NPs-TiO<sub>2</sub> puedan provocar esta disminución. Sin embargo, encontramos que en distintos estudios se demuestra que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> puede ocasionar una respuesta celular adaptativa para contrarrestar las ROS generadas.

La inducción de Nrf2 genera antioxidantes como una respuesta adaptativa y protectora en respuesta al estrés oxidante de las NPs durante cierto tiempo de exposición. En ratones expuestos intratraquealmente a NPs-TiO<sub>2</sub> se ha observado una gran inducción del factor de transcripción Nrf2. Hemoxigenasa 1 (HO-1) es una enzima antioxidante inducida por Nrf2 y además es un marcador de estrés oxidativo (Sun *et al.*, 2012). También en células de ovario SK-OV3 expuestas a  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  de NPs-Ag se observó que después de seis horas hay una sobreexpresión de Nrf2 y subsecuentemente de HO-1 (Kang *et al.*, 2012), por lo que la inducción de Nrf2 podría disminuir los efectos de las ROS generadas por las NPs-TiO<sub>2</sub>, esto explicaría por qué hubo una disminución en la producción de NO<sup>•</sup> al séptimo día de exposición a NPs.

### ***Producción de IL-6***

La exposición a NPs tiene distintos efectos citotóxicos, por ejemplo, en modelos *in vivo* se ha demostrado que la neurotoxicidad que provoca la exposición a NPs se puede evaluar mediante la determinación en la expresión de citocinas proinflamatorias en el cerebro (Xue *et al.*, 2012). Se ha observado en ratas que la exposición por inhalación a  $50 \text{mg}/\text{m}^3$  de NPs-TiO<sub>2</sub> tiene como consecuencia incremento de neutrófilos y aumento de mediadores proinflamatorios (Shi *et al.*, 2013).

Durante este estudio se observó que no hay cambios significativos en la producción de IL-6 en la neumocitos tipo II expuestos durante cuatro días a 1, 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub>. Este resultado es interesante porque no hay estudios que demuestren que a este tiempo y a estas concentraciones haya cambios en la producción de IL-6. Sin embargo, en otros estudios se demostró que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> provoca en macrófagos THP-1 un incremento en la producción de interleucinas (Morishige *et al.*, 2010).



En ratones administrados por instilación intratraqueal con solo una dosis de 20 y 50 mg/kg de NPs-TiO<sub>2</sub>, se encontró en lavados broqueoalveolares un aumento significativo de manera dosis-dependiente en la producción de las citocinas proinflamatorias de IL-1, IL-6 y del TNF- $\alpha$ . Morishige *et al.* (2010) demostraron que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> en monocitos induce la producción de IL-1 $\beta$ . Gui *et al.* (2011) observaron inflamación nefrítica y un incremento en la expresión de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-18, causado por la exposición a 10 mg/kg de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 90 días por vía intragástrica. Nogueira *et al.* (2012) encontraron en el intestino delgado un incremento significativo en los niveles de IL-12, IL-14, IL-23, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , en ratones BI 57/6 expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub> durante 10 días por vía intragástrica.

Las ROS inducen inflamación y cambios en la producción de interleucinas (Sun *et al.*, 2012). En neumocitos tipo II se ha visto que las ROS inducen la producción de mediadores inflamatorios y citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  (Lee *et al.*, 2012). Sin embargo, observamos que neumocitos tipo II expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> durante siete días tienen una disminución significativa en la producción de IL-6. La sobreexpresión de Nrf2 podría explicar esta disminución debido al posible efecto adaptativo de los neumocitos ante las ROS generadas por las NPs-TiO<sub>2</sub>. Sun *et al.* (2012) observaron que en el día 15 de 90 días de exposición en ratones a 10 mg/kg a NPs-TiO<sub>2</sub> hay una sobreexpresión de Nrf2 y la ausencia de inflamación pulmonar.

### ***Expresión de HIF 1 $\alpha$ - VEGF***

El VEGF actúa principalmente en células endoteliales y tiene un alto impacto en las funciones celulares de las mismas. Sin embargo, se ha descubierto que particularmente en el pulmón la expresión de VEGF participa en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento estructural del pulmón en adultos. En neumocitos tipo II se ha visto que interviene en las vías de señalización de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Voelkel *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha encontrado que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> puede provocar cambios en la expresión de VEGF. En células endoteliales se ha visto que la exposición durante 48 h a 5 y 20  $\mu\text{g}$  de NPs-TiO<sub>2</sub> provoca un aumento significativo en la expresión de VEGF (Móntiel-Dávalos *et al.*, 2012).

En neumocitos tipo II expuestos durante 7 días a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> se registro un aumento significativo en el número de células que expresaron de VEGF. Para explicar este resultado, las ROS producidas por las NPs pueden activar distintos mecanismos de señalización como los factores de transcripción NFκβ y HIF (Yao *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2013). HIF 1-α es capaz de activarse frente al estrés oxidante (Lee *et al.*, 2012), las ROS generadas por las NPs-TiO<sub>2</sub> pueden activarlo. HIF 1-α es responsable de transcribir proteínas necesarias para responder al estrés como eritropoyetina y VEGF (Irwin *et al.*, 2009).

No se registraron cambios en la expresión de HIF 1-α en neumocitos expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>, con estos resultados inferimos que la modulación en la expresión de VEGF en neumocitos tipo II expuestos durante 7 días a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> no es regulada por HIF 1-α. Sin embargo, las vías de señalización que activan las ROS están relacionadas con la transcripción de VEGF como el caso de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), serina/treonina proteína quinasa (AKT), mitogeno-activador proteína quinasa (MAPK), señal activadora y activadores de transcripción-3 (STAT3), receptor controlador de proteína G (GPCR), factor inhibidor de leucemia (LIF). Esta información explicaría que el aumento en el porcentaje de células que expresan, fue debido a que las ROS generadas por las NPs-TiO<sub>2</sub> activaron vías de señalización que no involucran la activación de HIF, pero si otras que directamente activan la transcripción de VEGF. Estos resultados sugieren que es necesario investigar que vías de señalización activan las NPs-TiO<sub>2</sub> y cuáles están relacionadas con la expresión de factores pro-angiogénicos y pro-inflamatorios.

## **CONCLUSIÓN**

### ***Conclusión general***

La concentración subtóxica de  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> es capaz de inducir cambios funcionales en los neumocitos tipo II: aumenta la producción de NO<sup>•</sup>, disminuye la producción de IL-6 y favorece la expresión celular de VEGF.

### ***Conclusiones particulares***

- Las NPs-TiO<sub>2</sub> fueron captadas de manera concentración dependiente por los neumocitos tipo II.
- Los neumocitos tipo II que fueron expuestos durante 4 días a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron un aumento significativo en la producción de NO<sup>•</sup>, sin embargo, al estar expuestos durante 7 días a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub>, tuvieron una disminución significativa en su producción.
- Los neumocitos tipo II expuestos durante 4 días a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub>, no tuvieron un cambio significativo en la producción de IL-6, sin embargo, durante 7 días de exposición a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieron una disminución significativa en la producción de IL-6.
- Los neumocitos tipo II no mostraron cambios significativos en el porcentaje y expresión de HIF después de estar expuestos 7 días a 1, 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub>.
- Los neumocitos tipo II tuvieron un aumento significativo en el porcentaje de células que expresan VEGF tratadas con  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adarmes H, Solís J, Müller A, Galleguillos M. 2009. Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Archivos Medicina Veterinaria* **41**: 255-259.
- Albanese A, Tang P, Chan W. 2011. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*. **14**: 1-16.
- Al-Mehdi AB, Pastukh VM, Swiger BM, Reed DJ, Patel MR, Bardwell GC, Pastukh VV, Alexeyev MF, Gillespie MN. 2012. Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Science signaling*. **5**: 47-58.
- Bekker C, Brouwer D, Tielemans E, Pronk A. 2013. Industrial production and professional application of manufactured nanomaterials-enabled end products in Dutch industries: potential for exposure. *The Annals of occupational hygiene*. **57**: 314-327.
- Bergin I, Witzmann F. 2013. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *International journal biomedical nanoscience and nanotechnology* **1**: 1-41.
- Biswas N, Mahato SK, Chowdhury AA, Chaudhuri J, Manna A, Vinayagam J, Chatterjee S, Jaisankar P, Chaudhuri U, Bandyopadhyay S. 2012. ICB3E induces iNOS expression by ROS-dependent JNK and ERK activation for apoptosis of leukemic cells. *Apoptosis*. **17**: 612-626.
- Bruno M, Tasat D, Ramos E, Paparella M, Evelson P, Rebagliati R, Cabrini R, Guglielmotti M, Olmedo D. 2013. Impact through time of different sized titanium dioxide particles on biochemical and histopathological parameters. *Journal of biomedical materials research. Part A*.
- Buzea C, Pacheco I, Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. **2**: 7-71.
- Calzolari L, Gilliland D, Rossi F. 2012. Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. **29**: 1183-1193.
- Cai K, Hou Y, Hu Y, Zhao L, Luo Z, Shi Y, Lai M, Yang W, Liu P. 2011. Correlation of the cytotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with different particle sizes on a sub-200-nm scale. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **7**: 3026-3031.

- Carter J, Driscoll K. 2001. The role of inflammation, oxidative stress, and proliferation in silica-induced lung disease: a species comparison. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. **20**: 33-43.
- Chetty C, Lakka S, Bhoopathi P, Rao J. 2010. MMP-2 alters VEGF expression via  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. *International Journal of Cancer*. **127**: 1081-1095.
- Choi YC, Yoon S, Jeong Y, Yoon J, Baek K. 2011. Regulation of vascular endothelial growth factor signaling by miR-200b. *Molecular cells*. **32**: 77-82.
- Doherty G, McMahon H. 2008. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*. **78**: 857-902.
- Du J, Xu R, Hu Z, Tian Y, Zhu Y, Gu L, Zhou L. 2011. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  expression in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*. **6**: 25213-25212.
- Fadeel B, Garcia-Bennett A. 2010. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*. **62**: 362-74.
- Fenoglio I, Ponti J, Alloa E, Ghiazza M, Corazzari I, Capomaccio R, Rembges D, Oliaro-Bosso S, Rossi F. 2013. Singlet oxygen plays a key role in the toxicity and DNA damage caused by nanometric TiO<sub>2</sub> in human keratinocytes. *Nanoscale*. **5**: 6567-6576.
- Fries R, Smikó. 2012. (Nano-)Titanium dioxide (Part I): Basic, Production, Applications. *Nano trust dossier*. **33**: 1-4.
- Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK, Blot WJ. 2003. A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *J Environment Medical*. **45**: 400-409.
- Gelb A, Barnes P, George S, Ricciardolo F, DiMaria G, Zamel N. 2012. Review of exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of breath research*. **6**: 047101.
- Gui S, Zhang Z, Zheng L, Cui Y, Liu X, Li N, Sang X, Sun Q, Gao G, Cheng Z. 2011. Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal Hazard Material*. **195**: 365-370.

- Hendren C, Mesnard X, Dröge J, Wiesner M. 2011. Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment. *Environmental science & technology*. **45**: 2562-2569.
- Hubbs A, Mercer R, Benkovic S, Harkema J, Sriram K, Schwegler-Berry D, Goravanahally M, Nurkiewicz T, Castranova V, Sargent L. 2011. Nanotoxicology--a pathologist's perspective. *Toxicologic pathology*. **39**: 301-324.
- Hubbs A, Sargent L, Porter D, Sager T, Chen B, Frazer D, Castranova V, Sriram K, Nurkiewicz T, Reynolds S, Battelli L, Schwegler-Berry D, McKinney W, Fluharty K, Mercer R. 2013. Nanotechnology: toxicologic pathology. *Toxicologic pathology*. **41**: 395-409.
- Husain M, Saber A, Guo C, Jacobsen N, Jensen K, Yauk C, Williams A, Vogel U, Wallin H, Halappanavar S. 2013. Pulmonary instillation of low doses of titanium dioxide nanoparticles in mice leads to particle retention and gene expression changes in the absence of inflammation. *Toxicology and applied pharmacology*. **269**: 250-262.
- IARC. Titanium dioxide Group 2B. vols.9. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon: World Health Organization; 2010.
- Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Bergamaschi A. 2011. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles; a review of *in vitro* mammalian studies. *European review for medical and pharmacological sciences*. **15**: 481-508.
- Irwin D, McCord J, Nozik-Grayck E, Beckly G, Foreman B, Sullivan T, White M, Crossno J, Bailey D, Flores S, Majka S, Klemm D, van Patot M. 2009. A potential role for reactive oxygen species and the HIF-1 $\alpha$ -VEGF pathway in hypoxia-induced pulmonary vascular leak. *Free radical biology & medicine*. **47**: 55-61.
- Lai DY. 2012. Toward toxicity testing of nanomaterials in the 21st century: a paradigm for moving forward. *Wiley Interdisciplinary reviews: Nanomedicine Nanobiotechnology*. **4**: 1-15.
- Lee I-T, Yang C-M. 2012. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical pharmacology*. **84**: 581-590.
- Li J, Muralikrishnan S, Ng C-T, Yung L-YL, Bay B-H. 2010. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. **235**: 1025-1033.
- Liao C-M, Chiang Y-H, Chio C-P. 2008. Model-based assessment for human inhalation exposure risk to airborne nano/fine titanium dioxide particles. *The Science of the total environment*. **407**: 165-177.

- Liu W, Xu J, Wang M, Wang Q, Bi Y, Han M. 2011. Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-a facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway. *International journal of oncology*. **39**:1213-1220.
- Mahmoudi, M.; Azadmanesh, K.; Shokrgozar, M.; Journeay, W.; Laurent, S. 2011, Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chemical reviews*. **111**: 3407-3432.
- Manke A, Wang L, Rojasasakul Y. 2012. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*. **201**: 942916.
- Márquez-Ramírez S, Delgado-Buenrostro N, Chirino Y, Iglesias G, López-Marure R. 2012. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology*.. **302**: 146-156.
- Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, Walke J, Sarmiento X, Guardiola J, Saad M, Jerry Yu. 2009. Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of inflammation research*. **2** 1-11.
- Montiel-Dávalos A, Ventura-Gallegos J, Alfaro-Moreno E, Soria-Castro E, García-Latorre E, Cabañas-Moreno J, del Pilar Ramos-Godinez M, López-Marure R. 2012. TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. *Chemical research in toxicology*. **25**: 920-930.
- Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S-I, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. 2010. Titanium dioxide induces different levels of IL-1beta production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. *Biochemical and biophysical research communications*. **392**: 160-165.
- Nano werk. 2013. Disponible en: [http://www.nanowerk.com/nanotechnology/research/nanotechnology\\_links.php](http://www.nanowerk.com/nanotechnology/research/nanotechnology_links.php)
- National Nanotechnology Initiative. 2012. Disponible en: <http://www.nano.gov/nanotech-101/special>
- Nogueira C, de Azevedo W, Dagli M, Toma S, Leite A, Lordello M, Nishitokukado I, Ortiz-Agostinho C, Duarte M, Ferreira M, Sipahi A. 2012. Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World journal of gastroenterology*. **18**: 4729-4735.
- Ono M. 2008. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer science*. **99**: 1501-1506.

- Pan Z, Lee W, Slutsky L, Clark R, Pernodet N, Rafailovich M. 2009. Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. **5**: 511-520.
- Park E-J, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. 2009. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology*. **260**: 37-46.
- Rahman, B. Mulier, P.S. Gilmour, T. Watchorn, K. Donaldson, P.K. Jeffery, W. MacNee. 2001. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance: the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. *Biochemical pharmacology*. **62**: 787-794.
- Ramos-Godínez MDP, González-Gómez B, Montiel-Dávalos A, López-Marure R, Alfaro-Moreno E. 2013. TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce endothelial cell activation in a pneumocyte-endothelial co-culture model. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. **27**: 774-781.
- Ricciardolo F, Sterk P, Gaston B, Folkerts G. 2004. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiological reviews*. **84**: 731-765.
- Robichaud C, Uyar A, Darby M, Zucker L, Wiesner M. 2009. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment. *Environmental science & technology*. **43**: 4227-4233.
- Roursgaard M, Jensen K, Poulsen S, Jensen N-EV, Poulsen L, Hammer M, Nielsen G, Larsen S. 2010. Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice. *The scientific world journal*. **11**: 801-825.
- Ruh H, Kühn B, Brenner-Weiss G, Hopf C, Diabaté S, Weiss C. 2012. Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicology Letters*. **208**: 41-50.
- Sayes C, Wahi R, Kurian P, Liu Y, West J, Ausman K, Warheit D, Colvin V. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. **92**: 174-185.
- Shemetov AA, Nabiev I, Sukhanova A. 2012. Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles. *ACS Nano*. **6**: 4585-4602.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. 2012. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology* **10**: 15- 37.



- Shubbar E, Vegfors J, Carlström M, Petersson S, Enerbäck C. 2011. Psoriasin (S100A7) increases the expression of ROS and VEGF and acts through range to promote endothelial cell proliferation. *Breast cancer research treatment*. **134**: 71-80.
- Shukla R, Sharma V, Pandey A, Singh S, Sultana S, Dhawan A. 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. **25**: 231-241.
- Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. 2011. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiology and oncology*. **45**: 227-247.
- Srivastava R, Rahman Q, Kashyap M, Singh A, Jain G, Jahan S, Lohani M, Lantow M, Pant A. 2013. Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Human & experimental toxicology*. **32**: 153-166.
- Stone V, Nowack B, Baun A, van den Brink N, Kammer F, Dusinska M, Handy R, Hankin S, Hassellöv M, Joner E, Fernandes T. 2010. Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *The Science of the total environment*. **408**: 1745-1754.
- Sun Q, Tan D, Zhou Q, Liu X, Cheng Z, Liu G, Zhu M, Sang X, Gui S, Cheng J, Hu R, Tang M, Hong F. 2012. Oxidative damage of lung and its protective mechanism in mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **100A**.
- Sun Q, Tan D, Ze Y, Sang X, Liu X, Gui S, Cheng Z, Cheng J, Hu R, Gao G, Liu G, Zhu M, Zhao X, Sheng L, Wang L, Tang M, Hong F. 2012. Pulmotoxicological effects caused by long-term titanium dioxide nanoparticles exposure in mice. *Journal of hazardous materials*. **235-236**: 47-53.
- Tedja R, Marquis C, Lim M, Amal R. 2011. Biological impacts of TiO<sub>2</sub> on human lung cell lines A549 and H1299: particle size distribution effects. *Journal of Nanoparticle Research*. **13**: 3801-3813.
- Teow Y, Asharani P, Hande M, Valiyaveetil S. 2011. Health impact and safety of engineered nanomaterials. *Chemical communications (Cambridge, England.)* **47**: 7025-7038.
- Treuel L, Jiang X, Nienhaus G. 2013. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **10**: 20120939

- Vranic S, Boggetto N, Contremoulins V, Mornet S, Reinhardt N, Marano F, Baeza-Squiban A, Boland S. 2012. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Particle and fibre toxicology*. **10**: 2.
- Wan R, Mo Y, Feng L, Chien S, Tollerud D, Zhang Q. 2012. DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM. *Chemical research in toxicology*. **25**: 1402-11.
- Warheit D, Webb T, Reed K, Frerich S, Sayes C. 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology*. **230**: 90-104.
- Warheit D. 2013. How to measure hazards/risks following exposures to nanoscale or pigment-grade titanium dioxide particles. *Toxicology letters*. **220**: 193-204.
- Xue Y, Wu J, Sun J. 2012. Four types of inorganic nanoparticles stimulate the inflammatory reaction in brain microglia and damage neurons in vitro. *Toxicology Letters*. **214**: 91-98.
- Yao, H., Yang, S. R., Kode, A., Rajendrasozhan, S., Caito, S., Adenuga, D., Henry, R., Edirisinghe, I., and Rahman, I. 2007. Redox regulation of lung inflammation: role of NADPH oxidase and NF-kappaB signalling. *Biochemical Society*. **35**: 1151-1155.
- Yamadori I, Ohsumi S, Taguchi K. 1986. Titanium dioxide deposition and adenocarcinoma of the lung. *Acta pathologica japonica*. **36**: 783-790.
- Zhang R, Bai Y, Zhang B, Chen L, Yan B. 2012. The potential health risk of titania nanoparticles. *Journal of hazardous materials*. **211-212**: 404-413.
- Zhao J, Bowman L, Zhang X, Vallyathan V, Young S-H, Castranova V, Ding M. 2009. Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) Nanoparticles Induce JB6 Cell Apoptosis Through Activation of the Caspase-8/Bid and Mitochondrial Pathways. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. **72**: 1141-1149.