



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LA EXPOSICIÓN A NANOCINTAS DE DIÓXIDO DE TITANIO
INHIBE LA LIBERACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS Y
PROMUEVE LA FASE G2/M DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS
PULMONARES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ESTEFANY INGRID MEDINA REYES

DIRECTOR DE TESIS:

YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2015



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.

DEDICATORIA

Todas las personas que en esta dedicatoria aparecen han formado parte importante para ser quien soy ahora. Me han hecho crecer y han dejado algo de ellas en mí, porque la persona que ahora escribe, es el rompecabezas armado con cada una de las piezas que ustedes han puesto en él.

A mi abuela, es decir, a mi mamá Lucy y a mi tía Alejandra. Esta tesis es el resultado de mucho esfuerzo de las dos, de educación, valores y dedicación puestos en mí, porque nunca me han dejado sola, siempre están ahí, a un lado. Son y serán siempre mis dos mejores apoyos, los motores que hacen avanzar este barco y los timones de este viaje. Sin ustedes dos yo no estaría en este lugar: escribiendo una tesis de licenciatura. Gracias mamá, gracias tía, por siempre estar conmigo, por darme fuerza y por ser mi máximo ejemplo de incansable lucha, de sensibilidad, de vida.

A mis padres, Susana y Ricardo, por aconsejarme y ayudarme en lo que han podido. A mi hermano Javier, y a mi primo Jorge porque son mis principales motivos, mis dos grandes alegrías. Porque sus sonrisas hacen mejores mis días y con esta tesis quiero ponerles el ejemplo de que, pese a todo, si te propones las cosas las puedes hacer. *“Dar el ejemplo no es la principal manera de influir sobre los demás; es la única”*. Albert Schweitzer, Premio Nobel de la Paz en 1952.

A mis tíos, porque han creído en mí, me han apoyado y eso me impulsa. Aquí está el resultado de todas sus aportaciones.

A Axel, mi mejor amigo, mi mejor ejemplo de que a la vida...hay que sonreírle. Gracias Axel, porque tus palabras cada día me acompañan, por el gran sentido que le pusiste a mi vida, porque en cada paso que doy estas ahí para aconsejarme, para avivarme. Tu presencia me hace perder muchos miedos. Y es que me acompañaste cuando más lo necesitaba y me dejaste justo cuando sabía por dónde ir. Espero el momento en que nos volvamos a encontrar porque *“La amistad nace en tres soles y una Luna, y permanece a través de los mundos, no tengas miedo, somos libres, nadie lo cree, pero es real”*.

A mis amigas, Montse, Pamela y Melissa, por darme las alegrías y risas que me dan, las palabras de aliento, las muestras de admiración, por su cariño, sus buenas vibras y sus consejos en cada tropiezo. Me siento afortunada porque, en este mundo, pocos entenderán la amistad con el matiz que nosotros le damos. Gracias también a mi Charlitos y a toto, por la confianza, los buenos momentos, los secretos y ¡las fiestas! Sin cada uno de esos momentos con ustedes el camino sería muy cansado, aburrido y los viernes no tendrían espíritu. *“Tengo amigos para saber quién soy. Pues viéndolos locos y santos, tontos y serios, niños y viejos, nunca me olvidaré que la normalidad es una ilusión imbecil”*. Oscar Wilde.

A mi tutora, la Dra. Irasema, por creer en mí, por todo su tiempo y esfuerzo para quitarme lo cavernícola (aún no terminamos). Doctora, muchas gracias porque más que una tutora, ha sido mi amiga, consejera, quien me impulsa y me abre los horizontes no solo para ser mejor cada día en la ciencia, sino en la vida. Usted también es uno de mis mejores ejemplos de alegría y de que a la vida hay que mirarla de frente y sin miedo. Sin usted andaría vagando en las inmensidades de la biología y no tendría la visión que ahora tengo. Agradezco y valoro tanto que nuestros caminos hayan coincidido. *“Contra el optimismo (que usted tiene) no hay vacunas”* Mario Benedetti.

A la Dra. Norma por todo su apoyo desde que llegué al laboratorio, por su cariño, sus galletas y chocolates que me han mantenido despierta en cada experimento. Doctora, muchas gracias por todas sus palabras de aliento y admiración, por sus enseñanzas, por su amistad y su paciencia.

A mis amigos del laboratorio, porque han hecho más alborozado el día a día en el lab, por su ayuda en cada duda y apoyo. Gracias además, por todos los buenos momentos fuera del lab (es ahí

cuando mejor se analizan los resultados...ajá). También por soportarme mis ratos de mal humor y por, pese a todo, ser mis amiguitos.

Solo quiero agregar, que mientras yo escribía esta tesis, en el mes de septiembre del 2014, 43 estudiantes de la escuela normal rural "Raúl Isidro Burgos" de Ayotzinapa, Guerrero., fueron desaparecidos y 6 más fueron asesinados por narcotraficantes coludidos con la policía municipal y seguramente federal. ¿Por qué? Porque sí, porque por ser estudiantes, eran amenaza. A ellos dedico esta tesis como un acto revolucionario, porque pese a todo lo que pasa en mi país hoy en día (narcotráfico, mala economía, caída en el precio del petróleo, saqueo del país por parte del gobierno, corrupción y por si fuera poco...desinterés social) hay quienes seguimos creyendo firmemente que la educación es la mejor herramienta. Sé que la balanza no se inclinará a nuestro favor, pero al menos no favoreceré el lado de quien daña al país. "*Si no eres parte de la solución, eres parte del problema*". Vladimir Ilich Uliánov "Lenin".

Memorándum

Uno llegar e incorporarse el día

Dos respirar para subir la cuesta

Tres no jugarse en una sola apuesta

Cuatro escapar de la melancolía

Cinco aprender la nueva geografía

Seis no quedarse nunca sin la siesta

Siete el futuro no será una fiesta

Y ocho no amilanarse todavía

Nueve vaya a saber quién es el fuerte

Diez no dejar que la paciencia ceda

Once cuidarse de la buena suerte

Doce guardar la última moneda

Trece no tutearse con la muerte

Catorce disfrutar mientras se pueda.

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-166727) y a la beca de ayudante de investigador (Exp. Inv. 4384; Exp. Ayte. 9225) emitida por la misma institución.

Agradezco la ayuda al Dr. José Ocotlán Flores Flores y al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE), en el CCADET-UNAM por la ayuda en el proceso de síntesis del $\text{TiO}_2\text{-C}$, la espectrofotometría de rayos Raman, y la microscopía electrónica de barrido.

Gracias a la M. en C. Verónica Freyre Fonseca por proporcionarnos la caracterización del $\text{TiO}_2\text{-C}$ y la microscopía electrónica de transmisión.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 Nanotecnología, nanomateriales y nanopartículas.....	- 1 -
1.1.1 Dióxido de titanio	- 2 -
1.1.2 Cristalinidad y geometría del TiO ₂ NPs	- 2 -
1.1.2.1 Determinación de la cristalinidad y geometría del TiO ₂ NPs.....	- 5 -
1.1.3 Vías de exposición.....	- 6 -
1.1.4 Clasificación del TiO ₂ con base en su toxicidad	- 8 -
1.1.4.1 La exposición al TiO ₂ NPs como factor de riesgo en el desarrollo del cáncer pulmonar	- 8 -
1.1.5 Toxicidad causada por la exposición al TiO ₂ NPs	- 10 -
1.1.5.1 Toxicidad del TiO ₂ -E in vitro	- 12 -
1.1.5.2 Toxicidad del TiO ₂ -E in vivo.....	- 13 -
1.1.5.3 Estudios epidemiológicos	- 14 -
1.1.5.4 Toxicidad del TiO ₂ -C in vitro	- 14 -
1.1.5.5 Toxicidad del TiO ₂ -C in vivo.....	- 15 -
1.1.5.6 Mecanismos celulares de toxicidad no descritos	- 16 -
1.1.5.6.1 Producción de citocinas	- 16 -
1.1.5.6.2 Ciclo celular	- 17 -
2. HIPÓTESIS	- 19 -
3. OBJETIVO GENERAL	- 19 -
3.1 Objetivos particulares	- 19 -
4. JUSTIFICACIÓN	- 20 -
5. MATERIALES Y MÉTODOS	- 21 -
5.1 Síntesis de TiO ₂ -C	- 21 -
5.2 Caracterización de las NPs.....	- 21 -
5.3 Cultivo celular y exposición al TiO ₂ -C	- 21 -
5.4 Morfología celular	- 22 -

5.5 Reducción de MTT.....	- 22 -
5.6 Recubrimiento del TiO ₂ -C	- 23 -
5.7 Internalización del TiO ₂ -C	- 23 -
5.8 Cuantificación de nitritos y nitratos.....	- 24 -
5.9 Cuantificación de la producción de citocinas.....	- 24 -
5.10 Progresión del ciclo celular	- 24 -
5.11 Análisis estadísticos.....	- 25 -
6. RESULTADOS	- 26 -
6.1 Caracterización del TiO ₂ -C.....	- 26 -
6.2 Morfología celular	- 27 -
6.3 Reducción de MTT.....	- 28 -
6.4 Interacción del TiO ₂ -C con el colorante Rojo de Alizarina S (ARS)	- 29 -
6.5 Internalización del TiO ₂ -C por microscopía confocal	- 30 -
6.7 Cuantificación de NO _x	- 32 -
6.8 Producción de citocinas	- 33 -
6.9 Progresión del ciclo celular	- 36 -
6.10 Correlación entre la liberación de citocinas y la reducción de MTT	- 38 -
7. DISCUSIÓN.....	- 39 -
8. CONCLUSIONES.....	- 46 -
9. PERSPECTIVAS	- 47 -
10. REFERENCIAS	- 48 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Roca Ilmenita ($\text{Fe}^{2+}\text{TiO}_3$)

Figura 2. Estructura de Rutilo y Anatasa

Figura 3. Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer a nivel mundial en ambos sexos

Figura 4. Diferentes formas de internalizar las NPs

Figura 5. Ciclo celular

Figura 6. Caracterización del dióxido de titanio en forma de nanocintas ($\text{TiO}_2\text{-C}$)

Figura 7. Morfología celular por tinción con hematoxilina y eosina

Figura 8. Reducción de MTT

Figura 9. Recubrimiento del $\text{TiO}_2\text{-C}$ con el colorante Rojo de Alizarina S (ARS)

Figura 10. Internalización del $\text{TiO}_2\text{-C}$ por microscopía confocal y contraste interdifereencial

Figura 11. Internalización del $\text{TiO}_2\text{-C}$ por citometría de flujo

Figura 12. Cuantificación de NO_x por reacción de Griess

Figura 13. Cuantificación de la producción de citocinas IL-2 y GM-CSF

Figura 14. Cuantificación de la producción de citocinas IL-6, TNF- α y IFN- γ

Figura 15. Cuantificación de la producción de citocinas IL-4, IL-8, IL-10

Figura 16. Progresión del ciclo celular

Figura 17. Correlaciones representativas entre los efectos causados por la exposición al $\text{TiO}_2\text{-C}$

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características principales de la roca Ilmenita, fuente principal del TiO_2 NPs

Tabla 2. Caracterización del $\text{TiO}_2\text{-C}$

Tabla 3. Correlación entre la producción de citocinas y la reducción de MTT al séptimo día de exposición

LISTA DE ABREVIACIONES

A549 Células epiteliales de pulmón, neumocitos tipo II

ATCC Del inglés American Type Culture Collection: Colección Americana de Cultivos

ARS Rojo de Alizarina S

BAL Lavado bronquioalveolar

DSB Del inglés Double Strand Brake: Ruptura: Ruptura de doble cadena del DNA

DLS Del inglés Dispersion Light Scattering: Dispersión de luz

ELISA Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

EPA Del inglés Environmental Protection Agency: Agencia de protección ambiental

F12K Medio de cultivo Ham's F12K (Kaighn's)

FSC Del inglés Forward scatter: luz dispersada hacia adelante

GM-CSF Factor de crecimiento de colonias de macrófagos y granulocitos

IARC Del inglés International Agency for Research on Cancer: Agencia Internacional de Investigación para el cáncer

IFN- γ Interferón gamma

IL Interleucina

iNOs Óxido nítrico sintasa inducible

LDH Lactato deshidrogenasa

NIOSH Del inglés National Institute of Occupational Safety and Health: Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional

NO Óxido nítrico

NO_x Nitritos y nitratos

NP Nanopartícula

NPs Nanopartículas

PBS Solución buffer fosfato

ROS Especies reactivas de oxígeno

SEM Microscopía electrónica de barrido

SSB Del inglés Single Strand Brake: Ruptura de una cadena del DNA

SSC Del inglés Side Scatter: Luz dispersada de lado

SFB Suero fetal bovino

TiO₂ Dióxido de titanio

TiO₂-E Dióxido de titanio en forma de esferas

TiO₂-C Dióxido de titanio en forma de cintas

TEM Microscopía electrónica de transmisión

TGF- β Factor de crecimiento tumoral

TNF- α Factor de necrosis tumoral

UV Radiación ultravioleta

RESUMEN

El dióxido de titanio en forma de nanopartículas (TiO_2 NPs), es uno de los nanomateriales más producidos a nivel mundial. El ser humano está expuesto a este nanomaterial por vía oral (alimentos), dérmica (productos cosméticos) e inhalatoria (ambientes ocupacionales). El Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional ha clasificado al TiO_2 como potencial carcinógeno ocupacional y a la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer lo clasificó en el grupo 2B, como un posible carcinógeno para humanos cuando se está expuesto por vía inhalatoria. Recientemente se ha sintetizado el TiO_2 en forma de nanocintas (TiO_2 -C) que aparentemente induce toxicidad similar a la de los asbestos, pero aún faltan estudios que describan la toxicidad del TiO_2 -C. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de células epitelio-pulmonares (A549) expuestas a TiO_2 -C para internalizarlo, evaluar cambios en el tamaño celular, granularidad, viabilidad celular, producción de óxido nítrico, citocinas inflamatorias y cambios en el ciclo celular.

El TiO_2 -C fue sintetizado mediante un proceso hidrotérmico y posteriormente las células A549 fueron expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 7 días. El TiO_2 -C se recubrió con el colorante Rojo de Alizarina S (ARS) y se evaluó por microscopía confocal la capacidad de las células para internalizar el TiO_2 -C, además se realizó una citometría de flujo con el mismo fin y para observar cambios en la morfología celular. La viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo de MTT realizando una curva con concentraciones de 1 a 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y la producción de citocinas se cuantificó en los sobrenadantes del cultivo celular a los 4 y 7 días de exposición mediante el equipo MAGPIX, que se fundamenta en pruebas de ELISA. La producción de los nitritos y nitratos (NO_x) se cuantificó por la reacción de Griess, como indicador de la producción de óxido nítrico (NO). Finalmente, se evaluó el progreso del ciclo celular por citometría de flujo.

La síntesis de NPs dio como resultado TiO_2 -C, y al ser marcado con el colorante ARS, observamos que las células A549 internalizaron el TiO_2 -C y lo distribuyeron en el citoplasma, lo cual se asoció a cambios morfológicos como disminución en el tamaño celular y aumento en la granularidad. La viabilidad celular disminuyó en células expuestas desde 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y hasta 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, pero no disminuyó cuando se expusieron a 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 -C. Adicionalmente, las células produjeron más NO_x a los 7 días de exposición, a diferencia de las citocinas, las cuales pese a aumentar en el día 4 de exposición, disminuyeron en el día 7 con la exposición a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La exposición a TiO_2 -C indujo acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular y además hubo disminución en el porcentaje de células en las fases G1 y S.

Las células A549 fueron capaces de internalizar el TiO_2 -C y distribuirlo en el citoplasma, además dicha internalización indujo disminución en el tamaño celular y aumento en la granularidad. Por otro

lado, la viabilidad celular disminuyó cuando las células fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ durante 7 días. También, las células aumentaron la producción de NO_x al día 7 de exposición, y las citocinas aumentaron en el día 4 de exposición, por lo contrario, a los 7 días de exposición bajó la producción de citocinas, especialmente, en las células que fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Finalmente, las células se acumularon en la fase G2/M del ciclo celular cuando fueron expuestas a 5 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 7 días.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nanotecnología, nanomateriales y nanopartículas

La nanotecnología es una disciplina que ha tenido un fuerte desarrollo en la última década (Roco, 2011; Forloni, 2012). Esta disciplina es considerada una de las más importantes en la integración de la ciencia basada en la tecnología que se apoya en otras disciplinas como la biología, química y física (Lehn, 2002).

La *Royal Society* y la *Royal Academy of Engineering* han definido la nanotecnología como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de forma y tamaño a escala nanométrica.

Uno de los objetivos de la nanotecnología es realizar dispositivos que beneficien la medicina, la protección del ambiente, la energía, la informática, la industria alimenticia, transporte, la exploración espacial entre muchos otros (Stone *et al.*, 2010; Raison, 2013; Kim y Heyon, 2014). Cuando hablamos de nanotecnología es necesario mencionar a los nanomateriales, ya que gran parte del éxito logrado por la nanotecnología es debido al uso de dichos materiales.

Un nanomaterial ha sido definido como cualquier material natural, incidental o manufacturado que contenga al menos 50% de nanopartículas (NPs), sin importar en qué estado se encuentren, es decir, en estado agregado, aglomerado o libre. A su vez, una NP es definida como cualquier partícula con una o más dimensiones en el intervalo de 1-100 nm (Unión Europea, 2011).

Existen alrededor del mundo aproximadamente 3,000 nanomateriales con diferentes formas y composición química que están siendo utilizados, así como 2,705 productos que contienen algún tipo de nanomaterial, de los cuales 1,432 productos que contienen nanopartículas en forma de esfera, 641 productos con nanotubos, 43 productos con nanocables y 24 con nanocintas (<http://www.nanowerk.com/nanomaterial-database.php>). Además, el uso de los nanomateriales da lugar a aproximadamente 2,080 compañías que se dedican a la producción, aplicación, instrumentación, servicios intermediarios entre otras, así como también da lugar a 2,130 sitios de investigación como laboratorios, departamentos de universidades, industrias privadas y gubernamentales, asociaciones y sociedades alrededor del mundo (http://www.nanowerk.com/nanotechnology/research/nanotechnology_links.php), de los cuales solo están registrados 2 sitios de investigación en México, ambos pertenecientes a la UNAM (http://www.nanowerk.com/phpscripts/n_unis_c.php?country=Mexico).

1.1.1 Dióxido de titanio

El dióxido de titanio en forma de nanopartículas (TiO₂ NPs) es el nanomaterial manufacturado más producido a nivel mundial con 10,000 toneladas de producción al año (Piccinno *et al.*, 2012). El TiO₂ comenzó a usarse como pigmento blanco desde 1923 en Francia y fue hasta los años 1930 que hubo un incremento considerable en la producción, la cual ha continuado hasta ahora (IARC, 2010).

El TiO₂ es un óxido metálico que se compone principalmente de titanio, el cual es el noveno elemento más abundante en la Tierra (Shi *et al.*, 2012). El TiO₂ es un polvo blanco, sólido, cristalino y sin olor, insoluble en agua, ácido clorhídrico, ácido nítrico, o alcohol y soluble en ácido sulfúrico concentrado caliente, ácido fluorhídrico, o en una soluciones alcalinas (NOISH, 2011).

El TiO₂ NPs es utilizado en la industria para productos de consumo humano, como cosméticos, productos alimenticios, pastas dentales, pinturas, bloqueadores solares, entre muchos otros productos (Skocaj *et al.*, 2011), con la finalidad de ofrecer al consumidor productos más atractivos. Un ejemplo de lo anterior es que debido a su resistencia a la luz UV, es utilizado en las pinturas y plásticos de exteriores, asegurando al consumidor mayor duración del producto (IARC, 2010).

1.1.2 Cristalinidad y geometría del TiO₂ NPs

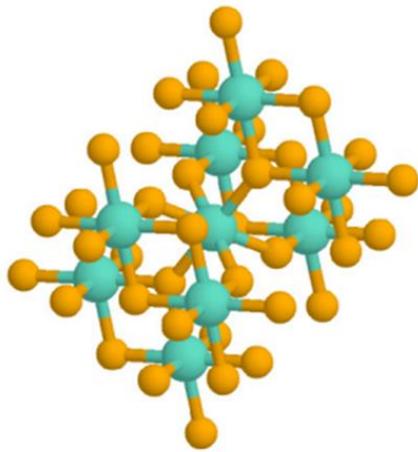
El TiO₂ NPs es sintetizado a partir de la roca ilmenita (Figura 1; Tabla 1). Los principales yacimientos de esta roca se encuentran en Rusia, Noruega, Canadá, Brasil, y Ucrania (Chang, 2002). El TiO₂ se encuentra principalmente con fase cristalina de anatasa y rutilo, ambos son utilizados como pigmento blanco, y ambas fases cristalinas son tetragonales, sin embargo el rutilo presenta mayor densidad en el acomodo de sus átomos (Figura 2) y por lo tanto se considera más estable. Se ha mostrado que en sistemas biológicos expuestos a ambas cristalinidades de TiO₂, la de anatasa es la que induce mayor daño, además de ser la más comercializada (Warheit *et al.*, 2007; Iavicoli *et al.*, 2011; Skocaj *et al.*, 2011).



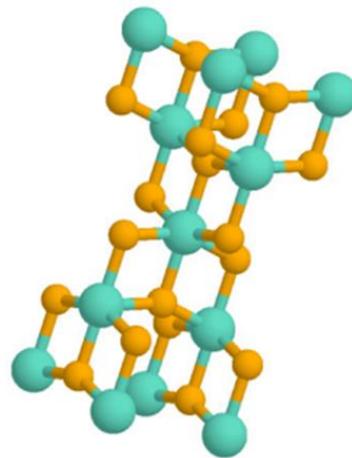
Figura 1. Roca Ilmenita ($\text{Fe}^{2+} \text{TiO}_3$). Ejemplar obtenido del Monte Ilmen, Rusia.
 Imagen tomada de internet: <http://geology.com/minerals/photos/ilmenite-610.jpg>

Tabla 1. Características principales de la roca Ilmenita, fuente principal del TiO_2 NPs.

Clase	Óxidos
Grupo	Hematites
Etimología	El nombre deriva de las montañas "Ilmen" en Rusia, uno de sus principales yacimientos.
Color	Negro
Brillo	Metálico submetálico
Raya	Negro rojizo
Dureza	5.5 a 6
Densidad	4.7 g/cm ³
Química	Contiene el 47,34% de FeO y el 52,66% de TiO_2

A**B**

Rutilo



Anatasa

Figura 2. Estructura de rutilo y anatasa. A) Imágenes de las rocas como se encuentran en la naturaleza (imágenes tomadas de http://www.igme.es/museo/pieza_mes/2014/enero.htm, <http://www.mineral-s.com/anatasa.html>. B) Imágenes que muestran la fase cristalina de ambas rocas (tomadas de la NIOSH, 2011).

Por otro lado, el TiO₂ NPs se sintetiza en diferentes formas geométricas; por ejemplo en esferas, tubos, fibras, cintas, entre otras, lo cual muestra que las NPs pueden ser del mismo compuesto químico e incluso de la misma fase cristalina pero presentar diferente forma y eso puede conducir a una respuesta celular diferente (Xia *et al.*, 2013; Bonner *et al.*, 2013). Es por esta razón que en cada investigación es importante determinar con qué tipo de NPs se está trabajando.

Hasta ahora, las investigaciones han sido enfocadas a estudiar el TiO₂ en forma de esfera (TiO₂-E), esto es debido a que tiene más años en el mercado y hay más productos que las contienen. No obstante, se está en búsqueda de nuevas formas geométricas que les confieran nuevas características fisicoquímicas a los nanomateriales para así ofrecer productos más atractivos. El TiO₂ en forma de cintas (TiO₂-C) es una forma de NPs relativamente nueva y su aplicación está aumentando constantemente, por ende también su producción. Hasta ahora, los pocos estudios toxicológicos realizados con el TiO₂-C sugieren que es más tóxico que el TiO₂-E (Hamilton *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2013). Es por esta razón que este trabajo se enfoca en el TiO₂-C, pues aún falta mucha información por describir acerca de la toxicidad inducida por la exposición a este tipo de nanomaterial.

Actualmente, el TiO₂-C es utilizado principalmente en implantes óseos porque promueve la proliferación de los osteocitos (Brammer *et al.*, 2012), en dispositivos que miden la luz UV y el pH (Lee *et al.*, 2014; Nie *et al.*, 2014), en celdas solares optimizadas, es decir, que aprovechan mejor la energía solar (Hwang *et al.*, 2014), y en el tratamiento de aguas residuales ya que son más fotocatalíticos y por lo tanto más eficientes que el TiO₂-E (Liu *et al.*, 2014b; Du *et al.*, 2014). Estos usos, son muestra de que el uso y producción del TiO₂-C está en constante incremento. A pesar de esto, la parte toxicológica aún no está descrita completamente.

1.1.2.1 Determinación de la cristalinidad y geometría del TiO₂ NPs

En el área de la nanotoxicología es importante considerar algunos aspectos a nivel estructural de las NPs para explicar parte de su comportamiento en los modelos biológicos. En cada investigación realizada se debe determinar al menos la forma geométrica, la fase cristalina, el tamaño de los aglomerados que se forman cuando están en contacto con algún medio de dispersión (tamaño hidrodinámico) y el potencial Z, que es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las nanopartículas y las moléculas del medio de dispersión. Dichas determinaciones, son factores influyentes en la respuesta de los sistemas biológicos, incluso cuando las NPs son del mismo compuesto químico, en este caso TiO₂.

Ejemplo de lo anterior, es que la viabilidad celular depende del tamaño de las NPs a las que han sido expuestas, es decir, las células expuestas a NPs más pequeñas tienen menor viabilidad que las células expuestas a NPs de tamaño más grande (Hou *et al.*, 2013). Otro ejemplo es que el TiO₂ en forma de cintas (TiO₂-C) es más fotocatalítico que el TiO₂ en forma de esferas (TiO₂-E), dado que el TiO₂-C tiene una mejor afinidad con las moléculas de oxígeno en comparación con el TiO₂-E (Wu *et al.*, 2010), lo cual muestra que el simple cambio en la forma de la geometría cambia las propiedades de las NPs. Además, el TiO₂-C ha sido sintetizado en cintas cortas y cintas largas, donde estas últimas, muestran mayor toxicidad tanto *in vivo* como *in vitro* (Hamilton *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2013).

1.1.3 Vías de exposición

Por sus múltiples aplicaciones en los diferentes productos, los humanos estamos expuestos por tres principales vías: oral, dérmica e inhalatoria.

Por vía oral estamos expuestos debido a que el TiO₂ es utilizado como aditivo en los alimentos. Por ejemplo, el contenido de titanio (Ti) en productos como los dulces o caramelos, incluyendo chicles, chocolates y productos con glaseado blanco o revestimientos de azúcar en polvo contienen de 0,01 a 1 mg de Ti por porción mientras que las donas espolvoreadas contienen hasta 10 mg de Ti por porción (Weir *et al.*, 2012). Otra forma en la que estamos expuestos por vía oral es los tratamientos de odontología, como el tratamiento de la gingivitis ya que el TiO₂ NPs es utilizado por los odontólogos por su capacidad bactericida (Liu *et al.*, 2014a).

Por la vía dérmica, estamos expuestos principalmente por el uso de bloqueadores solares y cosméticos, ya que debido a la actividad fotocatalítica que tiene el TiO₂ NPs es utilizado para reducir los daños causados por la exposición a la luz UV. Se estima que aproximadamente 1,300 toneladas de TiO₂ NPs son destinadas para los productos de cuidado personal, incluyendo los bloqueadores solares y a su vez un bloqueador solar puede contener hasta 90 µg/mg de producto (Weir *et al.*, 2012). Cabe mencionar que aproximadamente 33 millones de personas, en el continente americano, usan algún tipo de bloqueador solar todos los días y 177 millones lo usan ocasionalmente (Weir *et al.*, 2012).

Por otro lado, la vía inhalatoria es la vía de exposición más importante pues se ha visto que los efectos tóxicos que induce son mayores a los de las otras dos vías de exposición (IARC, 2010; Weir *et al.*, 2012; Ponce, 2013), sin embargo falta información por describir por esa razón este trabajo se enfoca en la vía inhalatoria. Esta tipo de exposición ocurre principalmente en ambientes ocupacionales, es decir, en las fábricas donde se está sintetizando, empaquetando y transportando

el TiO₂ NPs. Se sabe que los trabajadores más expuestos a la inhalación del TiO₂ NPs son los que se encargan del empaquetamiento ya que en estas áreas las TiO₂ NPs son procesadas en molinos y el polvo puede dispersarse a través del aire durante el embolsado (IARC, 2010).

El Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NOISH, por sus siglas en inglés) estimó que en el año 2007 aproximadamente 4,300 trabajadores estuvieron expuestos por vía inhalatoria en fábricas productoras de TiO₂, mientras que en el año 2006 aproximadamente 68,000 trabajadores estuvieron expuestos al TiO₂ por la manufactura de pinturas y revestimientos; 803,000 por la manufactura de plásticos, caucho y 138,000 estuvieron expuestos al TiO₂ en fábricas dedicadas a la molienda de papel y cartón (NIOSH, 2011). Es importante mencionar que en la República Mexicana hay aproximadamente 30 empresas como Constructora Titanio S.A de C.V., Materiales Nanoestructurados S.A de C.V., Comercializadora Química Mexicana, Comercializadora Reyman, Distribuidora Deimar, entre otras, que se encargan de distintas actividades que involucran una exposición al TiO₂ NPs, como la síntesis, comercialización y el transporte (<http://mexicored.com.mx/search.php?q=titanio>).

Por otra parte, algunas investigaciones reportan la cantidad de TiO₂ NPs que se encuentra en los ambientes ocupacionales de algunas fábricas, pero desafortunadamente estos estudios no son concluyentes, ya que la variación entre las fábricas es mucha (Fryzek *et al.*, 2003; Boffetta *et al.*, 2004; Sleeuwenhoek, 2005). El único dato en el que coinciden los reportes de diferentes fábricas es que los trabajadores encargados del empaquetamiento son los que desarrollan su actividad en ambientes con mayor cantidad de TiO₂ NPs.

Con base en lo anterior, algunas instituciones han emitido recomendaciones acerca de los límites ocupacionales a los que deben estar expuestos los trabajadores, por ejemplo el NIOSH recomendó que la concentración máxima de exposición a NPs debe ser de 0.3 mg/m³ por un tiempo máximo de 10 horas laborales. La *New Energy and Industrial Technology Development Organization* (NEDO), recomienda que la concentración máxima de exposición sea de 0.6 mg/m³ en una jornada laboral de 8 horas. A pesar de esto, en México la Norma Oficial Mexicana-010 (NOM-010) permite como límite una concentración de 10 mg/m³ en una jornada de 8 horas al día o de 40 horas a la semana, o también permite un límite máximo de 20 mg/m³ si se está expuesto solo durante 15 minutos al día. Lo anterior claramente muestra que en México hace falta investigación enfocada en el área de la nanotoxicología que aporte información consistente sobre la toxicidad de los nanomateriales y que dicha información ayude a la generación de nuevas regulaciones, que aseguren la integridad de los trabajadores. Lo anterior es importantes, ya que se estima que para el año 2020 haya aproximadamente 6 millones de personas trabajando en fábricas o empresas que los mantendrán expuestos a nanomateriales (NIOSH, 2013).

1.1.4 Clasificación del TiO₂ con base en su toxicidad

En México no hay organismos que se dediquen a la regulación de los nanomateriales, por lo tanto para realizar sus marcos normativos, México ocupa la información emitida por otros países. A pesar de eso, la NOM-010 tiene clasificado al TiO₂ en el grupo A4 como **“no clasificado como carcinógeno en humanos”**.

A diferencia de lo anterior y con base en estudios *in vivo*, *in vitro* y epidemiológicos, en el año 2006 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó el TiO₂ en el grupo 2B como **“posible carcinógeno para humanos”** cuando se está expuesto por vía inhalatoria. Cabe mencionar que un principio, en el año 1989, estuvo clasificado en el grupo 3 como **“no clasificable en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos”** pero con la evidencia que hay hasta ahora la IARC consideró subirlo de categoría (IARC, 2010).

Para ser ubicado en el grupo 2B debe haber suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales de experimentación, sin embargo no puede ser clasificado como carcinógeno porque hay insuficiente e inadecuada evidencia de carcinogenicidad en humanos.

Una desventaja en esta clasificación es que la IARC no especifica el tamaño o la forma del TiO₂ con los cuales considera que el TiO₂ es un posible carcinógeno, sólo menciona que esta clasificación aplica para la fase cristalina de anatasa y rutilo.

Adicionalmente, el NIOSH clasificó al TiO₂ NPs como **“potencial carcinógeno ocupacional”**. Este instituto, sí menciona que su clasificación es para las partículas ultrafinas, que incluye a las de tamaño nanométrico (NIOSH, 2011).

1.1.4.1 La exposición al TiO₂ NPs como factor de riesgo en el desarrollo del cáncer pulmonar

Debido a que la toxicidad del TiO₂ es principalmente preocupante en ambientes ocupacionales y que el órgano más afectado por vía inhalatoria es el pulmón, una de las principales cuestiones es cómo contribuye la exposición al TiO₂ en el desarrollo del cáncer pulmonar.

Dentro de las muertes causadas por cáncer, el de pulmón es el que ocupa el primer lugar de muerte a nivel mundial y ocupa el tercer lugar de incidencia con 19.4% y 13% de la población mundial respectivamente (Figura 3; Globocan, 2012).

El cáncer de pulmón se divide en dos:

- Cáncer de pulmón de células pequeñas
- Cáncer de pulmón de células no pequeñas

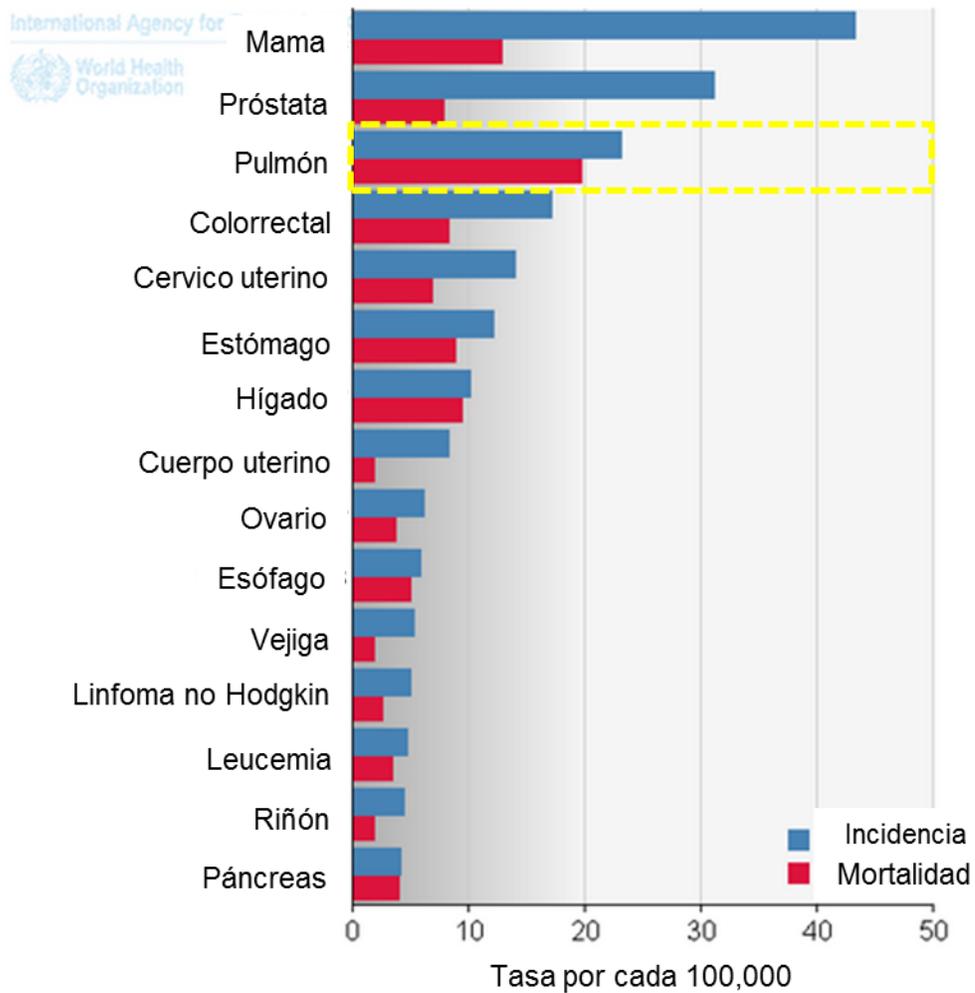


Figura 3. Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer a nivel mundial en ambos sexos. Se observa que el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar en mortalidad y tercero en incidencia. Imagen modificada de Globocan disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.

Alrededor del 85-90% de los casos son del tipo de células no pequeñas, el cual se subdivide en tres subtipos:

- Escamoso
- Adenocarcinoma
- Carcinoma

De estos tres subtipos, el más común es el adenocarcinoma con aproximadamente 40% de incidencia (*American Cancer Society, 2012*).

La línea celular A549, utilizada en este trabajo, son células pulmonares, específicamente neumocitos tipos II que se encargan de secretar el surfactante (King, 1982). El surfactante es el tensoactivo pulmonar cuya función es disminuir la tensión superficial de la interfase aire-líquido, de este modo se proporciona estabilidad mecánica y se evita el colapso del pulmón (King, 1982). Los neumocitos tipo II son células que forman parte de las células no pequeñas del pulmón y están ubicadas en las regiones alveolares, justo la región donde el TiO_2 es acumulado cuando se inhala (Skocaj *et al.*, 2011), pues se ha reportado que por su tamaño nanométrico alcanza estas regiones alveolares (Simon-Deckers *et al.*, 2008; Ponce, 2013).

Sin embargo, aún no se sabe si la exposición al TiO_2 está participando en el desarrollo de este tipo de cáncer, pero sí se sabe que induce una serie de eventos celulares que no solo podrían estar aumentando la probabilidad de padecerlo, sino que también podría estar exacerbándolo en personas que ya lo padecen.

1.1.5 Toxicidad causada por la exposición al TiO_2 NPs

Durante muchas décadas el TiO_2 fue considerado como un material seguro e inerte, fue hasta años después que se observó que no era así y que por lo contrario, inducía efectos tóxicos. Además, con el desarrollo de la nanotecnología comenzó a sintetizarse en tamaños nanométricos (<100nm de diámetro) con la intención de mejorar sus propiedades fisicoquímicas iniciales (Skocaj *et al.*, 2011), lo cual lo hace aún más tóxico.

La toxicidad por la exposición a las NPs se debe en gran parte por su pequeño tamaño, pues es una característica que facilita que sean internalizadas por las células. Además, una vez que han sido internalizadas tienen la capacidad de formar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés; Pan *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2011; Montiel-Dávalos *et al.*, 2012).

La internalización (Figura 4) y localización de las NPs, están relacionadas con los efectos tóxicos que inducen en las células. Tanto la internalización como la localización de las NPs va a depender del tipo celular así como de las propiedades de las NPs, algunas de esas propiedades son la forma geométrica, el área superficial, tamaño, superficie química, entre otras (Skocaj *et al.*, 2011).

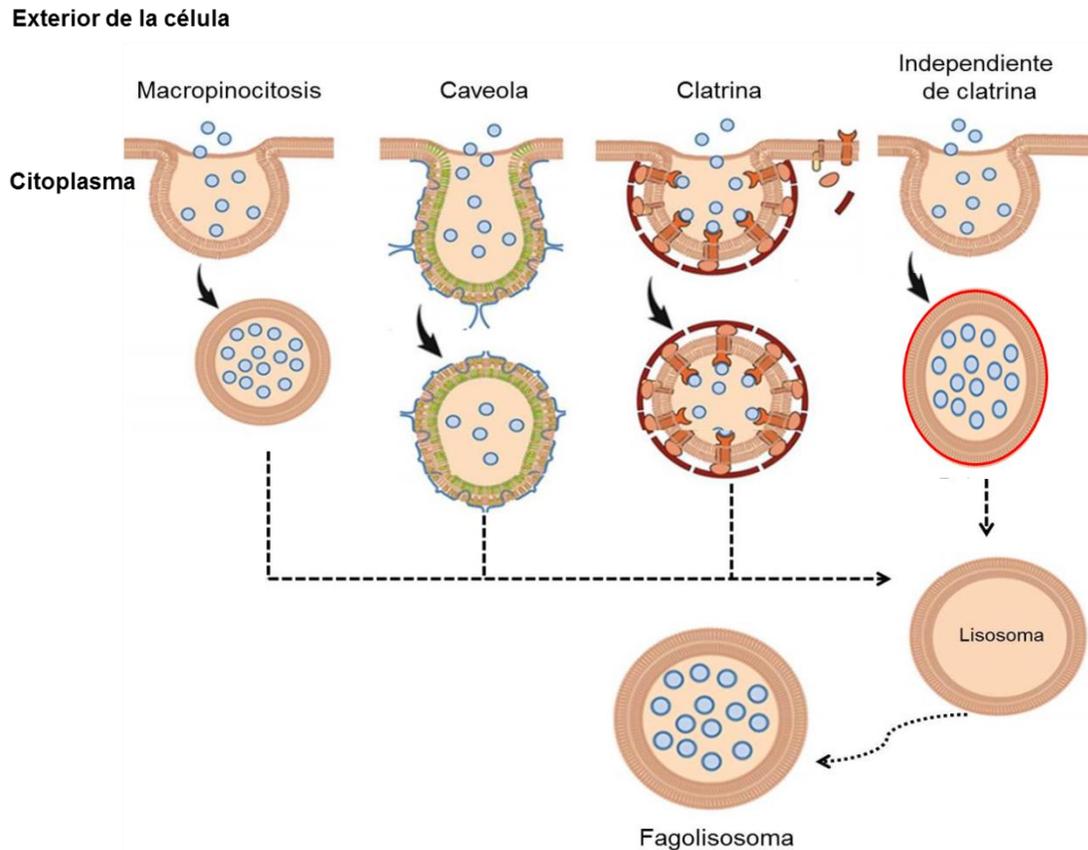


Figura 4. Diferentes formas de internalizar las NPs. Dependiendo de la nanopartícula y del tipo celular va a cambiar la forma en la que se internalizan las nanopartículas.

Hasta ahora, los reportes indican que las NPs en forma de esfera son internalizadas principalmente por la vía de endocitosis, macropinocitosis, y por los toll-like receptors 4 (TLR4) (Fröhlich, 2012; Mano *et al.*, 2013). Esta última forma de internalización probablemente esté relacionada con la producción de citocinas (Ze *et al.*, 2014) inducidas por la exposición al TiO₂.

La información acerca de la internalización de las NPs en forma de cintas es poca, pero se sabe que el TiO₂-C internalizado en macrófagos alveolares se encuentra en forma libre en el citoplasma y no en vesículas como es el caso de las NPs en forma de esferas (Hamilton *et al.*, 2009; 2014). Lo anterior ocurre porque pese al intento de las células por formar lisosomas alrededor del TiO₂-C, no pueden realizarlo pues la longitud de las cintas (aproximadamente 15 µm) es tanta que vuelve inestables los lisosomas y finalmente el TiO₂-C queda libre en el citoplasma (Hamilton *et al.*, 2009). Aunque hay quienes reportan que la internalización de NPs en forma de cintas es llevada a cabo mediante endocitosis o difusión a través de la membrana en células de glioblastoma (Mirjolet *et al.*, 2013) y cardiomiocitos (Papa *et al.*, 2013), nuevamente, esto depende del tipo de NPs e incluso de la línea celular.

Por otro lado, la mayor parte de las investigaciones han sido enfocadas en mostrar la toxicidad del TiO₂ en forma de nanoesferas (TiO₂-E), ya que también es el más utilizado en la industria, y se ha mostrado que induce toxicidad considerable tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.

1.1.5.1 Toxicidad del TiO₂-E *in vitro*

Dado que la internalización es el primer punto para evaluar la toxicidad del TiO₂ NPs, se ha observado que diversos tipos celulares tienen la capacidad de internalizarlo, por ejemplo células epiteliales de pulmón (A549) (Moschini *et al.*, 2013), células mesenquimales (Hou *et al.*, 2013), células madre neurales (Liu *et al.*, 2010), fibroblastos (Pan *et al.*, 2009; Allouni *et al.*, 2012), células gliales (Márquez-Ramírez *et al.*, 2012), linfocitos (Kang *et al.*, 2008), células del epitelio bronquial humano (Hussain *et al.*, 2010), queratinocitos (Kocbek *et al.*, 2010), entre otros.

La internalización del TiO₂-E es generalmente llevada a cabo a partir de las 3 horas de exposición e induce cambios morfológicos después de tan solo 24 horas de exposición, además de inducir aproximadamente 20% de necrosis (Moschini *et al.*, 2013).

La exposición al TiO₂-E induce en la célula estrés oxidativo, disminución de antioxidantes, lipoperoxidación, daño a DNA, formación de micronúcleos, cambios en el ciclo celular y producción de citocinas. Por ejemplo, en cuanto al ciclo celular y la producción de citocinas inflamatorias, se ha reportado que la exposición al TiO₂-E retrasa la fase G2/M del ciclo celular y daña notablemente la

anafase y telofase (Huang *et al.*, 2009); además, dicha exposición induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL)-6, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-18, TNF- α , proteína C-reactiva y la activación del factor necrótico kappa beta (NF- $\kappa\beta$) (Nogueira *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Al-Rasheed *et al.*, 2013).

También, la exposición al TiO₂-E induce la formación de micronúcleos (Gurr *et al.*, 2005) y otros daños en el DNA (Toyooka *et al.*, 2012), además de activar sistemas de reparación cuando hay ruptura de doble cadena en el DNA (DSB) y cadena sencilla (SSB) (Toyooka *et al.*, 2012; Jugan, 2012).

1.1.5.2 Toxicidad del TiO₂-E *in vivo*

La exposición a TiO₂-E durante un tiempo corto (24 horas) y por vía intratraqueal incrementa la cantidad de neutrófilos y células polimorfonucleares en el lavado bronquioalveolar (BAL), lo cual es un indicador de inflamación, así como aumento en la producción de lactato deshidrogenado (LDH), un indicador de citotoxicidad y muerte celular (Renwick *et al.*, 2004; Warheit *et al.*, 2005).

También en exposiciones agudas (una sola dosis) por vía intratraqueal a TiO₂-E hay alteraciones en los septos alveolares y ampliación alveolar, así como proliferación de neumocitos tipo II, engrosamiento de la pared alveolar y acumulación de macrófagos alveolares con NPs una semana después de la exposición, lo cual, indican los autores, son indicativos de enfisema pulmonar (Chen *et al.*, 2006). Adicional a lo anterior una sola dosis de TiO₂ intratraquealmente aumenta la producción de citocinas IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, INF- γ , VEGF entre otras a los días 1, 3 y 28 después de una dosis baja (18 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), intermedia (54 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) y alta (162 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) (Husain *et al.*, 2013).

En periodos intermedios de exposición (90 días) por vía intratraqueal a TiO₂ NPs por instilación intratraqueal también hay daño pulmonar, asociado a procesos inflamatorios, como la producción de citocinas, la generación de estrés oxidante y la activación del factor necrótico kappa beta (NF- $\kappa\beta$) (Sun *et al.*, 2012).

En cuanto a la exposición durante periodos largos (2 años), se sabe que hay acumulación de TiO₂ en las células alveolares de manera dosis dependiente, hiperplasia de neumocitos tipo II, proteinosis alveolar, adenomas bronquiolo alveolar y carcinomas de células escamosas (Lee *et al.*, 1985).

1.1.5.3 Estudios epidemiológicos

Los estudios epidemiológicos realizados hasta ahora sólo han tenido como cohorte personas que producen el TiO₂, pero no hay estudios epidemiológicos donde la cohorte sea de los trabajadores que lo manipulan o utilizan una vez que ya ha sido sintetizado (NIOSH, 2011).

Un dato relevante fue obtenido de un hombre de 53 años quien fue empleado como empacador de TiO₂ durante aproximadamente 13 años y quien presentó adenocarcinomas en el pulmón y titanio difundido y depositado alrededor de bronquiolos (Yamadori *et al.*, 1986)

Además, se ha visto que sí aumenta la muerte por cáncer de pulmón en trabajadores expuestos al TiO₂ (Boffetta *et al.*, 2004) pero no se asegura que dicho incremento sea exclusivamente por la exposición al TiO₂.

Hasta ahora, los pocos estudios epidemiológicos realizados tienen aún muchas limitaciones, por ejemplo no fueron diseñados para investigar la relación entre el tamaño de las partículas de TiO₂ y el riesgo de cáncer de pulmón, lo cual es una cuestión importante para evaluar el potencial cancerígeno ocupacional del TiO₂, entre muchas otras cosas, razón por la cual los estudios epidemiológicos no son concluyentes. Se necesita más investigación sobre la toxicidad inducida por la exposición al TiO₂ para conocer cuál es el papel que juega en el desarrollo del cáncer pulmonar.

1.1.5.4 Toxicidad del TiO₂-C *in vitro*

Por otro lado, a pesar de que aún no se conocen bien los efectos tóxicos del TiO₂-E, así como de muchos otros nanomateriales, se están sintetizando nuevas formas con la finalidad de impulsar la nanotecnología, entre ellos el TiO₂-C. Por esta razón el área de toxicología busca conocer los efectos tóxicos de estos nuevos nanomateriales.

Algunos estudios realizados con TiO₂-C han mostrado que su toxicidad es similar a la de algunos otros nanomateriales manufacturados como los cristales de ácido úrico, dióxido de silicio cristalino y asbestos (Dostert *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2009; Hamilton *et al.*, 2014). Es importante mencionar que los asbestos, así como algunas isoformas del dióxido de silicio ya han sido clasificados en el grupo 1 como carcinógenos para humanos (IARC, 1997; IARC, 2009; EPA, 2009). Cuando se habla de toxicidad similar se hace referencia a la internalización de estas NPs por macropinocitosis, ruptura de los fagolisosomas, liberación de cathepsina B y activación del inflammasoma (NLRP3) por medio de la liberación de citocinas IL-1β e IL-18 (Tschopp *et al.*, 2010; Stern *et al.*, 2012; Hamilton *et al.*, 2014).

También, la exposición al TiO₂-C induce ROS, apoptosis (Hamilton *et al.*, 2009) y liberación de la enzima LDH (Xia *et al.*, 2013; Tilton *et al.*, 2013).

Con respecto al transcriptoma y el proteoma, analizado en células de la vía respiratoria (cultivo primario) expuestas a TiO₂-C, hay genes y proteínas sobreexpresados relacionados con la producción de óxido nítrico (NO), regulación de angiogénesis, factores de crecimiento de las fases G1 y S del ciclo celular, y también relacionados con el arresto celular, inestabilidad genómica, adhesión a la matriz extracelular medida por integrinas, NADPH oxidasa, regulación transcripcional, transición epitelio-mesenquimal entre otros (Tilton *et al.*, 2013).

1.1.5.5 Toxicidad del TiO₂-C *in vivo*

El enfoque principal de los estudios *in vivo* que evalúan la toxicidad del TiO₂-C ha sido mostrar la inflamación que inducen a nivel tisular y se ha visto que causa alveolitis, bronquiolitis e inflamación perivascular (Hamilton *et al.*, 2009; Bonner *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013).

Sin embargo, no se ha descrito qué interleucinas están relacionadas con la respuesta inflamatoria inducida por el TiO₂-C ni se ha reportado si la producción de NO está participando en dicho proceso. El NO, es conocido por su función en la relajación y vasodilatación del músculo liso (Palmer *et al.*, 1987), pero también se sabe que es capaz de formar peroxinitrito y este a su vez nitrar proteínas (Hara *et al.*, 2005), con lo cual podría estar participando en la regulación de la apoptosis y la respuesta inflamatoria. Debido a que el NO interacciona rápidamente con el O₂ y genera una gran variedad de productos como los nitritos y nitratos (NO_x), es más factible medir estos, que se utilizan como marcadores de la producción de NO (Adames *et al.*, 2009).

La exposición de ratones al TiO₂-C incrementa el infiltrado de células como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células polimorfonucleares y linfocitos en el lavado bronquioalveolar (BAL) (Bonner *et al.*, 2013). Además, 4 laboratorios que se dedicaron a realizar los mismos experimentos determinaron fuerte inflamación en la región bronquiolar terminal y la región de la bifurcación del conducto alveolar y acumulación del TiO₂-C en la misma área (Bonner *et al.*, 2013).

En algunos estudios con nanomateriales sintetizados en forma de cintas, se ha visto que entre más largos y rígidos sean, es más difícil que sean eliminados del pulmón tal como pasa con los nanotubos de carbón de múltiples paredes, que son otro tipo de nanomaterial manufacturado en forma de cintas (Murphy *et al.*, 2011; Palomaki *et al.*, 2011; Fenoglio *et al.*, 2012) lo cual probablemente pueda estar pasando con el TiO₂-C y por esa razón se quede depositado en el pulmón.

1.1.5.6 Mecanismos celulares de toxicidad no descritos

1.1.5.6.1 Producción de citocinas

El proceso inflamatorio es complejo e involucra una gran variedad de mecanismos contra patógenos, toxinas, contaminantes, irritantes o alérgenos, pero se ha visto que las NPs también pueden inducir este proceso (Park *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2013).

Para desencadenar el proceso inflamatorio, las células secretan citocinas, como TNF- α o el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), y algunos factores que activan las plaquetas o IFN; esto tiene la función de reclutar células en el sitio de inflamación (Ono *et al.*, 2008; Moldoveanu *et al.*, 2009).

Las principales citocinas pro-inflamatorias son TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, e IFN- γ ya que ellas participan en la activación del sistema inmune, la inflamación aguda, la presentación de antígeno, la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y la expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular, como la colagenasa. Así mismo, las principales citocinas anti-inflamatorias son IL-10, IL-4, TGF- β y su función es regular la expresión de las citocinas pro-inflamatorias (Moldoveanu *et al.*, 2009). Por otro lado, algunas citocinas, como el GM-CSF, podrían estar retrasando la apoptosis o la IL-4 y la IL-10 podrían estar inhibiendo la actividad de las células Th1 del sistema inmune (Moldoveanu *et al.*, 2009).

Con base en estudios realizados con TiO₂-E, que muestran que la exposición a estas NPs induce la producción de citocinas inflamatorias (Nogueira *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Al-Rasheed *et al.*, 2013) y también con base en los estudios donde muestran que la exposición a TiO₂-C induce fuerte inflamación tisular consideramos importante evaluar qué citocinas inflamatorias están participando en la inflamación inducida por la exposición al TiO₂-C ya que solo hay dos reportes que evalúan citocinas en células expuestas al TiO₂-C. Estos estudios mostraron que IL-1 β e IL-18 se sobreproducen, lo cual indica que el inflamasoma NLRP3 se mantiene activo por la exposición al TiO₂-C (Hamilton *et al.*, 2009; 2014). El inflamasoma es un complejo multimérico de proteínas, que es activado principalmente por caspasa 1 y caspasa 5. Además constituye una parte importante del sistema inmune innato. La composición exacta del inflamasoma depende del activador, por ejemplo si es un virus o una bacteria. Sin embargo, los asbestos inducen una composición diferente a éstas. Cuando el inflamasoma ha sido activado, la liberación de citocina IL-1 e IL-18 es característico (Martinon *et al.*, 2002; Guey *et al.*, 2014).

Respecto a estudios epidemiológicos, no hay ningún reporte con TiO₂-C.

1.1.5.6.2 Ciclo celular

Hasta ahora no hay investigaciones que muestren la capacidad de las células A549 para internalizar el TiO₂-C, para producir NO o si la exposición a estas NPs induce cambios en el ciclo celular, además de la falta de reportes en liberación de citocinas inflamatorias.

Es importante considerar que la exposición al TiO₂-C podría estar alterando la progresión del ciclo celular, pues se ha demostrado que induce estrés oxidativo, el cual ocurre por el incremento de las ROS, y a su vez el estrés oxidativo está íntimamente relacionado con el daño a DNA (Shukla *et al.*, 2014), razón por la cual las células podrían tener cambios en la progresión del ciclo.

Durante el ciclo celular existen diferentes puntos de control, donde la célula es monitoreada para detectar daños, en dado caso que los hubiera, la célula es arrestada en esos puntos de control para su posterior reparación. Una vez que el daño ha sido reparado, la célula puede continuar con el ciclo celular, o en dado caso que el daño no pueda ser reparado la célula debe ir a apoptosis. Con esto se mantiene la estabilidad genómica antes, durante y después de la replicación del DNA (Johnson y Walker, 1999).

Sin embargo, en patologías como el cáncer, se ha visto que los puntos de control del ciclo celular no son bien regulados, provocando que las células con daños en el DNA no sean arrestadas y por lo contrario, sigan dividiéndose aún con los daños. Lo anterior, implica que la replicación del DNA, que se lleva a cabo durante la fase S del ciclo celular (Figura 5), se ve alterada y eso permita la acumulación de alteraciones genéticas asociadas a patologías como el cáncer (Esposito *et al.*, 2004).

Esto nos conduce a pensar que si la exposición a TiO₂-C induce daño a DNA, en consecuencia debe presentar cambios en la progresión del ciclo celular.

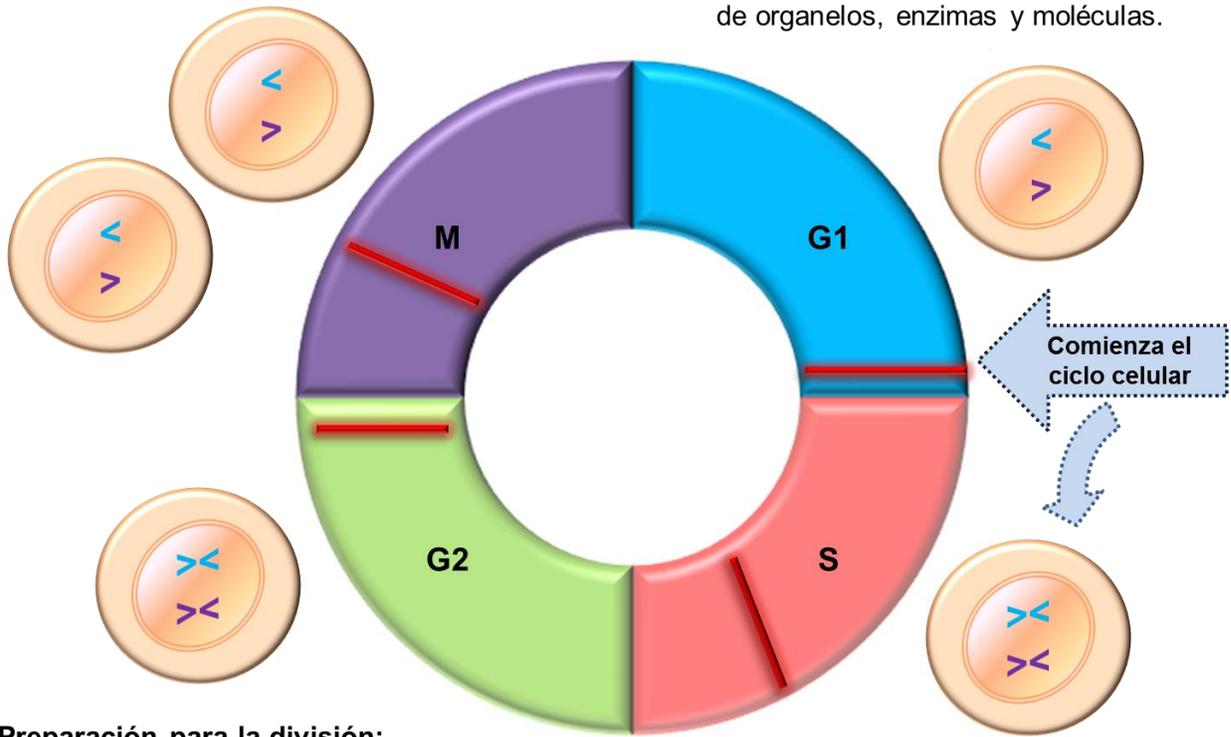
De acuerdo con lo antes descrito, el presente estudio busca esclarecer parte de la toxicidad inducida por el TiO₂-C y así contribuir con la información que busca conocer cuál es el papel que juega la exposición al TiO₂-C en el desarrollo del cáncer pulmonar. Lo anterior es importante, ya que el TiO₂-C está siendo cada vez más utilizado y aún no hay regulación normativa del uso de los nanomateriales en los productos ni en los ambientes ocupacionales, principalmente para los trabajadores de las fábricas que lo sintetizan y distribuyen. La falta de regulación legislativa está íntimamente relacionada con la falta de estudios científicos que muestren lo considerablemente tóxica que dicha exposición.

División celular:

Se forman dos células hijas

Crecimiento celular:

La célula aumenta su tamaño, el número de organelos, enzimas y moléculas.



Preparación para la división:

Se verifica que no haya daños en el DNA y los cromosomas comienzan a condensarse. Si hay daño en el DNA hay arresto celular.

Replicación de DNA:

Se duplica el material genético.

Figura 5. Ciclo celular. Se muestra el progreso del ciclo celular en condiciones normales. Las líneas rojas muestran los puntos de control en donde la célula puede ser arrestada si hay daños durante este proceso.

2. HIPÓTESIS

Las células epiteliales de pulmón expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días tendrán la capacidad de internalizar las NPs y dicha internalización inducirá disminución en el tamaño celular y aumento en la granularidad. Además, la exposición al $\text{TiO}_2\text{-C}$ disminuirá la viabilidad celular, inducirá la liberación de citocinas inflamatorias, aumentará la producción de óxido nítrico y arrestará a las células en la fase G2/M del ciclo celular.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de células epiteliales de pulmón expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días para internalizar el $\text{TiO}_2\text{-C}$, así como evaluar sus efectos sobre el tamaño celular, la granularidad, la viabilidad celular, la liberación de citocinas inflamatorias, óxido nítrico y los cambios en la progresión del ciclo celular.

3.1 Objetivos particulares

- Sintetizar el $\text{TiO}_2\text{-C}$ a partir del $\text{TiO}_2\text{-E}$ comercial, mediante un proceso hidrotérmico y caracterizar las NPs para conocer la forma, potencial Z y tamaño hidrodinámico.
- Exponer células epiteliales de pulmón a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días y evaluar si las células epiteliales de pulmón son capaces de internalizar las NPs, marcando las NPs con el colorante Rojo de Alizarina S.
- Conocer si la internalización del $\text{TiO}_2\text{-C}$ induce cambios morfológicos, como afectar el tamaño celular y la granularidad de las células.
- Cuantificar la producción de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF y la producción de NO_x en los sobrenadantes del cultivo celular a los 4 y 7 días de exposición.
- Evaluar la progresión del ciclo celular de células expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ durante 7 días.

4. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio busca contribuir a esclarecer parte de la toxicidad que induce el $\text{TiO}_2\text{-C}$, ya que cada día es más utilizado y no hay regulación del uso de los nanomateriales en los productos ni en los ambientes ocupacionales. Dichos ambientes tienen especial interés ya que son los lugares en donde se está expuesto por vía inhalatoria, la más importante vía de exposición. Se busca que, por medio de la generación de evidencia científica que aporte datos sobre la toxicidad del $\text{TiO}_2\text{-C}$, eventualmente haya se generen marcos normativos sobre su uso y producción de los nanomateriales, principalmente para los trabajadores de las fábricas que lo sintetizan, lo empaquetan y lo distribuyen, pues ellos son parte de la población más susceptible y vulnerable. La falta de regulación legislativa está íntimamente relacionada con la falta de estudios científicos a nivel global que muestren lo considerablemente tóxica que es la exposición a los nanomateriales.

Faltan aún muchos aspectos básicos por dilucidar en el área de la toxicología de los nanomateriales y en México la investigación dedicada a esta área es escasa comparada con otros países.

Conocer esta parte de la toxicología inducida por la exposición a los nanomateriales es importante para que en algún momento se regule su uso en los productos y en los ambientes ocupacionales, es decir, se hagan leyes y órganos legislativos dedicados a esta área, como ocurre en Estados Unidos y en Europa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Síntesis de TiO₂-C

El TiO₂-C fue sintetizado por un proceso hidrotérmico a partir del TiO₂-E (anatasa ≤25nm 99%) obtenido de Sigma Aldrich (#cat. 637254). Se pesaron 0.5g de TiO₂-E en una balanza analítica. Después, el TiO₂-E fue suspendido en una solución 10 M de hidróxido de sodio, con un volumen final de 35 mL y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución fue vertida en un recipiente de teflón que a su vez fue puesto dentro de un reactor de platino, esto con la finalidad de calentar la solución a 200°C por 24 horas en una mufla. Al salir de la estufa, el producto se lavó dos veces con agua bidestilada y después se ajustó el pH hasta 7 con HCl 0.1M. Finalmente, la muestra quedó resuspendida en aproximadamente 10 mL y se calcinó a 700°C por 30 minutos con una rampa de 1°C por minuto en una mufla (Hamilton *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2013).

5.2 Caracterización de las NPs

Para observar el tamaño primario del TiO₂-C y confirmar que la forma de las NPs eran cintas, se realizó una microscopía electrónica de barrido (SEM) (JEOL 5800-LV, Japan). Las imágenes fueron tomadas a 5000x con 15 kV. El tamaño y la forma de los aglomerados, es decir, el tamaño hidrodinámico, se evaluó mediante una microscopía electrónica de transmisión (TEM) (TEM-JEOL-JEM 1010, JEOL, Japan) a 75 000x. Como ensayo complementario para medir el tamaño de los aglomerados, se realizó un ensayo de dispersión de luz dinámica (DLS) con 60kV de aceleración. Con el objetivo de conocer la fase cristalina del TiO₂-C se realizó un espectro Raman con un espectrómetro dispersivo Omega XR Raman. Finalmente, para entender la estabilidad del TiO₂-C en el medio de cultivo, se midió el potencial Z, que es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las nanopartículas y las moléculas del medio de dispersión.

5.3 Cultivo celular y exposición al TiO₂-C

Se realizó cultivo de células epitelio-pulmonares de humanos (neumocitos tipo II) de la línea celular A549, que fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células A549 fueron cultivadas con medio de cultivo F12K (In Vitro S.A., #cat. ME-038 D.F. México) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Bio West, #cat. US1520 Kansas City, MO). El cultivo se mantuvo en una atmósfera de humedad al 95% y 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. Cuando las células alcanzaron 70-80% de confluencia fueron incubadas con 5 mL de

solución tripsina-EDTA (tripsina al 0.05%; EDTA-4Na al 0.02%) (In Vitro S.A, #cat. EN-008 D.F. México) durante 5 minutos a 37°C, centrifugas a 1500 rpm y finalmente sembradas de nuevo en cajas petri de 75 cm² para continuar con su cultivo.

Para la exposición, se sembraron 2.5x10⁵ células en cajas Petri de 24 cm² y el TiO₂-C fue suspendido en medio F12K suplementado con 10% de SFB (1 mg/mL) y sonicado por 1 hora con 60 Hz para dispersar las NPs. Las células fueron expuestas a concentraciones finales de 0, 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C y las evaluaciones se realizaron a los 4 y 7 días de exposición.

5.4 Morfología celular

Para observar la morfología de las células se realizó una tinción con hematoxilina y eosina. Después de la exposición a TiO₂-C por 7 días, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos y fijadas con formaldehído al 3% por 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Los cubreobjetos fueron sumergidos con alcohol al 70% por 2 minutos y agua destilada por 4 minutos. Los cubreobjetos fueron teñidos con hematoxilina y eosina por 25 y 15 minutos respectivamente. Finalmente los cubreobjetos se lavaron con agua destilada y se montaron sobre un portaobjetos con una solución de glicerol-PBS (3:1) para posteriormente ser observados en el microscopio óptico Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) con un aumento de 100X. Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran las imágenes representativas.

5.5 Reducción de MTT

La reducción de MTT (3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-Dipheniltetrazolio Bromuro) (Sigma-Aldrich, #cat. M2128, USA) se utilizó para determinar la viabilidad celular. Después de los 7 días de exposición al TiO₂-C, 15 000 células fueron sembradas por pozo en una placa de 96 pozos y se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y las células fueron incubadas con 150 µL de MTT disuelto en medio F12K (0.5 mg/mL) a 37 °C por 3 h. Después, el sobrenadante fue desechado y los cristales de formazán formados fueron suspendidos en 100 µL de isopropanol. Finalmente la placa se leyó a una longitud de onda de 540 nm en un lector de ELISA (Thermo Labsystems Multiskan Ascent 354; San Francisco, USA). Se muestran los datos de al menos tres experimentos independientes como media ± error estándar.

5.6 Recubrimiento del TiO₂-C

Con el objetivo de marcar las NPs y observar si son internalizadas en las células, el TiO₂-C fue recubierto con el colorante Rojo de Alizarina S (ARS) (Sigma Aldrich, A5533). Primero, para comprobar que hay interacción entre el TiO₂-C y la ARS se realizó un ensayo de espectrofotometría y uno de sedimentación. Brevemente, para el ensayo de espectrofotometría se realizó una solución de 100 µM de TiO₂-C y 0.9 mM de ARS disueltos en 10 mM de Na₂HPO₄, dicha solución fue incubada a 37°C por 24h. Después, se realizó un barrido espectrofotométrico de 200 a 700 nm usando el espectrofotómetro BioTek (EPOCH; Texas, USA). Para confirmar que la ARS tiene afinidad con el TiO₂-C se realizó un experimento de sedimentación incubando 5 µM de TiO₂-C con 50 µM de ARS en agua a 37°C por 24 h y finalmente se centrifugaron las muestras a 5,000 rpm por 7 minutos en una microcentrifuga, además, se utilizó como control negativo el colorante naranja G, el cual no tiene afinidad por el TiO₂. Se realizaron tres experimentos independientes de cada ensayo y se muestra la imagen representativa de ambos ensayos.

5.7 Internalización del TiO₂-C

Luego de recubrir el TiO₂-C con ARS, fue esterilizado y suspendido con medio F12K suplementado con 10% de SFB para ser utilizado en el cultivo celular. Después de 6 días de exposición al TiO₂-C, 100,000 células fueron sembradas en cubreobjetos previamente esterilizados. Al séptimo día de exposición, fueron fijadas y montadas en portaobjetos. Mediante microscopía confocal (Leica TCS SP-2, Alemania) se tomaron fotos a 590 nm para la excitación y 630 nm la emisión de onda de cinco experimentos independientes y las fotos más representativas son presentadas. Por otro lado, se midió también la internalización del TiO₂-C por citometría de flujo con el citómetro FACScalibur (Beckson Dickinson, San José, CA). La luz dispersada de lado (SSC, por su siglas en inglés) que proporciona el citómetro de flujo ha sido utilizado como un indicador de la internalización de las nanopartículas (Tan and Wang, 2014). El haz de luz que ilumina a la célula es dispersada en ángulos estrechos con respecto al eje del haz y a esto se le llama la luz dispersada hacia adelante (FSC). La luz dispersada en ángulos alrededor de 90° con respecto al eje del haz se llama luz dispersada de lado (SSC). Las intensidades de FSC y SSC fueron proporcionales al tamaño de las células y la granularidad, respectivamente. Brevemente, las células, después de haber sido expuestas a TiO₂-C por 7 días, fueron suspendidas en alcohol al 70% y almacenadas a -20°C por 24 horas, después lavadas tres veces con PBS y suspendidas en 300 µL del buffer FACS flow (BD Biosciences #cat. 342003), que es el buffer que necesita el citómetro. Finalmente fueron leídos 10,000 eventos en el citómetro y se muestran los datos de tres experimentos independientes como media ± error estándar.

5.8 Cuantificación de nitritos y nitratos

Los nitritos y nitratos (NO_x), productos del metabolismo del NO, fueron medidos por la reacción de Griess. Los sobrenadantes de los cultivos celulares a los 4 y 7 días de exposición al $\text{TiO}_2\text{-C}$ fueron recuperados y almacenados a -20°C . El sobrenadante de cada tratamiento (100 μL) fue combinado con 70 μL de los reactivos de Griess (mezcla de proporciones iguales de 0,1% de dihidrocloruro de diamina naftilo en ácido fosfórico 2,5% en ácido fosfórico al 1%). La combinación de reactivos fue agregada en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La concentración de NO_x fue determinada con la ayuda de una curva estándar de NaNO_2 . Las muestras se leyeron a 540 nm y se presentan los datos de tres experimentos independientes como media \pm error estándar.

5.9 Cuantificación de la producción de citocinas

Para cuantificar las citocinas producidas, los sobrenadantes del cultivo celular fueron recuperados a los 4 y 7 días de exposición al $\text{TiO}_2\text{-C}$. La cuantificación de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ y TNF- α se realizó utilizando el kit Bio.plex pro Human Cytokine 8-plex (número de catálogo M50-000007A). Brevemente, se adicionaron 50 μL de las microesferas del kit en cada pozo de una caja de 96 pozos y se lavaron dos veces con 100 μL del buffer del kit. Posteriormente, el sobrenadante de cada tratamiento fue diluido 1:4 con medio de cultivo (libre de SFB) y se agregaron 50 μL por pozo en una caja de 96 pozos, después fueron agitados a 850 ± 50 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se adicionó a cada pozo 25 μL de los anticuerpos del kit y se agitó bajo las mismas condiciones. Finalmente 125 μL del buffer de ensayo del kit se adicionaron en cada pozo y la placa fue leída utilizando el equipo Multiplex Reader (Bio-Plex MAGPIX Multiplex reader, Texas, USA). Los sobrenadantes de tres experimentos independientes se analizaron y los datos se muestran como media \pm error estándar.

5.10 Progresión del ciclo celular

La progresión del ciclo celular se midió mediante citometría de flujo, para ello, después de los 7 días de exposición al $\text{TiO}_2\text{-C}$, las células fueron incubadas con PBS-EDTA 1 mM por 5 minutos a 37°C . Posteriormente, se recuperaron las células y se centrifugaron a 1500 rpm o 0.2 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue retirado y las células se lavaron con PBS tres veces y se centrifugaron de nuevo bajo las mismas condiciones. Para fijar las células, las células fueron resuspendidas en alcohol a 70% previamente enfriado a -20°C y se incubaron a esa misma

temperatura por 24 horas. Después, las células fueron centrifugadas con las mismas condiciones y el precipitado fue suspendido en una solución con yoduro de propidio (500 µg/mL) y (100 µg/mL) de RNAasa suspendidos en PBS-tritón (0.1%) y se leyeron en el citómetro tomando en cuenta 10,000 eventos por tratamiento. Los datos de tres experimentos independientes se muestran como media ± error estándar.

5.11 Análisis estadísticos

Todos los datos fueron presentados como media ± error estándar. Debido a que los datos presentaron distribución Gaussiana, todos los resultados fueron comparados con un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnet para ver diferencias entre medias. Las diferencias con un valor de * $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

Además, se realizó una correlación lineal entre la reducción de MTT y la liberación de citocinas para observar si la concentración de citocinas depende de la viabilidad celular.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización del TiO₂-C

Las NPs utilizadas en este trabajo presentaron fase cristalina de anatasa (Figura 6A), y tuvieron forma de cintas, así como un tamaño primario de más de 1 μm de largo, pero con tamaño nanométrico en lo ancho de las cintas (Figura 6B). El tamaño hidrodinámico, es decir, el tamaño de los aglomerados que formaron las NPs cuando fueron suspendidas en medio F12K fue de 454 ± 1.5 nm y cuando fueron suspendidas en F12K más 10% de SFB el tamaño de los aglomerados fue de 602.2 ± 2 nm (Figura 6C y tabla 2). El potencial Z fue alrededor de -30 mV en medio F12K y medio F12K más 10% de SFB, lo cual indica que las partículas se encuentran interaccionando con las moléculas del medio (Tabla 2; <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1235>).

Tabla 2. Caracterización del TiO₂-C

Partícula	Medio	Potencial Z (mV)	Tamaño hidrodinámico (nm)
TiO ₂ -C	F12K y SFB (10%)	-27.4 ± 1.5	454 ± 1.5
TiO ₂ -C	F12K	-32.2 ± 1.0	602.2 ± 2

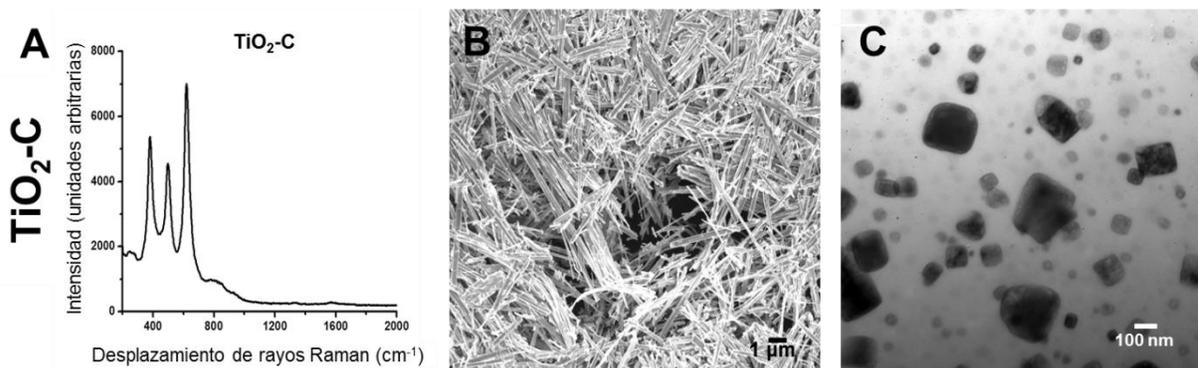


Figura 6. Caracterización del dióxido de titanio en forma de nanocintas (TiO₂-C). **A)** El patrón típico de la fase cristalina anatasa se muestra mediante una espectrofotometría con rayos Raman. **B)** La forma de cintas de las NPs se observa mediante una microscopía electrónica de barrido (SEM). **C)** El tamaño de los aglomerados en medio F12K y 10% de SFB se pudo observar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

6.2 Morfología celular

La morfología celular parece no tener cambios aparentes cuando la célula ha sido expuesta a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días con respecto a las células que no fueron expuestas (Figura 7A y 7B). Sin embargo, cuando han sido expuestas a 5 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días, las células parecen tener una forma más circular (Figura 7B y 7D). Además, pese a que esta no es una técnica apropiada para determinar internalización, la tinción permitió observar que el $\text{TiO}_2\text{-C}$ se encuentra internalizado en las células, alrededor del núcleo (Figura 7B, 7C y 7D).

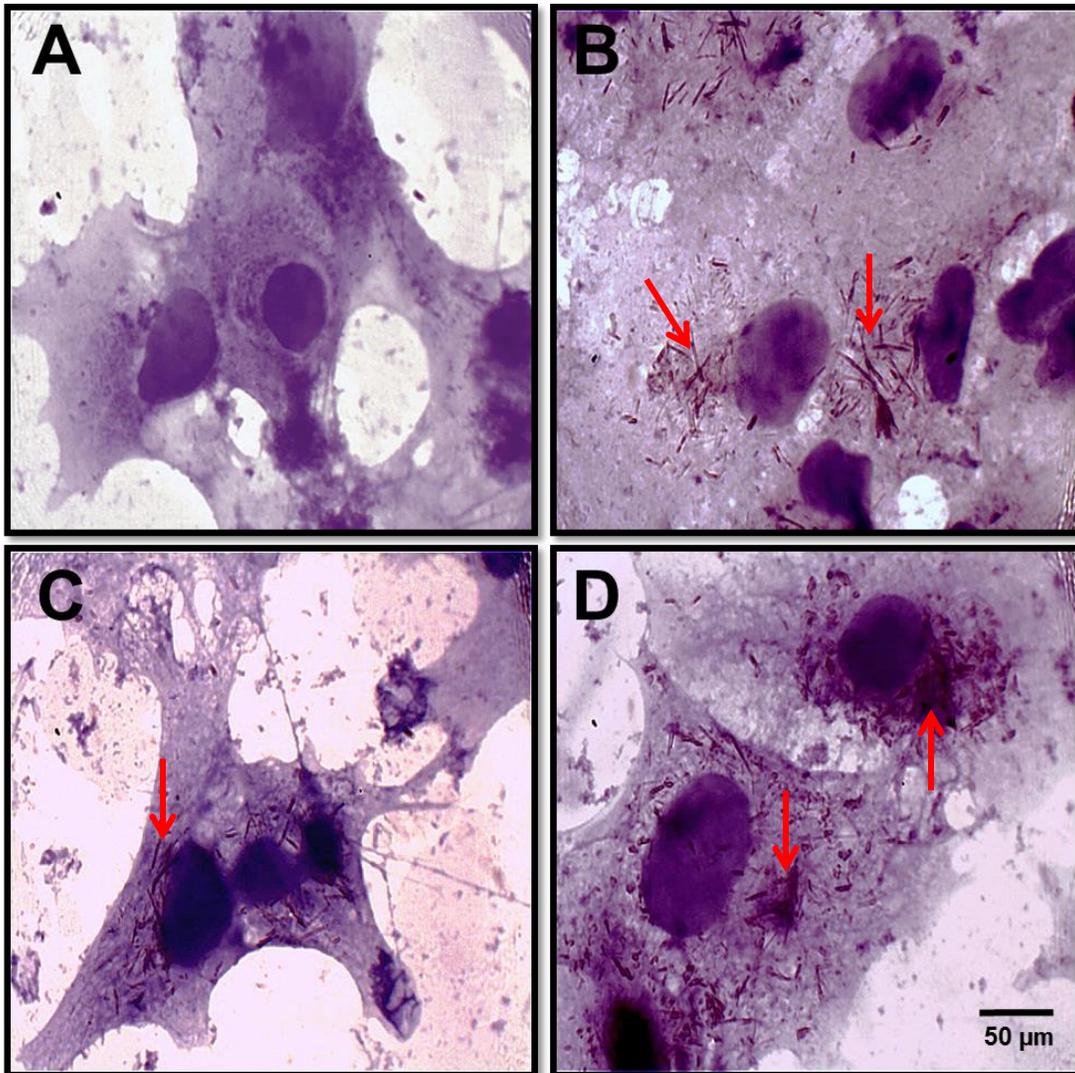


Figura 7. Morfología celular por tinción con hematoxilina y eosina. **A)** Morfología de células no expuestas al $\text{TiO}_2\text{-C}$. **B)** Células expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ **C)** Células expuestas a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ **D)** Células expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días. Las flechas muestran el $\text{TiO}_2\text{-C}$ dentro de las células y alrededor del núcleo. Se realizaron tres experimentos independientes. Aumento 100X.

6.3 Reducción de MTT

La reducción de MTT se utilizó para expresar la viabilidad celular. Los resultados mostraron que en células expuestas a 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días no disminuye la viabilidad celular. Sin embargo, las células que estuvieron expuestas a 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días mostraron disminución en la viabilidad de 27.1%, 27.0%, 64.8%, y 77% (* $p < 0.05$) respectivamente (Figura 8).

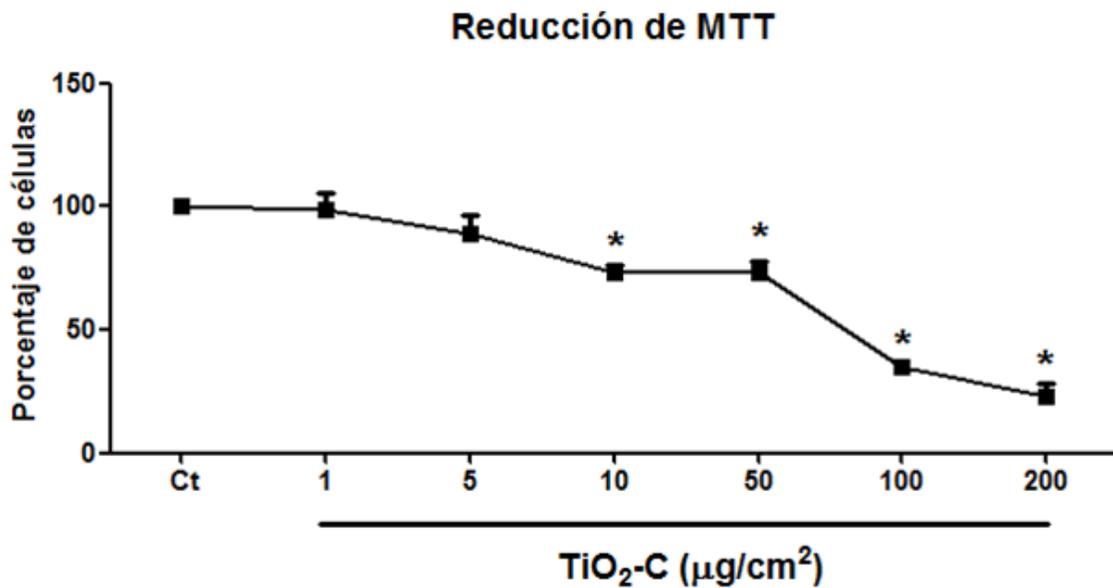


Figura 8. Reducción de MTT. La reducción de MTT se utilizó para expresar el porcentaje de células viables cuando no fueron expuestas (Ct) y cuando fueron expuestas a 1, 5, 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días. Se realizaron al menos tres experimentos independientes y se muestran los datos como media \pm error estándar. * $p < 0.05$ vs Ct.

6.4 Interacción del TiO₂-C con el colorante Rojo de Alizarina S (ARS)

Para mostrar que el TiO₂-C fue internalizado por las células, primero el TiO₂-C fue recubierto con el colorante ARS, el cual es un colorante que emite fluorescencia cuando interacciona con el TiO₂ o el calcio (Thurn *et al.*, 2009). Para mostrar la interacción entre el ARS y el TiO₂-C, se realizó un ensayo de sedimentación y un barrido espectrofotométrico. El ensayo de sedimentación muestra que el solo colorante ARS resuspendido en agua y centrifugado no se precipita en el fondo del tubo (Figura 9A, tubo 2). Por lo contrario, el TiO₂-C sí se precipita en el fondo del tubo cuando ha sido centrifugado bajo las mismas condiciones (Figura 9A, tubo 3). Cuando el TiO₂-C es suspendido con el ARS, el colorante tiene la capacidad de interactuar con el TiO₂-C, razón por la cual ambos son precipitados en el fondo del tubo y el TiO₂-C toma una coloración roja (Figura 9A, tubo 4). Sin embargo esta interacción es específica, pues cuando el TiO₂-C es suspendido con otro colorante (Naranja G) no hay interacción y sólo el TiO₂-C logra precipitarse, quedando el colorante Naranja G en el sobrenadante (Figura 9A, tubo 5). Por otro lado, el barrido espectrofotométrico mostró que cuando el TiO₂-C interacciona con el colorante ARS da diferentes picos de absorción a 350 y 525 nm aproximadamente, a diferencia del barrido espectrofotométrico del TiO₂-C o del ARS por separado que no muestra picos de absorción a dichas longitudes de onda (Figura 9B).

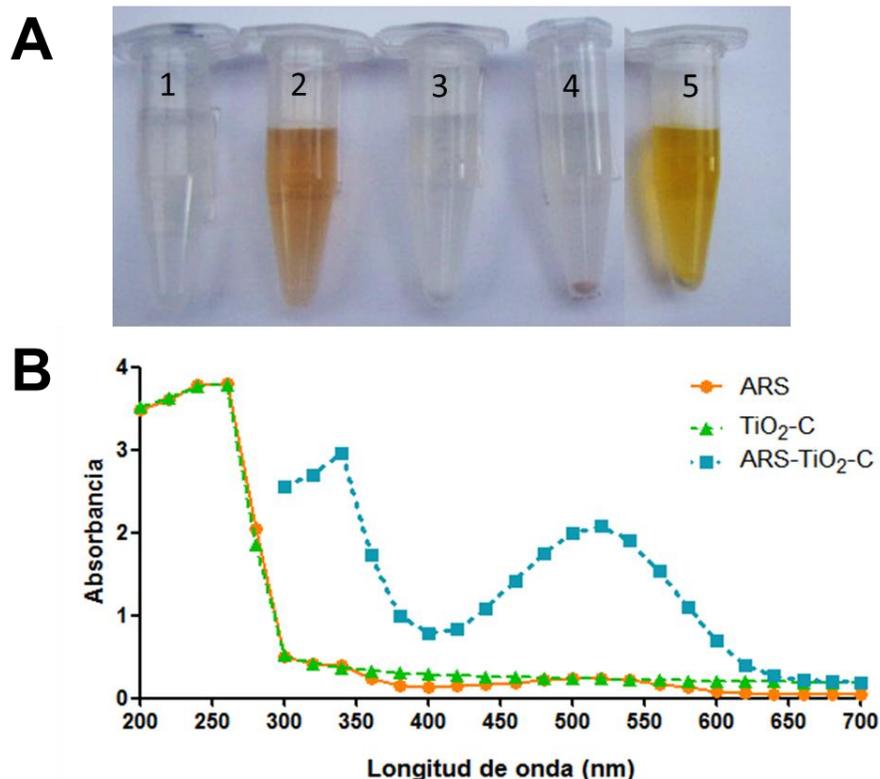


Figura 9. Recubrimiento del TiO₂-C con el colorante Rojo de Alizarina S (ARS). **A)** tubo 1, agua; tubo 2, ARS; tubo 3, TiO₂-C; tubo 4, ARS+TiO₂-C; tubo 5, colorante Naranja G+TiO₂-C (control negativo). **B)** Barrido espectrofotométrico del colorante ARS (línea naranja con círculos), del TiO₂-C (línea verde con triángulos) y del ARS+ TiO₂-C (línea azul con cuadros). Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran las imágenes representativas.

6.5 Internalización del TiO₂-C por microscopía confocal

Para determinar si las NPs están internalizadas en las células, se tomaron microfotografías con el microscopio confocal de las células expuestas al TiO₂-C. Las células mostraron fluorescencia positiva, cuando fueron expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² TiO₂-C recubierto con ARS pero no hubo fluorescencia en las células control (Figura 10A). Por otro lado, para confirmar que la fluorescencia es específica, se tomaron microfotografías de células expuestas a solo el colorante ARS y de células expuestas a solo la concentración más alta del TiO₂-C y dichas microfotografías por una parte no mostraron fluorescencia (Figura 10B) y por otro lado muestra que el colorante ARS no se internaliza por sí solo.

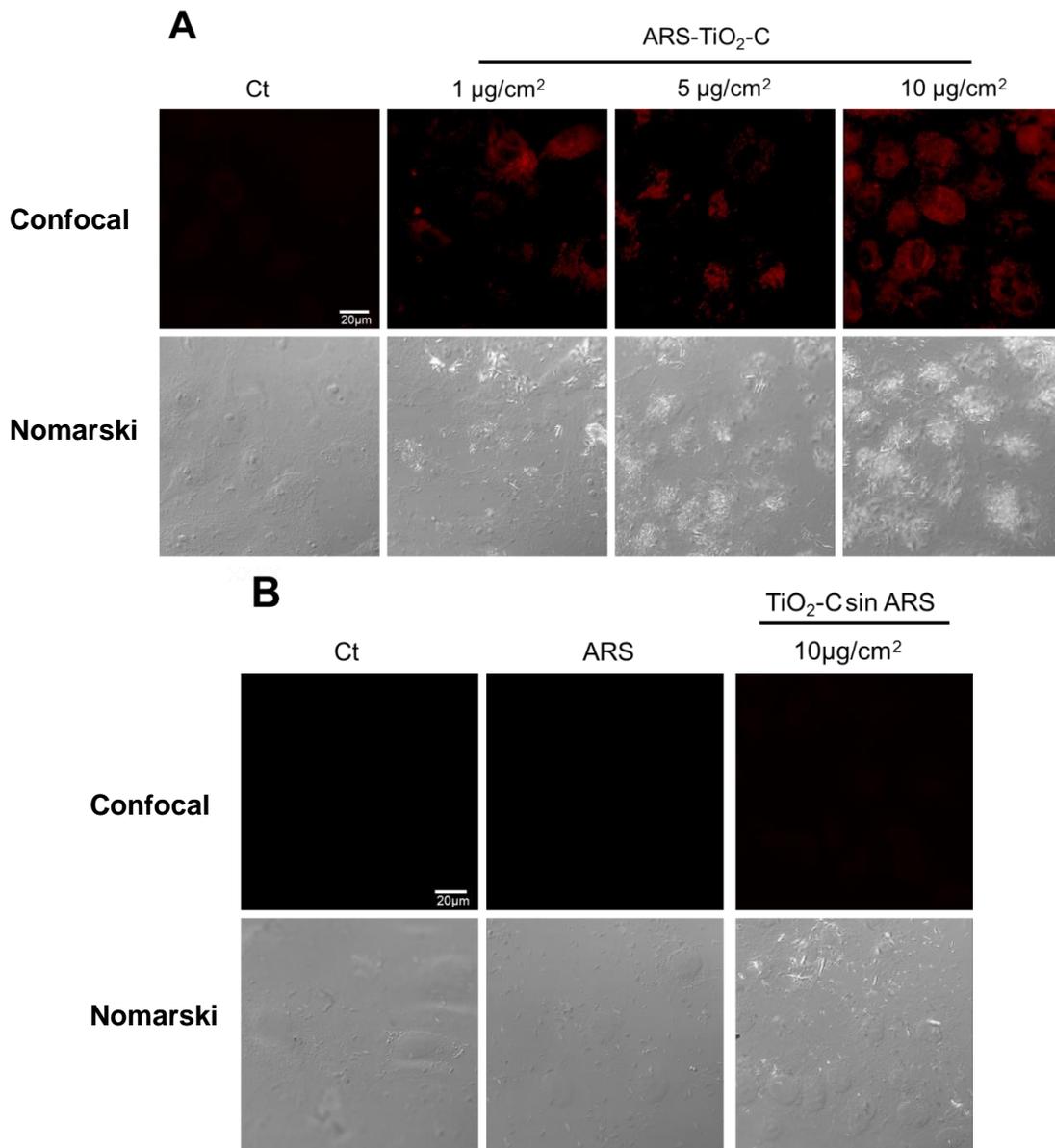


Figura 10. Internalización del TiO₂-C mediante microscopía confocal y de contraste interdifereencial (Nomarski). **A)** Células no expuestas (Ct) y células expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C recubierto con ARS durante 7 días. **B)** Células Ct y células tratadas con solo ARS y solo TiO₂-C. Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran las imágenes representativas. Aumento 63X.

6.6 Internalización del TiO₂-C y cambios morfológicos por citometría de flujo

La hipótesis de que la internalización del TiO₂-C está relacionada con el aumento en la granularidad y disminución del tamaño celular fue confirmada mediante citometría de flujo. Las gráficas que arroja el citómetro mostraron que la población normal, es decir, la población de las células no expuestas al TiO₂-C cambió cuando fue expuesta al TiO₂-C conforme aumentó la concentración de TiO₂-C, para ser más precisos, la población se fue desplazando hacia arriba y hacia la izquierda, lo cual indica que las células se hicieron más granulosas y más pequeñas (Figura 11A).

El porcentaje de células que aumentaron su granularidad fueron las células expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del TiO₂-C con 20%, 56.9% y 50.7% respectivamente (* $p < 0.0001$; Figura 11B). Por otro lado, el porcentaje de células que disminuyeron de tamaño fueron las células expuestas a 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ con 33.2% y 51.5% respectivamente (* $p < 0.0001$; Figura 11C).

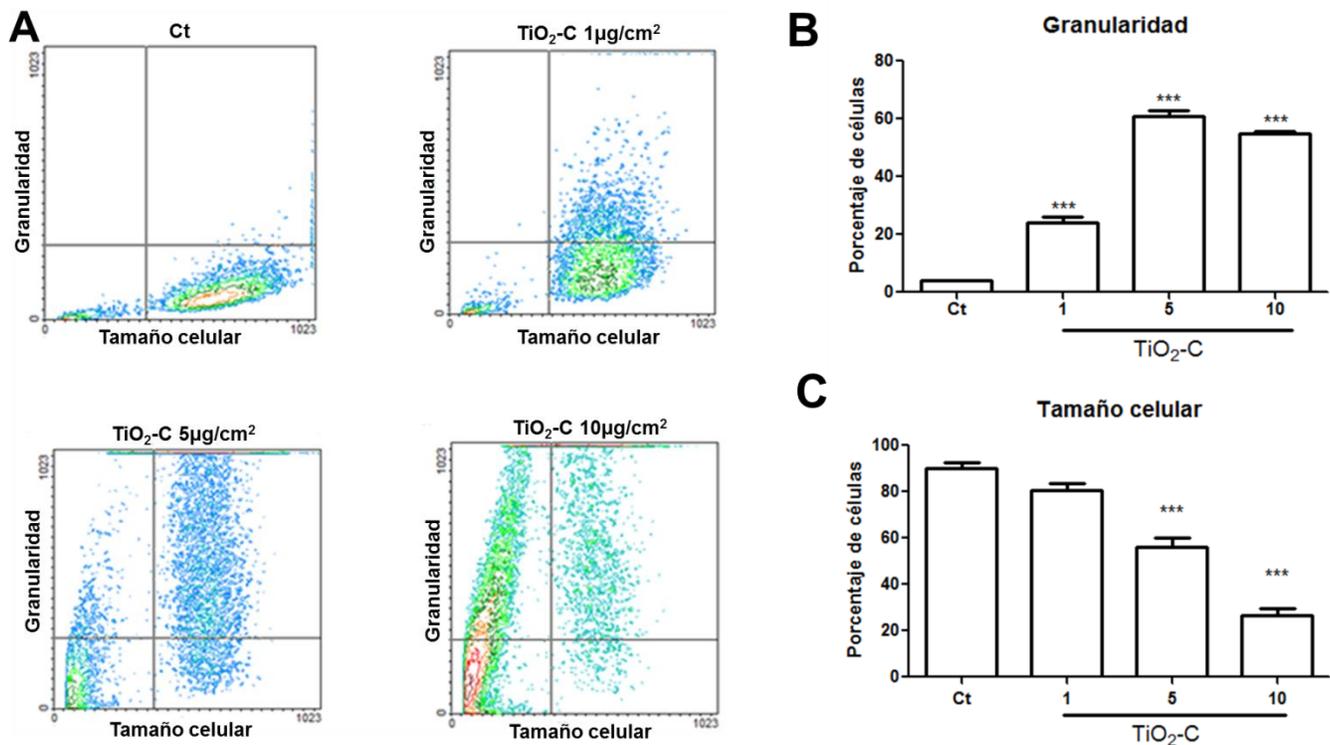


Figura 11. Internalización del TiO₂-C por citometría de flujo. **A)** Gráficas representativas de la citometría de flujo de células no expuestas (Ct) y células expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C por 7 días. **B)** Porcentaje de células con aumento en la granularidad. **C)** Porcentaje de células con disminución en el tamaño celular. Se leyeron un total de 10, 000 células y se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados se muestran como media \pm error estándar, *** $p < 0.0001$ vs Ct.

6.7 Cuantificación de NO_x

Para conocer si hay una relación entre la producción de NO_x y el proceso inflamatorio, se cuantificaron los nitritos y nitratos en los sobrenadantes de los cultivos. La producción de NO_x no mostró cambios en las células expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C durante 4 días (Figura 12A), a diferencia de las células expuestas durante 7 días, las cuales mostraron un incremento del 24.7% (*p<0.05) y 49.4% (*p<0.001) en las concentraciones de 1 y 10 µg/cm² de TiO₂-C respectivamente (Figura 12B).

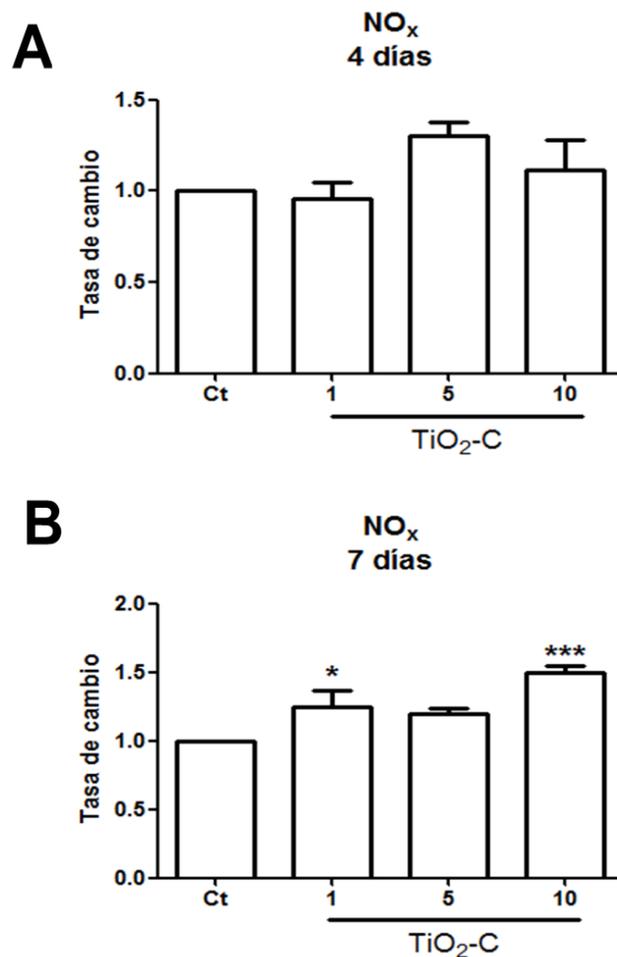


Figura 12. Cuantificación de NO_x por reacción de Griess. **A)** Liberación de NO_x en células no expuestas (Ct) y células expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C por 4 días. **B)** Liberación de NO_x en células no expuestas (Ct) y células expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C por 7 días. Se realizaron 4 experimentos independientes y los resultados se muestran como media ± error estándar, *p<0.05 y ***p<0.0001 vs Ct.

6.8 Producción de citocinas

Con la finalidad de conocer qué citocinas participan en el proceso inflamatorio inducido por la exposición al TiO₂-C, al cuarto y al séptimo día de exposición se cuantificaron algunas citocinas que participan en la proliferación (IL-2, GM-CSF), relacionadas con el proceso pro-inflamatorio (IL-6, TNF- α , IFN- γ) y anti-inflamatorio (IL-4, IL-8, IL-10). Además, estas citocinas están relacionadas con algunas patologías del pulmón (Cho *et al.*, 2011). Las citocinas relacionadas con la proliferación celular mostraron que la liberación de IL-2 aumentó 11.4, 15.1 y 14.9% (*p<0.05) en células expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C en el día 4, mientras que en el día 7 la liberación bajó el 33.4% (*p<0.05) en la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C (Figura 13A), mientras que el GM-CSF mostró 40.8 y 53.9% (*p<0.05) de aumento en las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C respectivamente, a los 4 días de exposición, pero no hubo cambios al día 7 de exposición (Figura 13B).

En cuanto a las citocinas pro-inflamatorias, la liberación de IL-6 aumentó 11.3, 16.0 y 14.4% (*p<0.05) en las células expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C a los 4 días de exposición. Por lo contrario, a los 7 días de exposición la liberación de IL-6 disminuyó 52.1% (*p<0.05) en las células expuestas a la concentración más alta (Figura 14A). Este comportamiento también fue observado en TNF- α y IFN- γ , pues TNF- α aumentó 12.0, 15.9 y 14.5% (*p<0.05) a los 4 días de exposición en las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C respectivamente, pero bajó 35.7% (*p<0.05) en el séptimo día de exposición en células expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C (Figura 14B), mientras que el IFN- γ aumentó 9.0, 13.5, 12.9% (*p<0.05) cuando las células fueron expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C a los 4 días de exposición, y bajó 44.7% (*p<0.05) a los 7 días de exposición en células expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C (Figura 14C).

Con respecto a las citocinas anti-inflamatorias, la liberación de IL-4 aumentó 13.0, 17.2, y 16.3% (*p<0.05) cuando las células se expusieron a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C durante 4 días, mientras que la liberación de esa misma citocina disminuyó 34.8% (*p<0.05) en las células expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C durante 7 días (*p<0.05; Figura 15A). La liberación de IL-8 solo mostró una disminución del 64.1% (*p<0.05) después de haber expuesto a las células a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂-C durante 7 días (Figura 15B). Y finalmente la IL-10 no mostró cambios en ninguna concentración ni en ninguno de los dos días (Figura 15C).

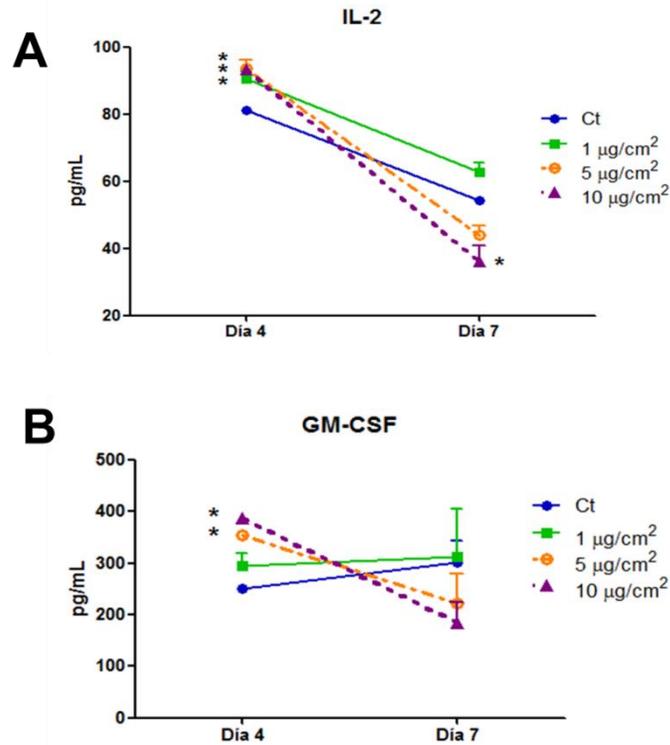


Figura 13. Cuantificación de la producción de citocinas IL-2 y GM-CSF que participan en la proliferación celular. **A)** Producción de IL-2 y **B)** Producción de GM-CSF en células no expuestas (Ct) y células expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C por 4 y 7 días. Se realizaron 3 experimentos independientes y los resultados se muestran como media ± error estándar, *p<0.05 vs Ct.

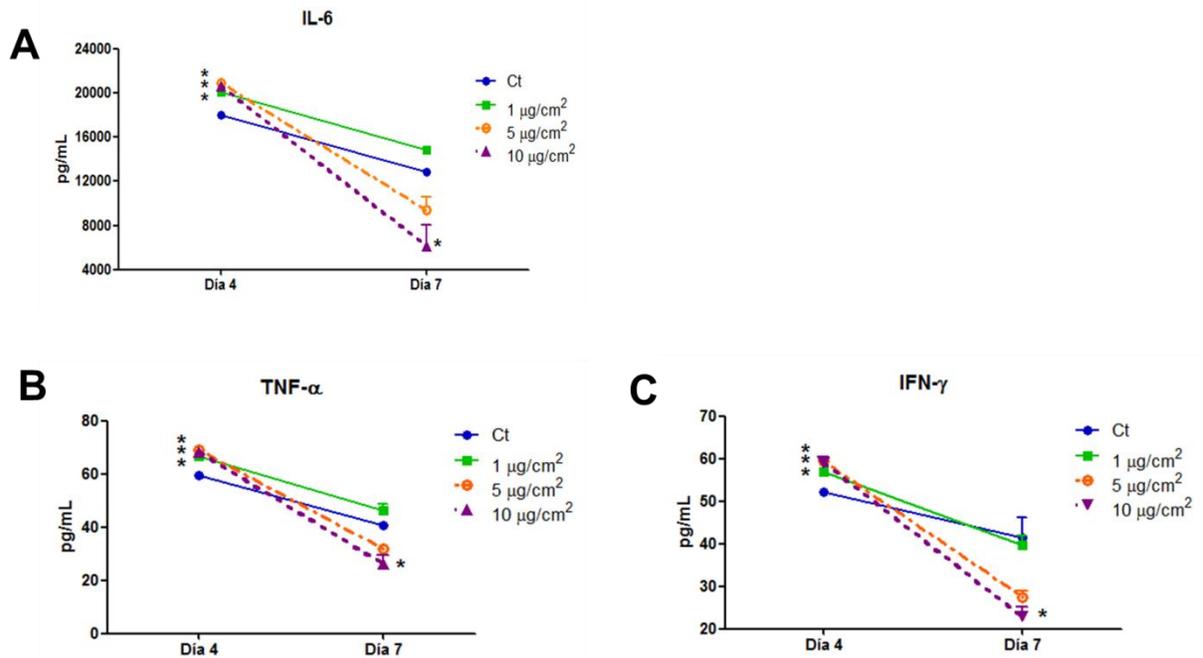


Figura 14. Cuantificación de la producción de citocinas IL-6, TNF-α y IFN-γ que participan en el proceso pro-inflamatorio. **A)** Producción de IL-6 **B)** Producción de TNF-α y **C)** Producción de IFN-γ en células no expuestas (Ct) y células expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C por 4 y 7 días. Se realizaron 3 experimentos independientes y los resultados se muestran como media ± error estándar, *p<0.05 vs Ct.

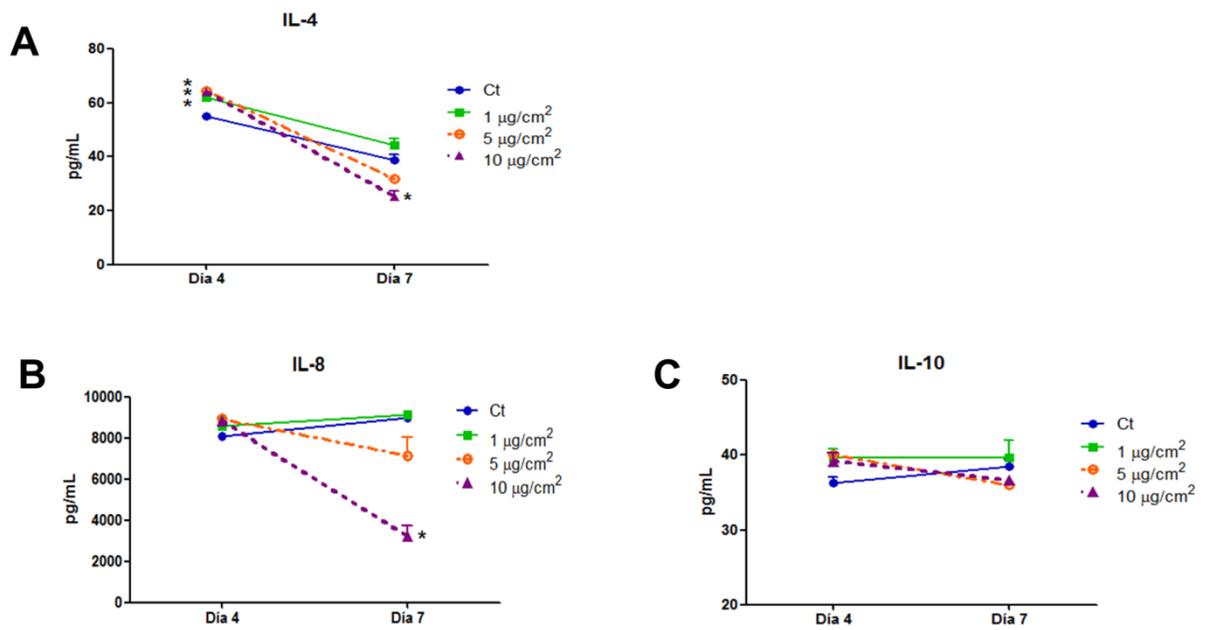


Figura 15. Cuantificación de la producción de citocinas IL-4, IL-8, IL-10 que participan en el proceso anti-inflamatorio. **A)** Producción de IL-4 **B)** Producción de IL-8 y **C)** Producción de IL-10 en células no expuestas (Ct) y células expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C por 4 y 7 días. Se realizaron 3 experimentos independientes y los resultados se muestran como media ± error estándar, *p<0.05 vs Ct.

6.9 Progresión del ciclo celular

Con la finalidad de saber si la exposición al TiO₂-C y los efectos que causa afectan la progresión del ciclo celular, se evaluó mediante citometría celular. Las células expuestas a 1 µg/cm² de TiO₂-C durante 7 días, no mostraron cambios en ninguna de las fases del ciclo celular (Figura 16B) en comparación con la distribución que presentaron las células no expuestas (Figura 16A). En cuanto a las células expuestas a 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C durante 7 días mostraron disminución de 24.5% (*p<0.05) y 42.5% en la fase G1 (*p<0.01) respectivamente comparando contra las células control y considerando las células control como el 100% (Figura 16C y 16D). Además, la fase S del ciclo celular también mostró también una disminución del 44.9 y 38% (*p<0.05) en células expuestas a 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C durante 7 días respectivamente comparando contra las células control, considerando las células control como el 100% (Figura 16C y 16D). Por lo contrario, la fase G2/M incrementó en células expuestas a las dos concentraciones más altas, es decir, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂-C durante 7 días con un aumento del 15.4 y 14.5% (*p<0.05) respectivamente comparando contra las células control, considerando las células control como el 100% (Figura 16C y 16D).

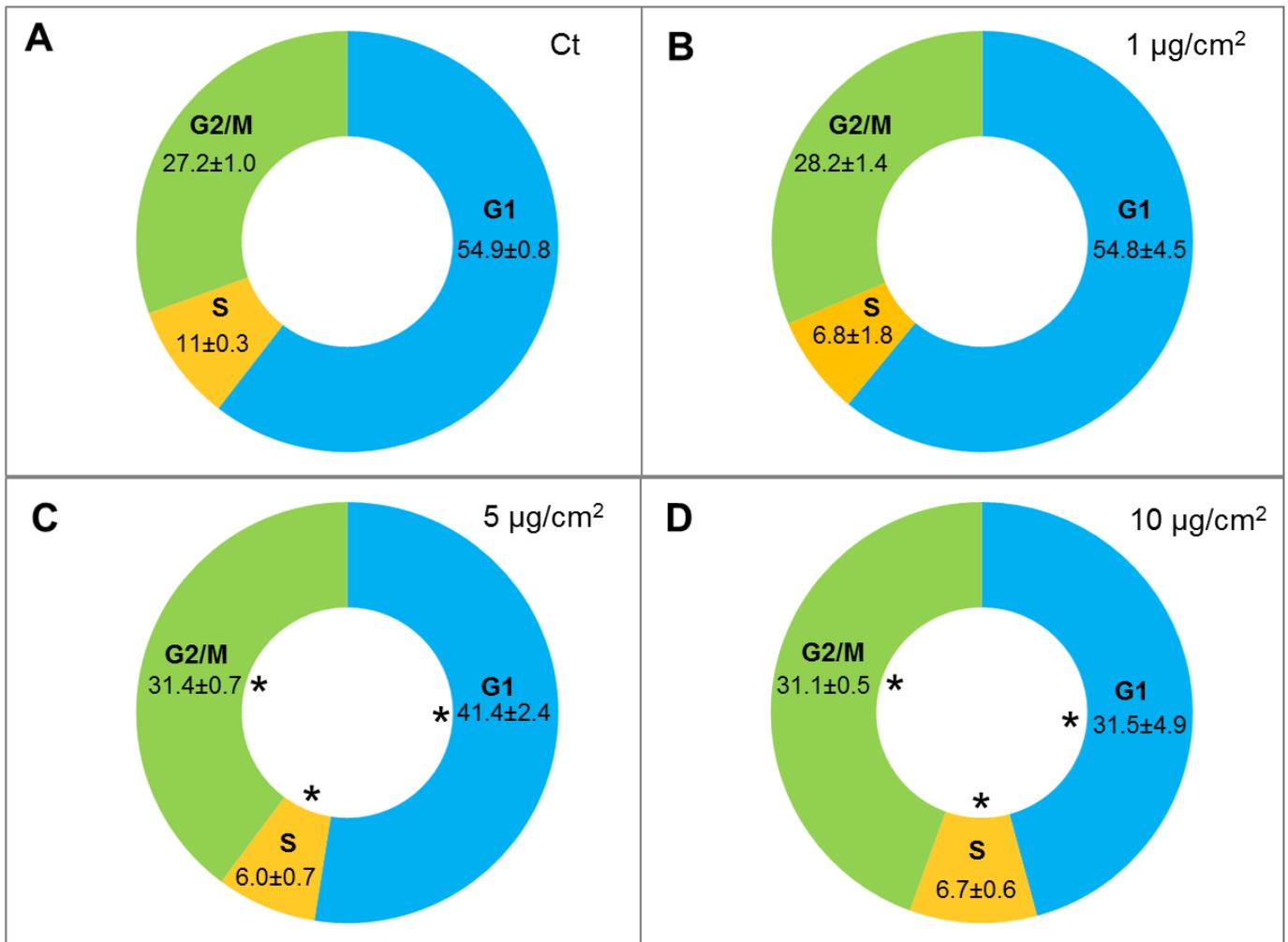


Figura 16. Progresión del ciclo celular. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular cuando **A)** no fueron expuestas (Ct) **B)** cuando fueron expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. **C)** cuando fueron expuestas a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. **D)** cuando fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 7 días. Se realizaron 3 experimentos independientes y los resultados se muestran como media \pm error estándar del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, * $p < 0.05$ vs Ct.

6.10 Correlación entre la liberación de citocinas y la reducción de MTT

Con la finalidad de saber si la disminución en la liberación de citocinas al día siete de exposición se relaciona con la disminución en la reducción de MTT, se realizó una correlación lineal donde ningún dato de la producción de citocinas correlacionó con la disminución en la reducción de MTT (Figura 17A, 17B; Tabla 3). A diferencia de lo anterior, el tamaño celular sí correlaciona con la disminución en la reducción de MTT, es decir, la poca reducción de MTT tiene que ver con el pequeño tamaño que las células adoptaron a consecuencia del tratamiento con TiO₂-C (Figura 17C).

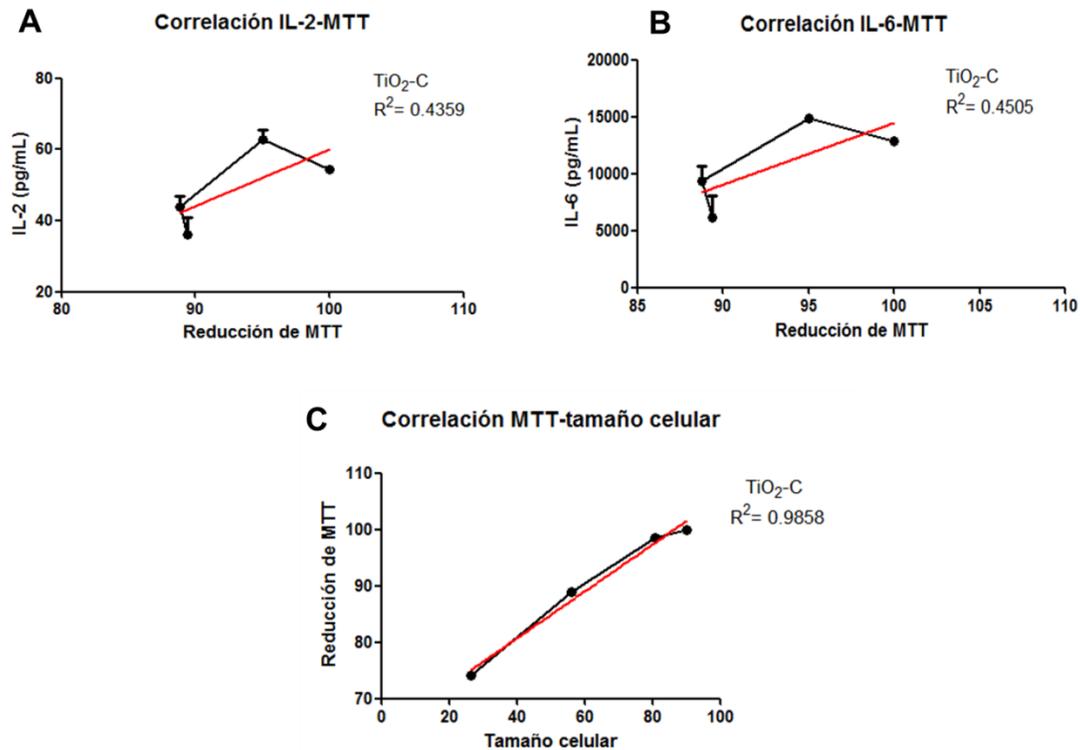


Figura 17. Correlaciones representativas entre los efectos causados por la exposición al TiO₂-C. **A)** Correlación entre la liberación de IL-2 y la reducción de MTT **B)** Correlación entre la liberación de IL-6 y la reducción de MTT. **C)** Correlación entre el tamaño celular y la reducción de MTT.

Tabla 3. Correlación entre la producción de citocinas y la reducción de MTT al séptimo día de exposición.

Interleucina en correlación con la reducción de MTT	IL-2	GM-CSF	IL-6	TNF- α	IFN- γ	IL-4	IL-8	IL-10
R ² entre los efectos	0.4359	0.7186	0.4505	0.8539	0.8441	0.5293	0.5096	0.5950

7. DISCUSIÓN

La nanotecnología se ha desarrollado fuertemente en el siglo XXI y el uso de los nanomateriales en nuevas aplicaciones ha incrementado exponencialmente (Li *et al.*, 2014). La utilización de nanomateriales ha ofrecido mejores resultados en los productos haciéndolos más atractivos en el mercado que los productos que están hechos o contienen partículas en tamaño micrométrico. Además, la tendencia a nivel mundial es dejar de sintetizar partículas micrométricas y sustituirlas por partículas nanométricas. Se estima que para el año 2020 haya una producción de 500,000 toneladas de nanopartículas de TiO₂ por año tan solo en los EE.UU. (Robichaud *et al.*, 2009). Inclusive, han comenzado a sintetizarse partículas en el intervalo sub-nanométrico con la misma finalidad, es decir, mejorar los productos u optimizar las funciones de algunos aparatos (Barea *et al.*, 2005; Huc y Pelzer, 2008; Dollinger *et al.*, 2014).

El TiO₂ es hasta ahora el nanomaterial con mayor producción a nivel mundial aparte de ser uno de los nanomateriales más baratos en el mercado y por ende más costeable para la industria, por lo tanto es importante considerar la toxicidad que es capaz de inducir, principalmente cuando se está expuesto a este nanomaterial por vía inhalatoria, pues se ha observado que es la vía de exposición que muestra más susceptibilidad (IARC, 2010; Weir *et al.*, 2012; Ponce, 2013).

En el año 2006 la IARC clasificó el TiO₂ en el grupo 2B como “**posible carcinógeno para humanos**”. Por su parte, la NIOSH lo clasificó como “**potencial carcinógeno ocupacional**” en el año 2011. Sin embargo, el hecho de que aún no sea clasificado como carcinógeno es por falta de evidencia y que dicha evidencia simule exposiciones reales en humanos, por esa razón las concentraciones utilizadas en este trabajo son bajas y durante un periodo relativamente largo, pues la mayoría de los estudios realizados hasta ahora son con concentraciones o dosis altas y los tiempos de exposición son de 24, 48 y 72 horas, es decir, tiempos cortos (Warheit, 2013).

Uno de los tejidos más susceptible a daños inducidos por la exposición inhalatoria al TiO₂ NPs es el pulmón. Por esta razón utilizamos células provenientes de este tejido. Sin embargo, aún falta información que muestre cómo la exposición a TiO₂-C contribuye en patologías que llevan al desarrollo de cáncer pulmonar. Algunos procesos celulares que podrían estar participando son la inflamación constante y cambios en la progresión del ciclo celular.

El hecho de que el pulmón sea el órgano más afectado cuando se está expuesto por vía inhalatoria al TiO₂ es porque las NPs logran llegar a diferentes regiones del tracto respiratorio y se ha visto que el 50% del TiO₂ respirado llega a regiones alveolares (Simkó *et al.*, 2010). Una vez que el TiO₂ está en las regiones alveolares, es internalizado por las células y esto promueve que el TiO₂ sea acumulado por el pulmón, pues no se puede metabolizar ni degradar. Un estudio demostró que

ratas expuestas a una única dosis de 6.0 mg/kg de TiO₂ por vía intratraqueal retienen en el pulmón el 31% del Ti administrado incluso después de 26 semanas de haber sido administradas (Shinohara *et al.*, 2014). En este trabajo se eligió a las células epiteliales de pulmón de la línea celular A549 porque son neumocitos tipo II que conforman aproximadamente el 7% de la superficie alveolar (Müller *et al.*, 2010), pero a pesar de cubrir menor superficie que los neumocitos tipo I, hay más cantidad de neumocitos tipo II en la región alveolar (Foster *et al.*, 1998).

Se ha visto que la toxicidad está aunada a la forma, la carga, el tamaño entre otras características de las partículas, por eso la caracterización es tan importante en cada estudio. La caracterización del TiO₂-C en este trabajo mostró que cuando estas NPs son suspendidas en medio F12K más 10% de SFB el potencial Z, que es una medida de la repulsión o atracción entre las nanopartículas y las moléculas del medio de dispersión, fue de aproximadamente -30 mV; este valor, indica que las NPs se encuentran interaccionando con las moléculas del medio de cultivo. Por lo contrario, cuando el valor del potencial Z es cercano a cero, significa que no interacciona con las moléculas del medio, razón por la cual las NPs se precipitarían rápidamente. Además, cuando el TiO₂-C es suspendido en este mismo medio forma aglomerados en el intervalo de 450-600 nm.

Por otro lado, se ha observado que el mecanismo por el cual el TiO₂-C induce toxicidad es muy similar al de los asbestos, los cuales ya han sido ampliamente estudiados y dados los resultados se han clasificado en el grupo 1 como cancerígenos para humanos por la IARC (2009) y la EPA (2009). La similitud en cuanto a la toxicidad es porque ambas partículas son internalizadas por macropinocitosis en macrófagos alveolares, y porque al ser internalizadas rompen los fagolisosomas, liberan catepsina B y activan el inflammasoma NLRP3 (Hamilton *et al.*, 2014; Stern *et al.*, 2012; Tschopp *et al.*, 2010). Hasta ahora no había ningún estudio que reportara que los neumocitos tipo II también tienen la capacidad de internalizar el TiO₂-C y distribuirlo en el citoplasma.

La macropinocitosis es el proceso por el cual las células internalizan fluidos y sus contenidos. Es por este proceso que las NPs se internalizan predominantemente, además, durante este proceso las NPs pueden o no interaccionar con la membrana celular (Adjei *et al.*, 2014). Cuando la célula realiza este proceso de macropinocitosis se forman vesículas que van a contener lo que se internalizó, esas vesículas se fusionan después con los lisosomas para formar los fagolisosomas e intentar degradar lo que se ha internalizado (Fröhlich, 2012). Lo anterior, no ocurre cuando la célula internaliza TiO₂-C, pues debido a su forma no permite la formación de los fagolisosomas y por su composición química tampoco puede ser degradado, razón por la cual finalmente el TiO₂-C se encuentra interaccionando directamente con el citoplasma.

La activación del inflammasoma está caracterizada por la liberación de IL-1 β e IL-18 y esto ha sido ampliamente reportado para los asbestos, pero recientemente se ha mostrado que también el TiO₂-C tiene la capacidad de activarlo desde las primeras 24 horas de exposición (Hamilton *et al.*, 2009). Hay otras características en la que también son similares ambas partículas: 1) las cintas con mayor longitud son más tóxicas que las cintas más cortas 2) se acumulan en el pulmón 3) en ambos casos se llevan las partículas a los nódulos linfáticos, lo cual limpia el pulmón (Hillegass *et al.*, 2013).

La toxicidad inducida por la exposición a NPs, está íntimamente relacionada con la internalización de estas NPs por las células. Por esta razón quisimos observar si las células A549 tienen la capacidad de internalizar el TiO₂-C, pues a pesar de que ya se ha reportado que estas células logran internalizar el TiO₂-E, la forma de la NPs tiene gran influencia en la internalización (Kettler *et al.*, 2013).

Con ayuda del colorante fluorescente ARS, el cual tiene afinidad por el TiO₂-C, marcamos las NPs para poder observarlas mediante microscopía confocal. El ARS ha sido utilizado anteriormente para marcar los depósitos de calcio (Puchtler *et al.*, 1969; Papalexidou *et al.*, 2004), pero recientemente se ha utilizado para marcar las NPs y poder observar si son internalizadas por las células (Thurn *et al.*, 2009). La afinidad del ARS con el TiO₂-C ocurre en los grupos hidroxilos del ARS que se unen al TiO₂, y este es el mismo proceso por el cual se une al calcio. La afinidad de este colorante con el TiO₂-C fue confirmado en nuestros resultados, pues cuando se hace un barrido espectrofotométrico del TiO₂-C y el ARS juntos absorbe a diferente longitud de onda que cuando están por separado. Similarmente, en el ensayo de sedimentación, cuando el TiO₂-C y el ARS son puestos en el mismo tubo interaccionan y se precipitan, a diferencia cuando solo el colorante es suspendido en agua, pues pese a ser centrifugado no se precipita.

El hecho que el TiO₂-C haya sido recubierto nos permitió observar que las células (A549) tuvieron la capacidad de internalizar las NPs de TiO₂-C, lo cual no había sido reportado para esta línea celular. Las NPs internalizadas se encontraron distribuidas en el citoplasma, pero no lograron entrar al núcleo, lo cual es común que ocurra en muchos tipos celulares, por ejemplo en células de epitelio bronquial de la línea celular BEAS-2B, las cuales internalizan el TiO₂-E en vacuolas solo en el citoplasma (Bhattacharya *et al.*, 2008). No obstante, en algunos tipos celulares como las células epidermales de la línea celular A431 logran internalizar el TiO₂-E en el citoplasma y en el núcleo (Shukla *et al.*, 2011), lo cual sugiere que no sólo el tipo de NP influye en la respuesta celular, sino también el tipo de célula que esté siendo expuesta a este nanomaterial.

Además, se observó que la internalización de las partículas indujo disminución del tamaño celular y aumento en la granularidad de las células. El cambio en el tamaño celular probablemente se deba a un reacomodo en la estructura del citoesqueleto como se ha observado en otros trabajos (Da Rosa,

2013). Se ha observado también que la expresión de los genes relacionados con este organelo cambia por la exposición a $\text{TiO}_2\text{-E}$ y $\text{TiO}_2\text{-C}$ (Sheng *et al.*, 2014; Tilton *et al.*, 2013). En cuanto a la granularidad, cuando las células son leídas en el citómetro, el haz de luz que ilumina a la célula es dispersado en diferentes ángulos, este es el fundamento de la granularidad, de manera que al aumentar la granularidad es porque está aumentando el contenido intracelular (Toduka *et al.*, 2012), debido a la internalización de las NPs. Una desventaja de este método, es que el haz de luz no sólo choca con las NPs internalizadas sino también con las que se encuentran unidas a la membrana celular, de manera que no se distingue entre las NPs que están dentro y las que están fuera de la célula (Allouni *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). No obstante, con el ensayo de ARS pudimos confirmar que las NPs son internalizadas y no sólo están en la membrana.

Un dato importante que hay que considerar es que la internalización de las NPs depende de la concentración a las que son expuestas las células, y que la internalización es incesante al menos en las células A549 (Foster *et al.*, 1998; Stearns, 2001). Otros puntos a considerar es que las células A549 distribuyen las NPs internalizadas durante la división celular, es decir, cuando la célula se divide, ambas células hijas se llevan el 50% de las NPs internalizadas (Kim *et al.*, 2011) y durante la división celular no hay internalización de NPs (Wang *et al.*, 2013).

En cuanto al $\text{TiO}_2\text{-C}$, los únicos reportes que muestran la internalización son realizados en macrófagos alveolares extraídos de ratones C57BL/6 expuestos a estas NPs y ellos reportan que las células intentan formar fagolisosomas para internalizar el $\text{TiO}_2\text{-C}$, sin embargo estas estructuras son aberrantes, es decir, no logran formarse (Hamilton *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2009). Probablemente la larga longitud de las cintas sea un factor importante, que esté impidiendo la formación de los fagolisosomas.

Lo anterior, podría estar ligado a la viabilidad celular, pues al estar las partículas libres y no en vesículas, están interactuando con todo el contenido citoplasmático e induciendo mayor daño celular. Los resultados mostraron que a concentraciones bajas (1 y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no hay ningún efecto sobre la viabilidad, sin embargo a partir de concentraciones de 10 y hasta 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ las células mostraron disminución en la viabilidad después de 7 días de exposición. Lo anterior, concuerda con el estudio realizado en macrófagos alveolares donde los expusieron a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de $\text{TiO}_2\text{-C}$ por 24 horas y vieron disminución en la viabilidad. Cabe mencionar que estas partículas se internalizan incluso desde la hora y media de estar en contacto con las células (Hamilton *et al.*, 2014), además que este estudio es el único que reporta cambios en la viabilidad en células expuestas a $\text{TiO}_2\text{-C}$.

Por otro lado, el óxido nítrico está íntimamente relacionado con la respuesta pro-inflamatoria, el cual es sintetizado por diferentes células pero principalmente las endoteliales, células inflamatorias y células del tracto respiratorio (Gelb *et al.*, 2012). En un estudio donde reportan el transcriptoma y el

proteoma de células expuestas a TiO₂-C hubo proteínas y genes activados que están relacionados con la producción de NO (Tilton *et al.*, 2013). Lo anterior concuerda con nuestros resultados, pues se observó que al día 7 de exposición hubo un aumento en la producción de NO_x en las concentraciones de 1 y 10 µg/cm². El hecho que la exposición a TiO₂-C induzca aumento en la producción de NO_x, indica que en las células expuestas a este nanomaterial previamente desencadenaron un proceso inflamatorio, lo cual se refuerza con la liberación de citocinas, en especial las pro-inflamatorias.

La producción de citocinas tiene lugar durante un corto periodo, que está sometida a una estricta regulación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Este estricto control es debido a que las citocinas son moléculas capaces de actuar en concentraciones de picogramos, y una súper producción podría causar graves daños celulares, por ejemplo, los asbestos mantienen la inflamación constante lo que lleva al tejido a una fibrosis y posteriormente a cáncer de pulmón. Muchas de las citocinas presentan secuencias ricas en AU en la región 3' de su RNA mensajero no traducido que facilitan su rápida degradación, evitando así la sobreproducción de citocinas y por consecuencia regulando las respuestas biológicas (Gayo *et al.*, 2009).

En los resultados se observa que a los 4 días de exposición al TiO₂-C la liberación de citocinas aumenta, pero al día 7 de exposición la liberación de esas mismas citocinas baja incluso por debajo del basal en la concentración más alta (10 µg/cm²). Al principio se pensó que la disminución en la liberación de citocinas podría estar relacionada con la disminución en la viabilidad de las células, para comprobarlo se realizó una correlación lineal la cual mostró que no hay correlación entre la disminución de viabilidad y la disminución de citocinas. Por esta razón, otra posible explicación a la disminución de citocinas es que las células se encuentren en un estado de anergia.

Se considera que la anergia de células T es un mecanismo de tolerancia, por el cual las células permanecen inactivas funcionalmente durante períodos prolongados, incluso sin división celular. Si bien la sobrevivencia de las células que entran en anergia no es la normal, es mucho mayor que la de células que han iniciado el proceso de apoptosis. Así mismo, aunque algunos de los pasos bioquímicos que participan en la apoptosis inducida por antígeno y en la anergia se superponen, la activación de caspasas no tiene lugar durante la anergia. El mantenimiento del estado de anergia puede requerir o no la persistencia del antígeno y puede ser o no reversible. Además, la anergia está íntimamente relacionada con la detención del ciclo celular (Schwartz, 2003).

Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, pues se observó una acumulación en la fase G2/M de las células expuestas a 5 y 10 µg/cm² después de los 7 días de exposición. Si bien prácticamente no hay estudios que evalúen el ciclo celular de células expuestas a TiO₂-C, sí

hay estudios con células que han sido expuestas a TiO₂ en forma de fibras y asbestos en los cuales se han observado resultados similares.

En células cervicales expuestas a 2, 5 y 10 µg/mL de TiO₂ en forma de fibras, presentaron aumento en la fase G2/M y disminución de la fase G1 (Ramkumar *et al.*, 2012) mientras que en células mesoteliales pleurales expuestas a 5 y 10 mg/cm² de asbestos recubiertas de vitronectina, que es un adhesivo de proteínas del suero, se observó que hubo una acumulación de las células en la fase G2/M (Liu *et al.*, 2000), lo cual indica otra similitud entre el TiO₂-C y los asbestos.

El hecho de que se acumulen en la fase G2/M significa que están siendo detenidas en el punto de control de esa fase. Los puntos de control del ciclo celular son un importante mecanismo que se asegura la adecuada ejecución del ciclo celular. Uno de los puntos de control se encuentra en la fase G2/M del ciclo celular y este se encarga de bloquear que la célula entre a mitosis cuando hay daño en el DNA. Cuando ha habido daño en el DNA, aparte de ser arrestadas en el punto de control de la fase G2/M, las células activan las vías de señalización para reparar el daño y que la célula pueda seguir, pero si no hay una reparación exitosa, la célula se va a apoptosis (Pietenpol y Stewart, 2002). Además, este bloqueo en la fase G2/M conlleva que haya una disminución de las células en la fase G1 y por ende en la fase de síntesis (S).

La gran similitud entre la toxicidad inducida por la exposición al TiO₂-C y la inducida por exposición a asbestos, nos hace pensar que puede haber otros aspectos que no han sido descritos en los que pudieran estar teniendo similitud, por ejemplo se sabe que la exposición a asbestos induce la formación de 8-oxoguanosina (8-oxoG), que al ser internalizados y quedar en forma libre en el citoplasma interactúan con los cromosomas durante la mitosis, inducen la formación de micronúcleos, deformación del huso mitótico, sobreexpresión de genes implicados en el ciclo celular, dañan la metafase y anafase, entre otras cosas (Fung *et al.*, 1997; Dopp y Schiffmann, 1998; Bahnassy *et al.*, 2012), sin embargo hasta ahora nada de lo anterior ha sido descrito para la exposición a TiO₂-C, pero dado que ambas partículas inducen arresto celular en la fase G2/M podríamos sugerir que la exposición al TiO₂-C también induce daño en el DNA que está impidiendo que las células entren a mitosis.

El daño a DNA puede ser generado por las ROS, las cuales son también otra similitud entre los asbestos y el TiO₂. Los asbestos pueden inducir ROS por dos mecanismos principales, el primero es por el hierro que contienen en su superficie estas partículas, el cual tiene un papel importante en la generación de ROS, en especial por la reacción de Fenton, y el segundo mecanismo es por la generación de ROS derivadas de la mitocondria (Blake *et al.*, 2007). Para el TiO₂ se ha descrito que el principal mecanismo de generación de ROS es por cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, así como en la permeabilidad (Freyre-Fonseca *et al.*, 2011).

Finalmente, este estudio aporta información sobre una pequeña parte de la toxicidad inducida por el $\text{TiO}_2\text{-C}$ que es un nanomaterial recientemente sintetizado, y si bien aún no es sintetizado en cantidades industriales, se han incrementado los usos de este nanomaterial y cada día es más utilizado para diversos productos, razón por la cual vislumbramos que en unos años se comenzará a sintetizar en cantidades industriales y los ambiente ocupacionales comenzarán a abundar.

Por lo anterior, este trabajo busca contribuir con la evidencia científica, que en un futuro servirá para que se puedan regular los límites de exposición ocupacional y se tomen las medidas necesarias para la protección de los trabajadores y así evitar futuras enfermedades, ya que en México hay poco sobre la regulación a diferencia de Europa y EE.UU. Además, este trabajo aporta información sobre la toxicidad para que en un futuro, junto con más evidencia científica, el TiO_2 sea clasificado como carcinógeno.

8. CONCLUSIONES

1. Las células A549 son capaces de internalizar el TiO₂-C y dentro de las células estas NPs se encuentran en el citoplasma.
2. La exposición a TiO₂-C induce disminución en la reducción de MTT a partir de la concentración de 10 µg/cm².
3. La internalización causa cambios morfológicos como disminución en el tamaño celular y aumento en la granularidad.
4. La exposición al TiO₂-C aumenta la producción de nitritos y nitratos como los productos del metabolismo del óxido nítrico al séptimo día de exposición.
5. La exposición al TiO₂-C promueve la producción de citocinas al día 4 de exposición pero inhibe dicha producción al día 7 de exposición.
6. La disminución de producción de citocinas no tiene correlación con la disminución en la reducción de MTT.
7. Las células A549 expuestas al TiO₂-C por 7 días se acumulan en la fase G2/M del ciclo celular.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo muestran que el $\text{TiO}_2\text{-C}$ induce toxicidad en las células del epitelio pulmonar, sin embargo aún faltan muchos procesos celulares por describir. Algunas de las perspectivas con base en lo obtenido en este trabajo son:

1. Cuantificar la cantidad de titanio que son capaces de internalizar.
2. Evaluar el daño en el DNA inducido por la exposición al $\text{TiO}_2\text{-C}$.
3. Evaluar la capacidad de células epiteliales de pulmón expuestas a $\text{TiO}_2\text{-C}$ para formar tumores.
4. Evaluar si dicha exposición promueve la invasión y metástasis.
5. Determinación de la expresión de genes y proteínas relacionadas con el ciclo celular después de una exposición a $\text{TiO}_2\text{-C}$ por un periodo largo.
6. Evaluar mecanismos moleculares que confirmen el estado de anergia.

10. REFERENCIAS

- 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.
- Adjei IM, Sharma B, Labhasetwar V. 2014. Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol*. 811:73-91.
- Allouni ZE, Højl PJ, Cauqui MA, Gjerdet NR, Cimpan MR. 2012. Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO₂ nanoparticles by fibroblasts. *Toxicol In Vitro*. 26(3):469-479.
- Al-Rasheed NM, Faddah LM, Mohamed AM, Abdel Baky NA, Al-Rasheed NM, Mohammad RA. 2013. Potential impact of quercetin and idebenone against immuno- inflammatory and oxidative renal damage induced in rats by titanium dioxide nanoparticles toxicity. *J Oleo Sci*. 62(11):961-971.
- Bahnassy AA, Zekri AR, Abou-Bakr AA, El-Deftar MM, El-Bastawisy A, Sakr MA, El-Sherif GM, Gaafar RM. 2012. Aberrant expression of cell cycle regulatory genes predicts overall and disease free survival in malignant pleural mesothelioma patients. *Exp Mol Pathol*. 93(1):154-161.
- Barea E, Batlle X, Bourges P, Corma A, Fornés V, Labarta A, Puntès VF. 2005. Synthesis and characterization of stabilized subnanometric cobalt metal particles. *J Am Chem Soc*. 28;127(51):18026-18030.
- Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins RP, Hoffmann E, Dopp E. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol*. 21:6-17.
- Blake DJ, Bolin CM, Cox DP, Cardozo-Pelaez F, Pfau JC. 2007. Internalization of Libby amphibole asbestos and induction of oxidative stress in murine macrophages. *Toxicol Sci*. 99(1):277-288.
- Boffetta P, Soutar A, Cherrie JW, Granath F, Andersen A, Anttila A, Blettner M, Gaborieau V, Klug SJ, Langard S, Luce D, Merletti F, Miller B, Mirabelli D, Pukkala E, Adami H-O, Weiderpass E. 2004. Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer Causes Control*. 15(7):697-706.
- Bonner JC, Silva RM, Taylor AJ, Brown JM, Hilderbrand SC, Castranova V, Porter D, Elder A, Oberdörster G, Harkema, JR, Bramble LA, Kavanagh, TJ, Botta D, Nel A, Pinkerton, KE. 2013. Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environ Health Perspect*. 121:676-682.

- Brammer KS, Frandsen CJ, Jin S. 2012. TiO₂ nanotubes for bone regeneration. *Trends Biotechnol.* 30(6):315-322.
- Chang LY. 2002. Industrial Minerals: Materials, Processes and Uses. Upper Saddle River, NJ. *Prentice Hall*. TR-00-18:480.
- Chen KL, Bothun GD. 2014. Nanoparticles meet cell membranes: probing nonspecific interactions using model membranes. *Environ Sci Technol.* 48:873-880.
- Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, Chen JJW, Yang PC. 2006. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema like lung injury in mice. *FASEB J.* 20:E17312-E17341.
- Dollinger A, Stolch L, Luo Y, Beck M, Strobel CH, Hagner M, Dilger S, Bein M, Polarz S, Gantefoer GF, Kim YD, Proch S. 2014. Size-selected gold clusters on porous titania as the most "gold-efficient" heterogeneous catalysts. *Phys Chem Chem Phys.* 14;16(22):11017-11023.
- Dopp E, Schiffmann D. 1998. Analysis of chromosomal alterations induced by asbestos and ceramic fibers. *Toxicol Lett.* 96(97):155-62.
- Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 320(5876):674-677.
- Du PF, Song LX, Xiong J. 2014. Enhanced conversion efficiency in dye-sensitized solar cells based on bilayered nano-composite photoanode film consisting of TiO₂ nanoparticles and nanofibers. *J Nanosci Nanotechnol.* 14(6):4164-4169.
- Esposito V, Baldi A, Tonini G, Vincenzi B, Santini M, Ambrogi V, Mineo TC, Persichetti P, Liuzzi G, Montesarchio V, Wolner E, Baldi F, Groeger AM. 2004. Analysis of cell cycle regulator proteins in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 57(1):58-63.
- Fenoglio I, Aldieri E, Gazzano E, Cesano F, Colonna M, Scarano D, Mazzucco G, Attanasio A, Yakoub Y, Lison D, Fubini B. 2012. Thickness of multiwalled carbon nanotubes affects their lung toxicity. *Chem Res Toxicol.* 25(1):74-82.
- Forloni G. 2012. Responsible nanotechnology development. *J Nanopart Res.* 14:1007.
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res.* 243(2):359-366.
- Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro NL, Gutiérrez-Cirlos EB, Calderón-Torres CM, Cabellos-Avelar T, Sánchez-Pérez Y, Pinzón E, Torres I, Molina-Jijón E, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J, García-

- Cuéllar CM, Chirino YI. 2011. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol Lett.* 202(2):111-119.
- Fröhlich E. 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 7:5577-5591.
- 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 Occup Environ Med.* 45:400-409.
- Fung H, Kow YW, Van Houten B, Mossman BT. 1997. Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis.* 18:825-832.
- Gayo A, Mozo L, Gutierrez C. 2009. Citoquinas inmunopotenciadoras e inmunosupresoras en autoinmunidad. Servicio de inmunología. Hospital central de Asturias-Celestino.
- 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.
- Globocan disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx, consultado el 20 de septiembre del 2014.
- Guey B, Bodnar M, Manié SN, Tardivel A, Petrilli V. 2014. Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function. *Proc Natl Acad Sci.* [Epub ahead of print].
- Hamilton RF, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M, Holian A. 2009. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part Fibre Toxicol.* 6:35.
- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A. 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol.* 7(7):665-674.
- Hillegass JM, Miller JM, MacPherson MB, Westbom CM, Sayan M, Thompson JK, Macura SL, Perkins TN, Beuschel SL, Alexeeva V, Pass HI, Steele C, Mossman BT, Shukla A. 2013. Asbestos and erionite prime and activate the NLRP3 inflammasome that stimulates autocrine cytokine release in human mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 13:10-39.
- Hou Yanhua, Kaiyong Cai, Jinghua Li, Xiuyong Chen, Min Lai, Yan Hu, Zhong Luo, Xingwei Ding, Dawei Xu. 2013. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine.* 8:3619-3630.

- Huang S, Pin Ju Chueh, Yun-Wei Lin b, Tung-Sheng Shih c, Show-Mei Chuang. 2009. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 241:182-194.
- Huc V, Pelzer K. 2008. A new specifically designed calix[8]arene for the synthesis of functionalized, nanometric and subnanometric Pd, Pt and Ru nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 318(1):1-4.
- Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, Fleury J, Baeza-Squiban A, Marano F, Boland S. 2010. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*. 16:7-10.
- 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.
- Hwang SH, Song H, Lee J, Jang J. 2014. Multifunctional Ag-Decorated Porous TiO₂ Nanofibers in Dye-Sensitized Solar Cells: Efficient Light Harvesting, Light Scattering, and Electrolyte Contact. *Chemistry*. 19.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Silica, Some Silicates, Coal Dust and Para-Aramid Fibrils. Lyon, Francia. IARC Monograph Evaluation Carcinogenic Risks Human. 1997;68:1-475.
- 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.
- Johnson DG, Walker CL. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39:295-312.
- Jugan ML, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M. 2012. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology* 6(5):501-13.
- Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Chung HW. 2008. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*. 49(5):399-405.
- Kettler K, Veltman K, van de Meent D, van Wezel A, Hendriks AJ. 2013. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ Toxicol Chem*. 33:481-492.

- Kim T, Hyeon T. 2014. Applications of inorganic nanoparticles as therapeutic agents. *Nanotechnology*. 10;25(1):012001.
- King RJ. Pulmonary surfactant. 1982. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 53(1):1-8.
- Kocbek P, Teskac K, Kreft ME, Kristl J. 2010. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles. *Small*. 6;6(17):1908-1917.
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. 1985. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 79(2):179-192.
- Lee WS, Park YS, Cho YK. 2014. Hierarchically Structured Suspended TiO₂ Nanofibers for Use in UV and pH Sensor Devices. *ACS Appl Mater Interfaces*. 6(15):12189-12195.
- Lehn JM. 2002. Toward self-organization and complex matter. *Science*. 295(5564):2400-2403.
- Li Y, Zhang Y, Yan B. 2014. Nanotoxicity overview: nano-threat to susceptible populations. *Int J Mol Sci*, 15(3):3671-3697.
- Liu X, Ren X, Deng X, Huo Y, Xie J, Huang H, Jiao Z, Wu M, Liu Y, Wen T. 2010. A protein interaction network for the analysis of the neuronal differentiation of neural stem cells in response to titanium dioxide nanoparticles. *Biomaterials*. 31(33):3063-3670.
- Liu W, Ernst JD, Broaddus VC. 2000. Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 23(3):371-378.
- Liu W, Su P, Chen S, Wang N, Ma Y, Liu Y, Wang J, Zhang Z, Li H, Webster TJ. 2014a. Synthesis of TiO₂ nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. *Nanoscale*. 10;6(15):9050-9062.
- Liu Z, Miao YE, Liu M, Ding Q, Tjiu WW, Cui X, Liu T. 2014b. Flexible polyaniline-coated TiO₂/SiO₂ nanofiber membranes with enhanced visible-light photocatalytic degradation performance. *J Colloid Interface Sci*. 424:49-55.
- Mano SS, Kanehira K, Taniguchi A. 2013. Comparison of Cellular Uptake and Inflammatory Response via Toll-Like Receptor 4 to Lipopolysaccharide and Titanium Dioxide Nanoparticles. *Int J. Mol. Sci*. 14:13154-13170.
- Márquez-Ramírez SG, Delgado-Buenrostro NL, Chirino YI, Iglesias GG, López-Marure R. 2012. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology*. 302(2-3):146-56.

- Martinon F, Burns K, Tschopp J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* (2):417-26.
- Mirjolet C, Papa AL, Créhange G, Raguin O, Seignez C, Paul C, Truc G, Maingon P, Millot N. 2013. The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept. *Radiother Oncol.* 108:136-142.
- 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 JL, Alfaro-Moreno E, Soria-Castro E, García-Latorre E, Cabañas-Moreno JG, del Pilar Ramos-Godinez M, López-Marure R. 2012. TiO₂ nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. *Chem Res Toxicol.*16;25(4):920-930.
- Moschini E, Gualtieri M, Colombo M, Fascio U, Camatini M, Mantecca P. 2013. The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO₂ in human alveolar epithelial cells. *Toxicol Lett.* 24;222(2):102-16.
- Müller L, Riediker M, Wick P, Mohr M, Gehr P, Rothen-Rutishauser B. 2010. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *J R Soc Interface.* 6;7(1):S27-S40.
- Murphy FA, Poland CA, Duffin R, Al-Jamal KT, Ali-Boucetta H, Nunes A, Byrne F, Prina-Mello A, Volkov Y, Li S, Mather SJ, Bianco A, Prato M, Macnee W, Wallace WA, Kostarelos K, Donaldson K. 2011. Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *Am J Pathol.* 178(6):2587-2600.
- Nie R, Wang Y, Deng X. 2014. Aligned nanofibers as an interfacial layer for achieving high-detectivity and fast-response organic photodetectors. *ACS Appl Mater Interfaces.* 6(10):7032-7037.
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health). 2011. Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Current Intelligence Bulletin 63.
- 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.

- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327(6122):524-526.
- Palomaki J, Valimaki E, Sund J, Vippola M, Clausen PA, Jensen KA, Savolainen K, Matikainen S, Alenius H. 2011. Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS Nano*. 5(9):6861-6870.
- 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 van der Bergstrasse, Germany*. 5:511-520.
- Papa AL, Dumont L, Vandroux D, Millot N. 2013. Titanate nanotubes: towards a novel and safer nanovector for cardiomyocytes. *Nanotoxicology*. 7:1131-1142.
- Papalexou V, Novaes AB Jr, Grisi MF, Souza SS, Taba M Jr, Kajiwarra JK. 2004. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. *Clin Oral Implants Res*. 15(1):44-53.
- 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.
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res*. 14:1109.
- Pietenpol JA, Stewart ZA. 2002. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*. 181(182): 475-481.
- Ponce A. 2013. Nanomaterials and workplace health & safety What are the issues for workers?. European Trade Union Institute. ISBN 978-2-87452-288-8. P-44.
- Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. 1969. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem*. 17(2):110-124.
- Ramkumar KM, Manjula C, Gnanakumar G, Kanjwal MA, Sekar TV, Paulmurugan R, Rajaguru P. 2012. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO₂ nanofibers in HeLa cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 81(2):324-333.
- Raison C. 2013. Gold nanoparticle-based diagnostic test for rapid diagnosis of leading infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn*. 13(3):230.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. 2004. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particles. *Occup Environ Med* 61:442-447.

- Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR. 2009. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environ Sci Technol.* 43(12):4227-4233.
- Roco MC. 2011. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J Nanopart Res.* 13:427-445.
- Schwartz RH. 2003. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 21:305-334.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. 2012. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology* 10:15.
- Shinohara N, Oshima Y², Kobayashi T², Imatanaka N³, Nakai M², Ichinose T⁴, Sasaki T⁵, Zhang G⁶, Fukui H⁶, Gamo M⁶. 2014. Dose-dependent clearance kinetics of intratracheally administered titanium dioxide nanoparticles in rat lung. *Toxicology.* 325C:1-11.
- 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.
- Shukla RK, Kumar A, Vallabani NV, Pandey AK, Dhawan A. 2014. Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. *Nanomedicine (Lond).* 9(9):1423-1434.
- Simkó M, Mattsson MO. 2010. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review. *Part Fibre Toxicol.* 21(7):42.
- Silva RM, Teesy C, Franzi L, Weir A, Westerhoff P, Evans JE, Pinkerton KE. 2013. Biological response to nano-scale titanium dioxide (TiO₂): role of particle dose, shape, and retention. *J Toxicol Environ Health A.* 76(16):953-972.
- Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carrière M. 2008. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology.* 253(1-3):137-146
- Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. 2011. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiology and oncology* 45:227-247.
- Sleeuwenhoek A. 2005. Summary of Occupational Exposure Measurements Associated with the Production of Titanium Dioxide (IOM Report No. 899-00055), Edinburgh, Institute of Occupational Medicine.

- Stern ST, Adiseshaiah PP, Crist RM. 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol*, 9:20.
- Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ. 2001. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 24(2):108-115.
- Stone V, Nowack B, Baun A, van den Brink N, Kammer F, Dusinska M, Handy R, Hankin S, Hassellöv M, Jøner 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.
- Tan C, Wang WX. 2014. Modification of metal bioaccumulation and toxicity in *Daphnia magna* by titanium dioxide nanoparticles. *Environ Pollut*. 186:36-42.
- Tilton SC, Karin NJ, Tolic A, Xie Y, Lai X, Hamilton RF Jr, Waters KM, Holian A, Witzmann FA, Orr G. 2014. Three human cell types respond to multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanobelts with cell-specific transcriptomic and proteomic expression patterns. *Nanotoxicology*. 8:533-548.
- Thurn KT, Paunesku T, Wu A, Brown EM, Lai B, Vogt S, Maser J, Aslam M, Dravid V, Bergan R, Woloschak GE. 2009. Labeling TiO₂ nanoparticles with dyes for optical fluorescence microscopy and determination of TiO₂-DNA nanoconjugate stability. *Small* 5:1318-1325.
- Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y. 2012. Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence-correlation with genotoxicity. *Environ Sci Technol*. 46:7629-7636.
- Toyooka T, Amano T, Ibuki Y. 2012. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat Res*. 742(1-2):84-91.
- Tschopp J, Schroder K. 2010. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?. *Nat Rev Immunol*. 10(3):210-215.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2009. Health Effects Assessment for Asbestos. EPA/540/1-86/049 (NTIS PB86134608). Disponible en: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.cfm?deid=40602>.

- Wang J, Gerlach JD, Savage N, Cobb GP. 2013. Necessity and approach to integrated nanomaterial legislation and governance. *Sci Total Environ.* 1;442:56-62.
- Wang Y, Wu Q, Sui K, Chen XX, Fang J, Hu X, Wu M, Liu Y. A quantitative study of exocytosis of titanium dioxide nanoparticles from neural stem cells. *Nanoscale.* 5(11):4737-4743.
- Warheit DB. 2013. How to measure hazards/risks following exposures to nanoscale or pigment-grade titanium dioxide particles. *Toxicol Lett.* 220(2):193-204.
- Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR, Reed KL. 2005. Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci.* 88(2):514-524.
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol.* 46(4):2242-2250.
- Wu NQ, Wang J, Tafen D, Wang H, Zheng JG, Lewis JP, Liu XG, Leonard SS, Manivannan A. 2010. Shape-Enhanced Photocatalytic Activity of Single-Crystalline Anatase TiO₂ (101) Nanobelts. *J Am Chem Soc.* 132(19):6679-6685.
- Xia T, Hamilton RF, Bonner JC, Crandall ED, Elder A, Fazlollahi F, Girtsman TA, Kim K, Mitra S, Ntim SA, Orr G, Tagmount M, Taylor AJ, Telesca D, Tolic A, Vulpe CD, Walker AJ, Wang X, Witzmann FA, Wu N, Xie Y, Zink JI, Nel A, Holian A. 2013. Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environ. Health Perspect.* 121:683-690.
- Yamadori I, Ohsumi S, Taguchi K. 1986. Titanium dioxide deposition and adenocarcinoma of the lung. *Acta Pathol Jpn.* 36(5):783-790.
- Ze Y, Sheng L, Zhao X, Hong J, Ze X, Yu X, Pan X, Lin A, Zhao Y, Zhang C, Zhou Q, Wang L, Hong F. 2014. TiO₂ nanoparticles induced hippocampal neuroinflammation in mice. *PLoS One.* 9:e92230.
- Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014. Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral- Reconocimiento, evaluación y control. Modificada el 28 de abril del 2014.
- Sheng L, Wang L, Sang X, Zhao X, Hong J, Cheng S, Yu X, Liu D, Xu B, Hu R, Sun Q, Cheng J, Cheng Z, Gui S, Hong F. 2014. Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: a biological pathway explored using microarray technology. *J Hazard Mater.* 278:180-188.
- Da Rosa EL. Kinetic effects of TiO₂ fine particles and nanoparticles aggregates on the nanomechanical properties of human neutrophils assessed by force spectroscopy. 2013. *BMC Biophys.* 6(1):11.