



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“PAPEL DE LA DINEÍNA CITOPLASMÁTICA EN
CÉLULAS EPITELIALES DE PULMÓN EXPUESTAS A
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

OCTAVIO ISPANIXTLAHUATL MERÁZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

A Tony: *“Soy el árbol frutal que has cuidado tanto, si no me hubieras atado con esos lazos y no hubieras guiado mi dirección hacia el sol no te estaría dando los frutos que ahora puedes saborear”.*

A Octavio: *“Que no te de pena si las arrugas empiezan a amenazar tu rostro, yo te las quito. Nunca es tarde para regresar”.*

A Gema: *“Polos opuestos se unen y por eso hay que estar unidos, si estamos unidos ni la energía más grande nos podrá separar. Quiero verte feliz”.*

A Luis Alberto: *“Las profundidades de mar necesitan de tu luz y los lugares más fríos necesitan de tu calor. Tienes un poder tan grande que vuelves cursis a mis demonios”.*

A Joel: *“Voy a bordo de una locomotora de vapor con dirección a tu casa, mirando los paisajes que me recuerdan a ti. ¿Faltará mucho para volver a verte? Te extraño mucho”.*

A mi familia: *“El centro de mi universo, donde se irradia felicidad y se rechaza la tristeza”*

A Beckam, Abraham, Cesar, Sergio y Poncho: *“Ya no sé qué son los amigos porque ustedes son más que eso”.*

A la Dra. Yolanda Irasema: *“El mundo necesita de personas como usted, emprendedoras, inteligentes, con decisión, alegría y paz. Usted es parte de mi juventud, mi cariño hacia usted tendrá la misma frecuencia que mi respiración”.*

A la Dra. Norma Laura: *“La confianza es parte esencial de la humanidad y la amistad no depende del tiempo. Somos libres aunque estemos encerrados en el planeta Tierra”.*

Al laboratorio 10: *“A veces he pensado en cambiar la dirección de donde vivo porque paso más tiempo contigo”.*

A la UNAM: *“México y el pueblo te necesita, no dejes que los intereses políticos te aparten de la sociedad. Te defenderé hoy mañana y siempre”.*

Esta tesis se realizó en el laboratorio 10 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM., con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. de becario 166727).

El jurado asignado para obtener el título de Biólogo fue el siguiente:

Presidente: Dra. Norma Laural Delgado Buenrostro
Vocal: Dr. Federico Ávila Camacho
Secretario: Dra. Yolanda Irasema Chirino López
Suplente: Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid
Suplente: Dra. Miriam Rodríguez Sosa



Agradecimientos

A la Dra. Yessenia Sánchez Pérez del Instituto de Cancerología (INCAN) por la donación de la línea celular de neumocitos humanos tipo II (células A549).

A la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, Dra. Miriam Rodríguez Sosa, Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid, Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro y Dr. Federico Ávila Camacho por sus correcciones y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Edgar Oliver López Villegas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y a la Dra. Verónica Freyre Fonseca por la caracterización de las nanopartículas utilizadas en este trabajo.

¡Muchas gracias!

Esta tesis fue realizada en los tiempos donde un presidente “guapo y carismático” (Enrique Peña Nieto) representa a un país. Él no fue elegido por los mexicanos, obviamente en aquellas elecciones la corrupción fue el alimento.

En esta época no hay libertad de expresión, se dice que somos libres pero somos dominados por las personas más ricas del mundo, el gobierno le exige a su pueblo y ellos descansan en sus sillas cubiertas de piel. Se hacen campañas para reducir la obesidad pero siguen pasando comerciales de productos chatarra en la televisión.

Carmen Aristegui es la mejor periodista de México pero ha sido despedida sin alguna justificación. En la propia universidad por parte de los directivos existe una represión al hablar sobre asuntos políticos.

Este trabajo se realizó en los tiempos donde se realizaron 81 cambios en leyes secundarias y se aprobaron las siguientes reformas:

- **Reforma Energética**
- **Reforma en materia de Telecomunicaciones**
- **Reforma en Competencia Económica**
- **Reforma Financiera**
- **Reforma Hacendaria**
- **Reforma Laboral**
- **Reforma Educativa**
- **Código Nacional de Procedimientos Penales**
- **Ley de Amparo**
- **Reforma Política – Electoral**
- **Reforma en materia de Transparencia.**

Esta tesis se escribió cuando los políticos se pasan la bandera de México por sus partes íntimas, la golpean, la violan, la ensucian y la dejan tirada.

Donde el estado ha desaparecido a 43 estudiantes de la Escuela Normal Rural "Raúl Isidro Burgos". México ha exigido por más de 6 meses la presentación con vida de los estudiantes y el gobierno hace caso omiso a las exigencias.

México está en un colapso social, cultural y económico, la canasta básica es un lujo, hay explotación infantil, la primera plana de los periódicos son asesinatos, el servicio del metro es pésimo y la nueva línea 12 del metro está detenida e invadida por la corrupción de empresas extranjeras, hay obras viales en todo México que no han sido concluidas, cada mes los combustibles suben de precio, los perros callejeros son asesinados en grandes cantidades porque el gobierno no encuentra otra solución, los arrecifes son exterminados para construir nuevos puertos marítimos, la inseguridad está en cada esquina, si quieres conseguir droga ve a la esquina de tu cuadra, hay tantos departamentos de policías que no sirven para nada, el gobierno cada año reduce el presupuesto público y no apoya a la cultura y a la ciencia.

En fin, estamos en una crisis que nadie sabe cuándo acabará porque "México está tan lejos de Dios y tan cerca de Estados Unidos".

Pienso que estamos a tiempo de cambiar el futuro del país. ¡Quiero que termine el sexenio de E.P.N., quiero que los mexicanos abran los ojos, quiero que dejen de pasar basura en la T.V. quiero que exista seguridad, quiero que dejen de decir que en México todos los días son días de muertos!

Contenido

1.0 Introducción	10
1.1 Las nanopartículas.....	10
1.2 Las nanopartículas de dióxido de titanio.....	11
1.3 Las dineínas citoplasmáticas.....	17
1.4 Relación entre dineínas citoplasmáticas y microtúbulos.....	19
1.5 El factor de transcripción Gli1.....	23
1.6 Migración celular en cáncer de pulmón.....	29
1.7 La Ciliobrevina D.....	30
2.0 Antecedentes	31
3.0 Justificación	33
4.0 Hipótesis	35
5.0 Objetivos	35
6.0 Materiales y método	36
6.1 Caracterización de las TiO ₂ NPs.....	36
6.2 Cultivo celular.....	36
6.3 Reducción de MTT.....	37
6.4 Diseño experimental.....	38
6.5 Tinción con hematoxilina y eosina.....	38
6.6 Ultraestructura celular.....	39
6.7 Citometría de flujo.....	39
6.8 Inmunofluorescencia.....	40
6.9 Ensayo de cicatrización de herida.....	41
6.10 Análisis estadístico.....	41
7.0 Resultados	42
8.0 Discusión	50
9.0 Conclusiones	53
10.0 Recomendaciones	53
11.0 Esquema propuesto en este trabajo	55
12.0 Perspectivas	56
13.0 Referencias	57

Índice de figuras y tablas

Fig. 1. Escala de longitud que muestra el tamaño de las nanopartículas en comparación con otros componentes biológicos	10
Fig. 2. Clasificación de las NPs.....	11
Fig. 3. Mineral de donde se extrae el TiO ₂ y sus tres formas cristalinas.....	12
Fig. 4. Internalización de TiO ₂ NPs por endocitosis	16
Fig. 5. Esquema del complejo de dinactina.....	17
Fig. 6. Diferencia de secuencias de las dos dineínas citoplasmáticas.....	18
Fig. 7. Esquema estructural del microtúbulo.....	19
Fig. 8. Cuatro pasos fundamentales para el proceso de migración celular	20
Fig. 9. Representación de los dominios y motivos en la familia de proteínas Gli....	22
Fig. 10. Posicionamiento de NLS, NES y otros dominios en las proteínas Gli	23
Fig. 11. Actividad activadora/represora de los tres homólogos de la familia de proteínas Gli	24
Fig. 12. Maduración del ligando Sonic Hedgehog	25
Fig. 13. Esquema de la proteína Ptch1 en la membrana celular.....	26
Fig. 14. Estructura ilustrativa de la proteína Smo	27
Fig. 15. Estructura química de la ciliobrevina D.....	29
Fig. 16. Esquema general de la experimentación	38
Fig. 17. Caracterización de TiO ₂ NPs.....	42
Fig. 18. Viabilidad celular en neumocitos humanos tipo II	43
Fig. 19. Células A549 teñidas con hematoxilina y eosina	44
Fig. 20. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células A549	45
Fig. 21. Granularidad y tamaño de células A549 por citometría de flujo	46
Fig. 22. Localización de Gli1 en células A549 y su fluorescencia relativa	47
Fig. 23. Localización de α -tubulina en células A549 y su fluorescencia relativa	48
Fig. 24. Tasa de migración de células A549	49

Fig. 25. Consecuencias de la inhibición de la dineína citoplasmática y la posterior exposición a TiO₂ NPs de células A549.....55

Tabla 1. Límites de exposición para TiO₂ en ambientes ocupacionales 14

Tabla 2. Normas de higiene ocupacional para TiO₂ 15

Tabla 3. Expresión de proteínas relacionadas a la vía Shh y sus efectos en diferentes tipos celulares29

Abreviaturas

CBD – ciliobrevina D

C-terminal – carboxi terminal de una proteína

Dhh – Vía de señalización Desert Hedgehog

DMSO – dimetil sulfóxido

DYNC1 – dineína citoplasmática 1

DYNC2 – dineína citoplasmática 2

F12K – medio de cultivo celular F12K

Gli1 – Homólogo de oncogén 1 asociado a glioma

GTP - guanosín trifosfato

IARC - Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer

Ihh – Vía de señalización Indian Hedgehog

Kif7 – miembro 7 de la familia kinesina

MTOC – Centro organizador de microtúbulos

NPs – nanopartículas

N-terminal – amino terminal de una proteína

Ptch1 – receptor de membrana patched 1

REL – exposición límite recomendable

SEM – microscopía electrónica de barrido

Shh – Vía de señalización Sonic Hedgehog

SFB – suero fetal bovino

SHhNp – ligando Sonic Hedgehog activo

Ski – proteína skinny Hedgehog

Smo – proteína Smoothened

Sufu – supresor del homólogo fused

TEM – microscopía electrónica de transmisión

TiO₂ - dióxido de titanio

TiO₂ NPs – nanopartículas de dióxido de titanio

Resumen

Introducción. En ambientes ocupacionales las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂ NPs) pueden ser respiradas por los trabajadores que fabrican estos nanomateriales y ser depositadas en las diferentes regiones de la vía respiratoria, por ejemplo en los alveolos. Entre las células presentes en los alveolos se encuentran los neumocitos tipo II los cuales pueden internalizar a las NPs en vesículas. Dentro de las células las NPs pueden interactuar con los microtúbulos, organelos que están relacionados con la migración celular. En los procesos de migración también está involucrada la dineína citoplasmática que además de estar relacionada con el tráfico vesicular, transporta al factor de transcripción Gli1 al núcleo para activar la transcripción de genes relacionados con la proliferación y migración. Por lo anterior nuestra hipótesis es que la internalización de las TiO₂ NPs será posiblemente dependiente de dineína citoplasmática y su inhibición no modificará la granularidad y tamaño de las células pero reducirá la tasa de migración. Al inhibir previamente a la proteína motora y exponer las células a TiO₂ NPs habrá mayor muerte celular y se disminuirá el tamaño por la desorganización de la red de microtúbulos. Para demostrar lo anterior nuestro objetivo fue inhibir a la dineína citoplasmática con la ciliobrevina D y posteriormente exponer las células a TiO₂ NPs para evaluar los cambios en tamaño y granularidad celular así como la intensidad de fluorescencia de α -tubulina, Gli1 y la tasa de migración.

Materiales y método. La caracterización de las TiO₂ NPs (<25 nm) se realizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM). Por otro lado se cultivaron células A549 en medio F12K con 10% de suero fetal bovino (F12K+SFB) y fueron divididas en los siguientes grupos: A) Control, B) TiO₂ NPs, C) CBD, D) CBD+TiO₂ NPs. Al grupo A fue el grupo control; el grupo B fue cultivado 24 h sin tratamiento y posteriormente expuesto a TiO₂ NPs (10 μ g/cm²) por 24 h; al grupo C se le aplicó CBD (50 μ M) por 24 h y 24 h adicionales sin tratamiento, finalmente el grupo D fue expuesto a CBD por 24 h, seguido de la exposición a TiO₂ NPs (10 μ g/cm²) por 24 h. Al término de los tratamientos se evaluó la viabilidad celular por medio de la reducción de MTT; la forma y ultraestructura celular fue observada por la tinción de hematoxilina y eosina y por imágenes de TEM respectivamente, la granularidad y tamaño fueron cuantificados por citometría de flujo; la localización de Gli1 y α -tubulina por inmunofluorescencia; mientras que la tasa de migración celular se realizó por el ensayo de cicatrización de herida. Finalmente los resultados fueron evaluados utilizando análisis no paramétrico (ANOVA) con el test de Kruskal-Wallis y prueba de Dunns; los datos fueron expresados con su media y desviación estándar.

Resultados. Las TiO₂ NPs resuspendidas en medio F12K+SFB forman agregados de <5 μ m mientras que el tamaño primario de las NPs fue <100 nm. Las TiO₂ NPs no reducen la viabilidad celular, sin embargo incrementan la granularidad celular. La inhibición de dineína citoplasmática y las NPs no causan muerte celular y no disminuyen el tamaño celular a las 24 h de tratamiento sin embargo el tratamiento de CBD+TiO₂ NPs por 48 h causa muerte celular y disminuye el tamaño de los neumocitos. Finalmente las NPs y la CBD incrementan la intensidad de fluorescencia de α -tubulina y la inhibición de la proteína motora redujo la migración celular.

Conclusiones. La internalización de las TiO₂ NPs por los neumocitos humanos tipo II aumentan el contenido citoplasmático y ocasionan la desorganización de los microtúbulos. Además la inhibición de la dineína citoplasmática y la exposición a las NPs reducen la viabilidad y tamaño de las células porque posiblemente se activan vías de apoptosis. Por otro lado la viabilidad celular, intensidad de fluorescencia de α -tubulina así como la migración celular dependen de la dineína citoplasmática. Por lo anterior sugerimos que la relación dineína citoplasmática-TiO₂ NPs sea sujeto de futuras investigaciones, ya que la dineína es un blanco para reducir la invasión celular y prevenir los efectos tóxicos que causan las TiO₂ NPs en células de adenocarcinoma de pulmón.

1.0 Introducción

1.1. Las nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son objetos que tienen un rango de 1 a 100 nm al menos en una de sus tres dimensiones (Fig. 1) (Shi *et al.*, 2013).

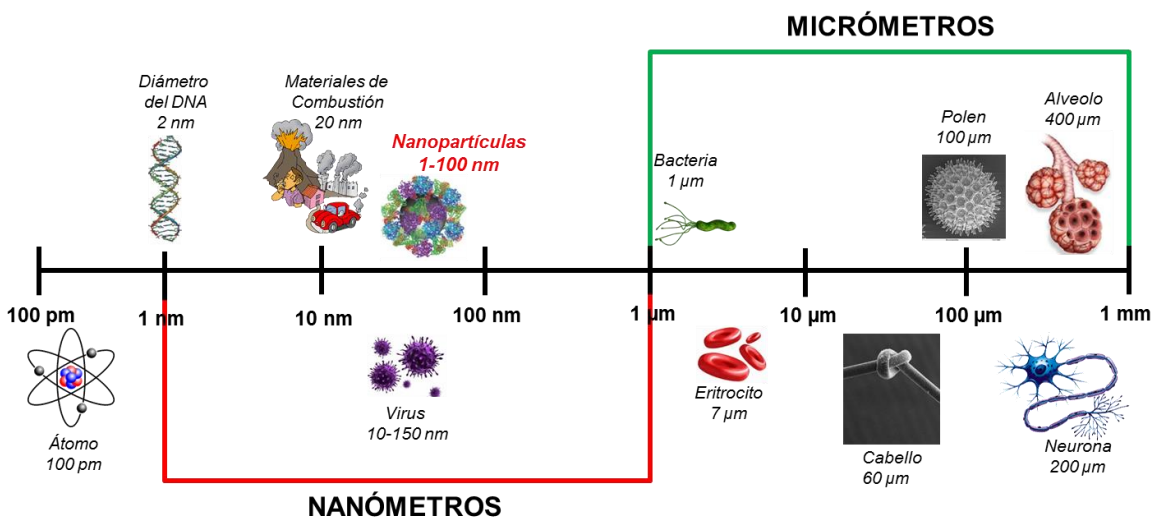


Fig.1. Escala de longitud que muestra el tamaño de las nanopartículas en comparación con otros componentes biológicos. Las nanopartículas son más grandes que los átomos y que el diámetro de DNA, sin embargo son más pequeñas que las bacterias, eritrocitos, el grosor de un cabello, polen, neuronas y alveolos los cuales se encuentran en la escala de las micras (Buzea *et al.*, 2007).

Las NPs poseen características las cuales determinan su impacto biológico, por ejemplo su composición química (Linsinger *et al.*, 2013), el tamaño de la partícula primaria (Wang *et al.*, 2007), el tamaño de distribución, área superficial, porosidad, forma (Warheit *et al.*, 2007; Barillet *et al.*, 2010), cristalinidad (Sayes *et al.*, 2006; Warheit *et al.*, 2007) y solubilidad (Powers *et al.*, 2006), son propiedades que influyen en su toxicidad.

Estas NPs son producidas por medios químicos y/o físicos (Gwinn & Vallyathan, 2006) y generalmente son clasificadas por su dimensión, morfología, composición, uniformidad y aglomeración (Fig. 2) (Buzea *et al.*, 2007).

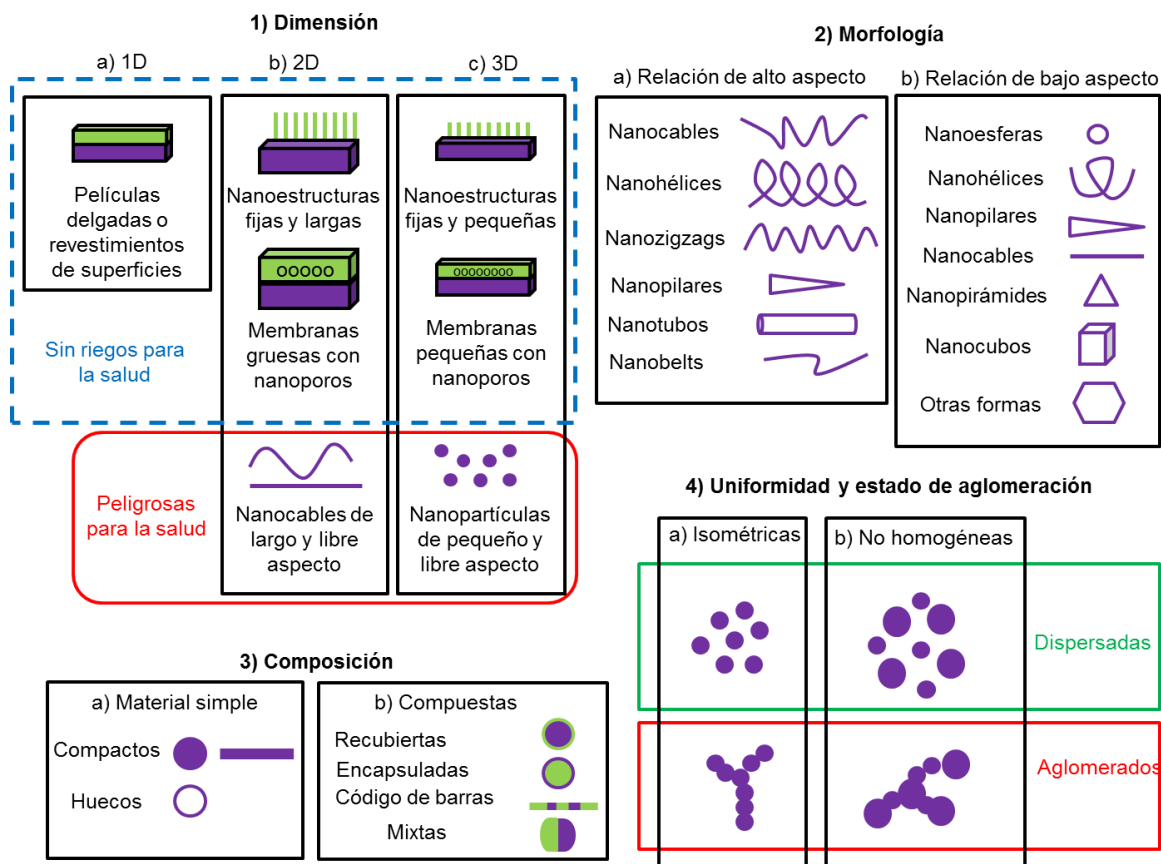


Fig. 2. Clasificación de las NPs. A) Clasificación por su dimensión, 2) morfología, 3) composición, 4) uniformidad y estado de aglomeración (Buzea et al., 2007).

Las nanoesferas son partículas con una matriz sólida (Allouche, 2008) y en esta clasificación es donde se encuentran a las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2 NPs – por sus siglas en inglés) (Shi et al., 2013).

1.2 Las nanopartículas de dióxido de titanio

La mayoría del TiO_2 utilizado como pigmento en diferentes productos es extraído del mineral ilmenita (FeTiO_3) o leucoxeno ($\text{TiO}_2 \cdot x\text{FeO} \cdot y\text{H}_2\text{O}$), su producción comenzó en 1916 por la compañía Titan (Noruega) actualmente conocida como NL Industries (Estados Unidos) (Jovanovic, 2015).

Para que el TiO_2 sea utilizado como pigmento primero debe ser procesado a sulfato de titanilo acuoso (TiOSO_4) o tetracloruro de titanio anhidro (TiCl_4) y convertido a partículas (rutilo o anatasa) de tamaños específicos, los cuales

pueden molerse para reducir su tamaño sin romper el tamaño de las partículas primarias (IARC, 2010).

El TiO_2 presenta tres formas cristalinas: rutilo (tetragonal), anatasa (tetragonal) y brookita (romboédrica) (Diebold, 2003) (Fig. 3). Las formas de anatasa y rutilo son las más utilizadas (Hext *et al.*, 2005), sin embargo la forma más estable con respecto a su termodinámica es la anatasa (Hanaor & Sorrell, 2011) la cual tiene un tamaño entre 10 y 20 nm (Chen & Mao, 2007).

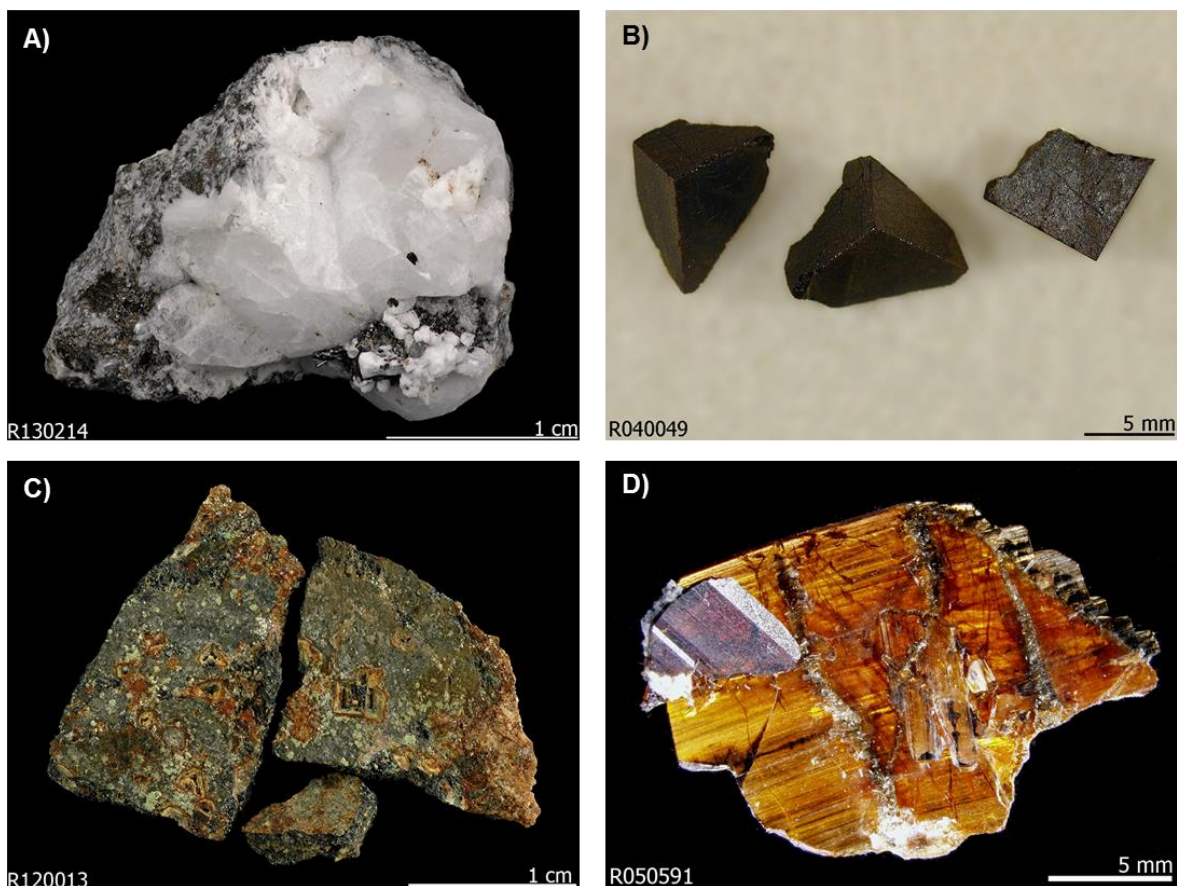


Fig. 3. Mineral de donde se extrae el TiO_2 y sus tres formas cristalinas. A) Mineral ilmenita (ID: R130214) y formas cristalinas del TiO_2 B) Rutilo (ID: R040049), C) anatasa (ID: R120013) y D) brookita (ID: R050591) (RUFF DATABASE).

El TiO_2 utilizado como pigmento es un polvo blanco, inodoro, no combustible, con un peso molecular de 79.9 g/mol, punto de ebullición de 2,972°C, punto de fusión de 1,843°C y una densidad relativa de 4.26 g/cm³ a 25°C (Shi *et al.*, 2013).

Estas NPs son utilizadas en pinturas, revestimientos, plásticos, papeles, tintas, medicinas, productos farmacéuticos, productos alimenticios, cosméticos, pastas

de dientes y como componentes de articulaciones en prótesis de cadera y rodilla (Shi *et al.*, 2013). Se calcula que actualmente en el mercado hay más de 1,300 productos que contienen nanomateriales (Project on emerging nanotechnologies).

De acuerdo con la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de América, las TiO₂ NPs son uno de los nanomateriales globales altamente manufacturados (Liang *et al.*, 2009) ya que su producción comercial entre el año 2006 y 2010 se estimó en más de 5,000 toneladas métricas por año, mientras que del año 2011 al 2014 fue de 10,000 toneladas métricas por año (Menard *et al.*, 2011) de las cuales casi 6 millones de toneladas métricas de TiO₂ fueron consumidas en el año 2012 como pigmento (USGS, 2013).

La producción de TiO₂ NPs representa el 70% del volumen total de producción de pigmentos de todo el mundo (Baan *et al.*, 2006), solo en el año 2013 a nivel mundial la producción de TiO₂ fue 6,560,000 toneladas (Global and China Titanium Dioxide Industry Report, 2014-2017).

Su producción involucra procesos de síntesis y empaquetamiento, donde los obreros que trabajan en la fabricación y transporte de las NPs están en una constante exposición a estos materiales, esto representa uno de los problemas a nivel mundial (NIOSH) ya que las TiO₂ NPs son consideradas las más tóxicas con respecto a partículas más grandes de TiO₂ (Oberdörster, 2001; Fabian *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009).

Incluso la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer (IARC) ha clasificado al TiO₂ como posible carcinógeno para humanos (IARC, 2006), por esta razón actualmente se han propuesto diferentes límites de exposición en ambientes ocupacionales los cuales se muestran a continuación:

Tabla 1.- Límites de exposición para TiO₂ en ambientes ocupacionales

Agencia	Concentración permitida	Tiempo de exposición	Referencia
ACGIH	10 mg/m ³	8 h al día 40 h a la semana	ACGIH, 2001
OSHA	15 mg/m ³	8 h diarias	Kitchin <i>et al.</i> , 2010
NIOSH	0.3 mg/m ³	10 h al día 40 h a la semana	NIOSH, 2011
NEDO	1.2 mg/m ³	8 h al día 40 h a la semana	Morimoto <i>et al.</i> , 2010
RIVM	40,000 partículas/cm ³	-	Świdwińska-Gajewska & Czerczak, 2014
AGS	<0.5 mg/m ³	-	Świdwińska-Gajewska & Czerczak, 2014

ACGIH- Conferencia Americana de Higienistas Industriales, **OSHA**-Administración de Seguridad y Salud, **NIOSH**-Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional, **NEDO**-Organización para el Desarrollo de Nueva Energía y Tecnología Industrial, **RIVM**-Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente en Holanda, **AGS**-Comisión de Sustancias Peligrosas en Alemania.

Además al ser uno de los nanomateriales más producidos en el mundo, algunos países regulan los límites de exposición a TiO₂ en ambientes ocupacionales (Tabla 2).

Tabla 2.- Normas de higiene ocupacional para TiO₂

País	(NDS) (mg/m ³)	TWA (mg/m ³)	Símbolo
Australia	10 (a)	NO	NR
Austria	6	NO	NR
República Checa	10	NO	NR
Dinamarca	6 (b)	NO	NR
Finlandia	10	NO	NR
Francia	10	NO	NR
Grecia	10	NO	NR
España	10	NO	NR
Holanda	10 (a)	5 (c)	NR
Irlanda	10 (a)	4 (c)	NR
Alemania	- (a)	NO	3A
Noruega	5	NO	NR
Polonia	10 (a)	NO	NR
Portugal	10	NO	NR
Suiza	3	NO	NR
Suecia	5 (e)	NO	NR
Reino Unido	10 (a)	4 (c)	NR
Italia	10	NO	NR
Unión Europea	-	NO	NR

TWA-(promedio de tiempo ponderado), **NDA**- concentración admisible máxima, **a**-fracción inhalable, **b**-para TiO₂, **c**-fracción respirable, **e**-polvo total, **f**-para la fracción fina, **g**-para la fracción ultrafina incluyendo la ingeniería nanoescala, **3A**-sustancia que se sospecha que es carcinógeno para humanos, **4A**-sustancias que no pueden clasificarse como carcinógenos para humanos, **Ca**-potencial carcinógeno ocupacional, - ningún estándar higiénico. **NO**-sin información, **NR**-no clasificado (Świdwińska-Gajewska & Czerczak, 2014).

Incluso en la industria alimenticia, la FDA (United States Food and Drug Administration – por sus siglas en inglés) permite el uso del TiO₂ como aditivo para alimentos siempre y cuando no supere el 1% del peso total del producto. Así mismo también su uso fue permitido para el envasado de productos como “una sustancia en contacto con alimentos” (FDA, 2002).

Sin embargo en ambientes ocupacionales la principal vía de exposición a las TiO₂ NPs es la vía inhalatoria, esto ocurre cuando las TiO₂ NPs son respiradas y depositadas desde el inicio de las vías respiratorias hasta los alveolos (Geiser & Kreyling, 2010). La región pulmonar en donde se depositen las NPs dependerá de su diámetro (Zhao *et al.*, 2009) y del tamaño de los agregados que puedan formar (Tedja *et al.*, 2011).

En estudios *in vitro* se ha visto que las NPs desencadenan procesos inflamatorios, generación de especies reactivas de oxígeno y activan vías intrínsecas de

apoptosis, entre las líneas celulares de pulmón más utilizadas para la investigar la toxicidad de estas NPs destacan las células epiteliales de bronquio humano (BEAS-2B), macrófagos alveolares humanos (THB-1) y células de adenocarcinoma de pulmón (A549) (Iavicoli *et al.*, 2011).

En las células A549, las NPs son internalizadas principalmente por endocitosis (Stearns *et al.*, 2001) (Fig. 4) y localizadas en vesículas (Márquez-Ramírez *et al.*, 2012) y cuerpos multivesiculares (Singh *et al.*, 2007) que pueden ser transportadas por las dineínas citoplasmáticas (Vallee *et al.*, 2003).

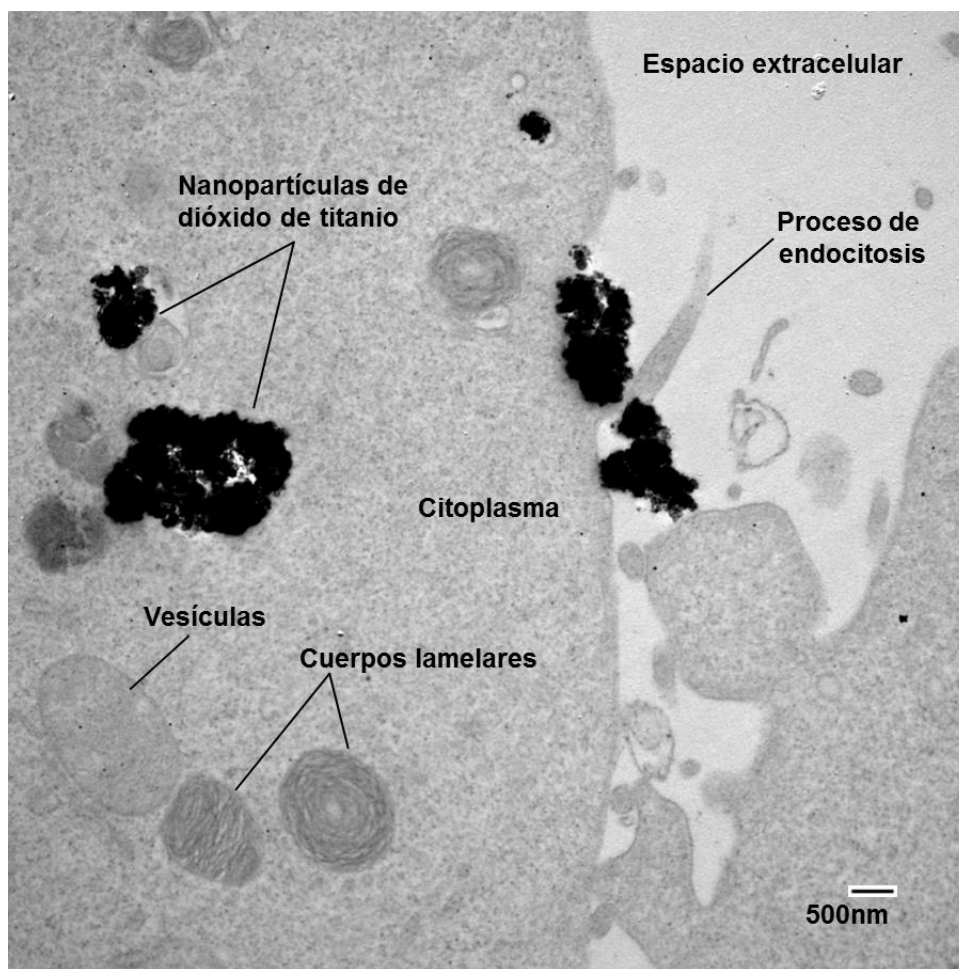


Fig. 4. Internalización de TiO₂ NPs por endocitosis. Neumocitos humanos tipo II expuestos 10µg/cm² por 24 h. La membrana celular se pliega para internalizar las TiO₂ NPs por los neumocitos humanos tipo II. Después de su internalización, las TiO₂ NPs se localizan en vesículas intracelulares cerca de cuerpos lamelares. Barra de escala = 500nm.

1.3 Las dineínas citoplasmáticas

Las dineínas citoplasmáticas pertenecen a la familia de dineínas, proteínas motoras que están presentes en todos los organismos eucariontes (Martin, 1999). En general, las dineínas participan en el transporte intracelular, mitosis, polarización y movimiento celular (Höök & Valle, 2006).

Las dineínas citoplasmáticas son dependientes del complejo dinactina (Arp1, Arp11, CapZ, p62, p27, p25, dinamitina, p22, p24) el cual le permite llevar a cabo procesos de motilidad. Las subunidades p22 y p24 son las que se unen a la subunidad p150^{Glued} para formar un filamento en la base del complejo (Holleran et al., 1998; Schroer, 2004).

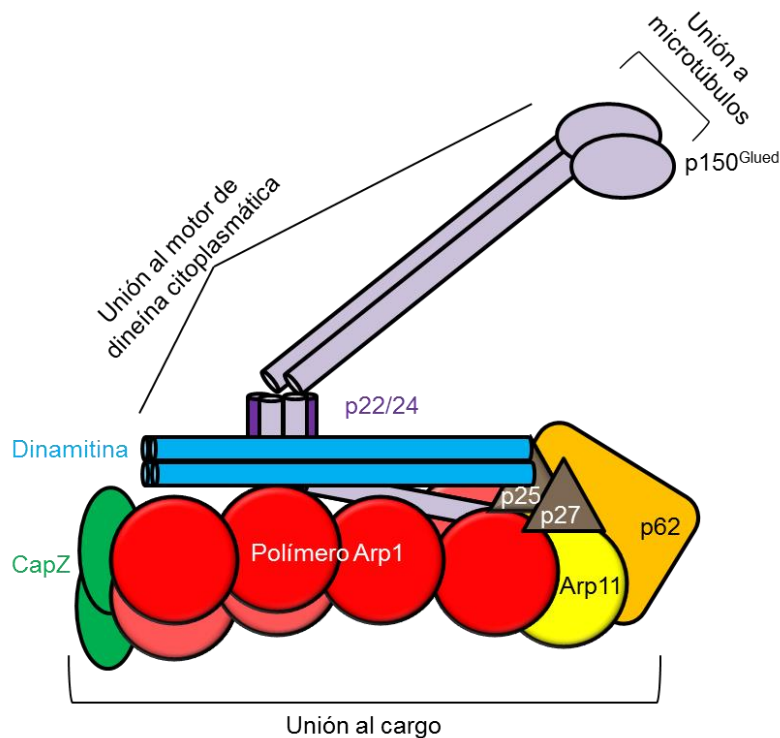


Fig. 5. Esquema del complejo de dinactina. Este complejo está formado de varias subunidades que tienen unión al cargo de transporte, al motor de la dineína citoplasmática así como a los microtúbulos (Schroer, 2004).

Las dineínas citoplasmáticas se clasifican en 1 y 2, poseen una secuencia conservada hasta el aminoácido (aa) 50 y se ven diferenciadas a partir del aa 51 rio arriba (Fig. 6) (Rajagopalan et al., 2013).

TetDYH1	R M L S A C S Q Q I L I I Q S G L R - - - - - E R A T K I E L M N R - -	89
TetDYH2	E Q L S A I S Q Q I Q V I Q W A I K - - - - - E G E Q T M Q L M G Q - -	89
TetDYH1	⁸⁹ D V K L N P K M G V F V T M N P - - - G Y ¹⁰⁷	
TetDYH2	⁸⁹ T I E V N K N S G I F V T L N P A G K G Y ¹¹⁰	

Fig. 6. Diferencia de secuencias de las dos dineínas citoplasmáticas. La dineína citoplasmática 2 es diferente a la dineína citoplasmática 1 porque a partir de la secuencia Walker, 100 aminoácidos río arriba se adicionan tres aminoácidos más (A, K, G) para la dineína citoplasmática 2 (cuadro azul) (Rajagopalan *et al.*, 2013).

La abreviatura para referirse a la dineína citoplasmática 1 y 2 es **DYNC1** y **DYNC2** respectivamente (Pfister *et al.*, 2006).

Las dineínas citoplasmáticas participan en la división celular (Karki & Holzbaur, 1999), motilidad (Dujardin *et al.*, 2003), transporte y posicionamiento de organelos (Schroer *et al.*, 1989), así como en el transporte de vesículas de Golgi (Wu *et al.*, 2011), peroxisomas (Kural *et al.*, 2005), mitocondrias (MacAskill & Kittler, 2010), endosomas, lisosomas (Caviston & Holzbaur, 2006), proteínas (Johnston *et al.*, 2002), ribonucleoproteínas (Ling *et al.*, 2004), virus (Dodding & Way, 2011) y factores de transcripción (Harrell *et al.*, 2004) como NF- κ B (Shrum *et al.*, 2009) y la familia de proteínas Gli (Hassounah *et al.*, 2012).

1.4 Relación entre dineínas citoplasmáticas y microtúbulos

Las dineínas citoplasmáticas dependen de los microtúbulos, los cuales pertenecen al citoesqueleto, son organelos que participan en la forma celular, soporte mecánico (Campbell, 2007), tienen una distribución ubicua y su vida media es alrededor de 10 min (Welsch & Sobotta, 2008).

Los microtúbulos son cilindros huecos que están formados por 13 protofilamentos, cada uno compuesto de una cadena de subunidades de α y β tubulina, tienen un polo positivo el cual se ubica cerca de la membrana celular mientras que el polo negativo se localiza cerca del centro organizador de microtúbulos (MTOC) (Fig. 7) (Mandelkow & Mandelkow, 1994).

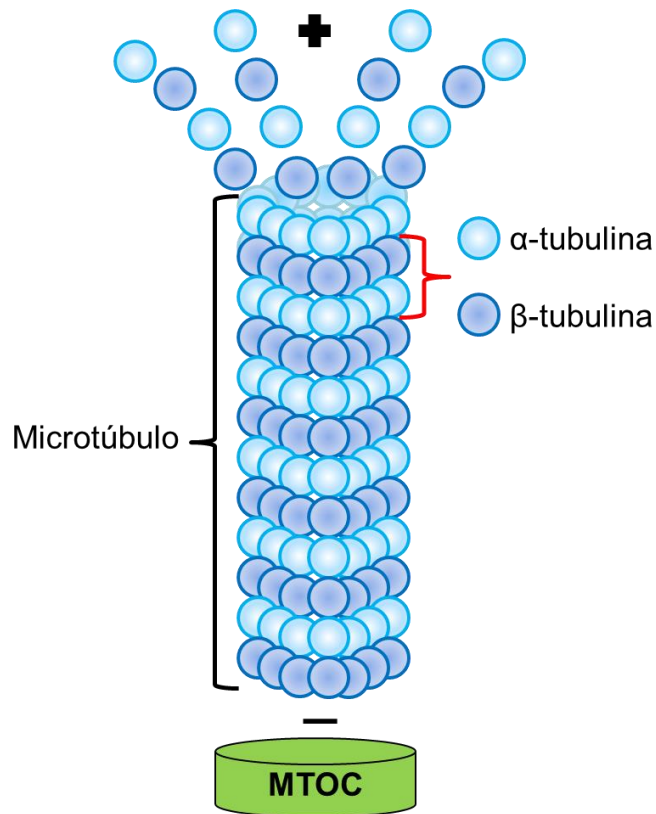


Fig. 7. Esquema estructural del microtúbulo. El microtúbulo está compuesto de 13 protofilamentos, los cuales se componen de subunidades α y β -tubulina. El microtúbulo tiene su polo positivo (+) ubicado cerca de la membrana celular y en esta región es donde ocurren los procesos de polimerización y despolimerización, por el contrario en su otro extremo se ubica el polo negativo (-) que surge desde el centro organizador de microtúbulos (MTOC).

Los microtúbulos además de generar la polaridad de las células (+ o -), constituyen a los axonemas, cilios y flagelos, sirven como eje para el transporte de organelos y vesículas, además ayudan a formar el huso mitótico en la división celular (Westermann & Weber, 2004).

Estos microtúbulos constantemente tienen procesos de polimerización (crecimiento) y despolimerización (acortamiento) (Mitchison & Kirschner, 1984). La dinámica de los microtúbulos está dada por la hidrólisis y el intercambio de GTP en la subunidad β -tubulina (Carlier & Pantaloni, 1982). La hidrólisis de GTP causa la polimerización y para mantener la estabilidad del microtúbulo se le une GTP en su extremo positivo (Drechsel & Kirschner, 1994).

Así mismo, los microtúbulos están sujetos a modificaciones post-traduccionales reversibles como acetilación, poliglicilación, poliglutamilación, tirosinación, detirosinación, fosforilación y palmitolación (Westermann & Weber, 2004).

Los microtúbulos al ser organelos dinámicos pueden deformar la membrana celular (Fygenon *et al.*, 1997) el cual es un proceso indispensable para la migración celular (Vasiliev *et al.*, 1970). Cuando las células van a realizar el proceso de migración, los microtúbulos se orientan generalmente hacia donde la célula se moverá (Wadsworth, 1999) ya que regulan la organización polar de las células (Etienne-Manneville, 2013).

La migración celular es cualquier movimiento de la célula dirigida dentro del cuerpo, la capacidad de migrar permite a las células cambiar su posición dentro de los tejidos o entre los diferentes órganos (Kramer *et al.*, 2013). La migración celular también contribuye en la reparación de tejidos, saneamiento de heridas y diseminación de células cancerosas (Bravo-Cordero *et al.*, 2012; Friedl & Gilmour, 2009).

El mecanismo de migración celular consiste en cuatro pasos fundamentales: protrusión, adhesión, contracción y retracción (Fig. 8) (Vicente-Manzanares *et al.*, 2005). Estos procesos pueden ser regulados por las proteínas de la familia Rho como RhoA, Rac1 y Cdc42 junto con los microtúbulos (Charest & Firtel, 2007; Etienne-Manneville & Hall, 2002).

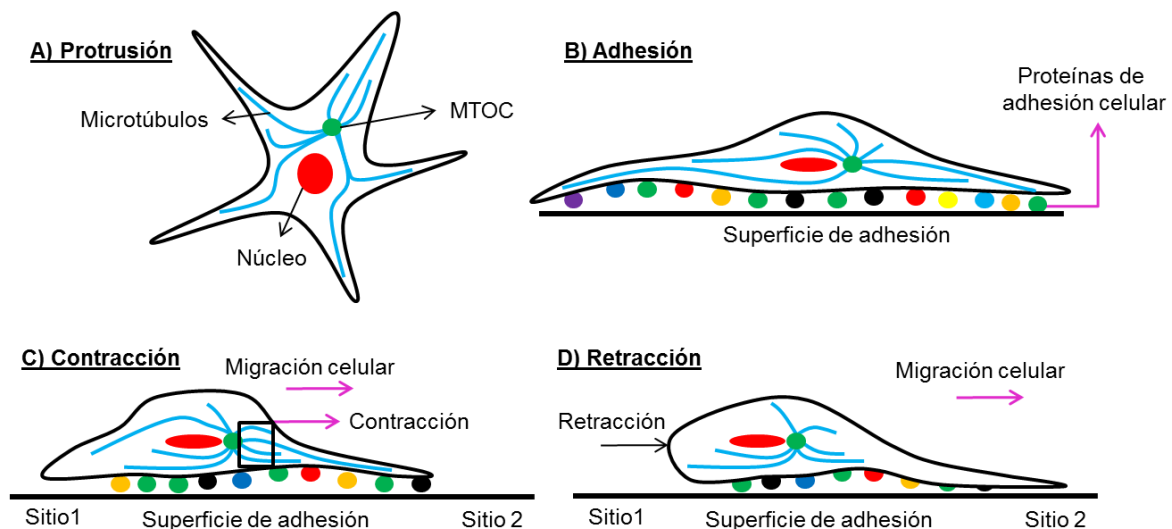


Fig. 8. Cuatro pasos fundamentales para el proceso de migración celular. **A)** Protrusión: los microtúbulos deforman la membrana celular para formar las extensiones de la célula. Para llevar a cabo la migración el núcleo se posiciona, hay una reorientación del aparato de Golgi y el MTOC se ubica en dirección al eje de migración. **B)** Adhesión: las proteínas de unión a la superficie son modificadas para que pueda llevarse a cabo el desplazamiento de la célula. **C)** Contracción: ocurre cuando los microtúbulos se tensan para mover a toda la célula. **D)** Retracción: Ocurren procesos de despolimerización de los microtúbulos en la parte final de la célula, para facilitar el desplazamiento celular, esto ocurre al otro extremo de la dirección de migración.

En estudios *in vitro* se sabe que la organización de los microtúbulos y el tráfico de membranas mediada por los microtúbulos son cruciales en el proceso de extensión de la membrana (Gierke & Wittmann, 2012).

Se ha visto que la despolimerización, polimerización o la estabilidad de los microtúbulos puede ser inducida por diversos fármacos (colcemida, nocodazol, naftazarina) los cuales alteran de manera drástica la migración en gran variedad de tipos celulares incluyendo fibroblastos, neuronas, astrocitos y células de adenocarcinoma de pulmón (Vasiliev *et al.*, 1970; Liao *et al.*, 1995; Etienne-Manneville 2004; Acharya *et al.*, 2011).

Sin embargo, los microtúbulos también pueden verse alterados por TiO₂ NPs, estas partículas además disminuyen la expresión de α y β tubulina (Gheshlaghi *et al.*, 2008) y en *Arabidopsis thaliana*, las NPs causan la degradación de los dímeros de tubulina (Wang *et al.*, 2011).

Otro punto a considerar en la migración celular es que la familia proteínas Gli (factores de transcripción), pueden ser translocados a núcleo por dineínas citoplasmáticas (Hassounah *et al.*, 2012), para activar la transcripción de genes relacionados con la diferenciación celular, proliferación, sobrevivencia y metástasis (Kasper *et al.*, 2006; Milla, *et al.*, 2012). Esta familia comprende a Gli1, Gli2 y Gli3, cada uno con sus respectivos genes (Fig. 9), (Kasper *et al.*, 2006; Hui & Angers, 2011). Dichos genes se derivan de un gen similar encontrado en *Amphioxus* (Shimeld *et al.*, 2007) y *Ciona intestinalis* (Islam *et al.*, 2010).

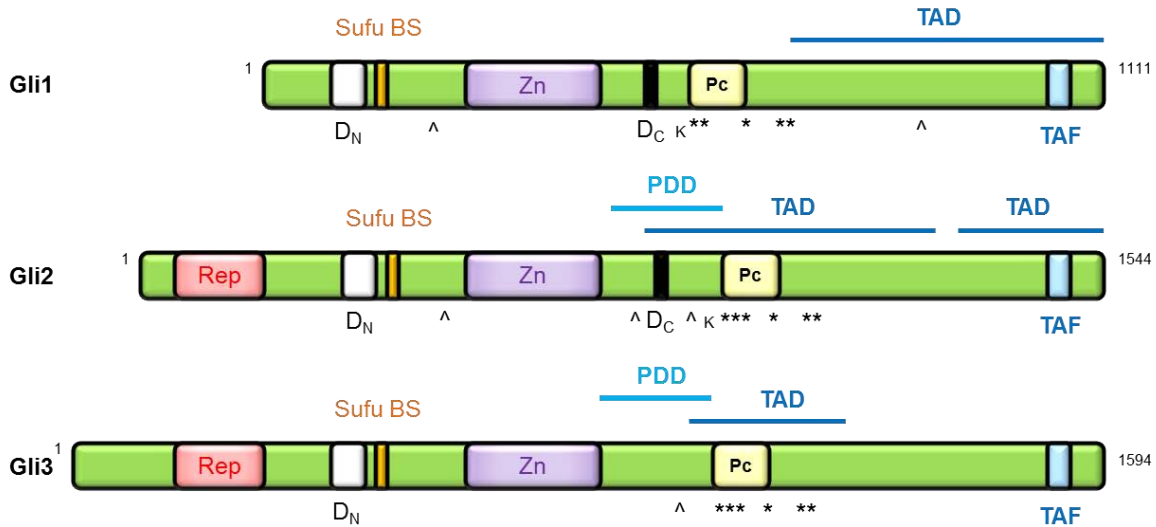


Fig. 9. Representación de los dominios y motivos en la familia de proteínas *Gli*. Los factores de transcripción Gli1, 2 y 3 constan de 1111, 1544 y 1594 aminoácidos respectivamente. Gli1 no tiene dominio represor por lo que es el principal activador de los genes diana. Abreviaturas: Zn=dedos de zinc con unión a DNA, TDA=dominio de activación a transcripción, TAF=Sitio de unión a la proteína TAF relacionada con la caja TATA, Rep=dominio represor, Sufu BS= Sitio de unión a proteína Sufu, *= sitio de proteína cinasa A, PC= cluster de fosforilación, PDD=procesamiento del dominio determinante para su degradación en el proteosoma y para el bloqueo en la producción de Gli^R, D_N-D_C=degron's; secuencia de aminoácidos para iniciar su degradación, ^=sitio de adición de la proteína SUMO (sumoilación), , K=sitio de acetilación (Hui & Angers, 2011).

1.5 El factor de transcripción *Gli1*

El gen *GLI1* fue el primer miembro descrito de las proteínas *Gli* en humanos (Villavicencio *et al.*, 2000), identificado como un gen amplificado en un glioma maligno (Kinzler *et al.*, 1987).

Los factores de transcripción como su nombre lo indica, activan la transcripción de sus respectivos genes diana y gracias a la importina- α estos factores pueden entrar al núcleo (Goldfarb *et al.*, 2004). Este proceso ocurre cuando la región de la proteína de localización nuclear (NLS) de las proteínas *Gli* se une a la importina- α (Lange *et al.*, 2007; Marfori *et al.*, 2010) (Fig. 10).

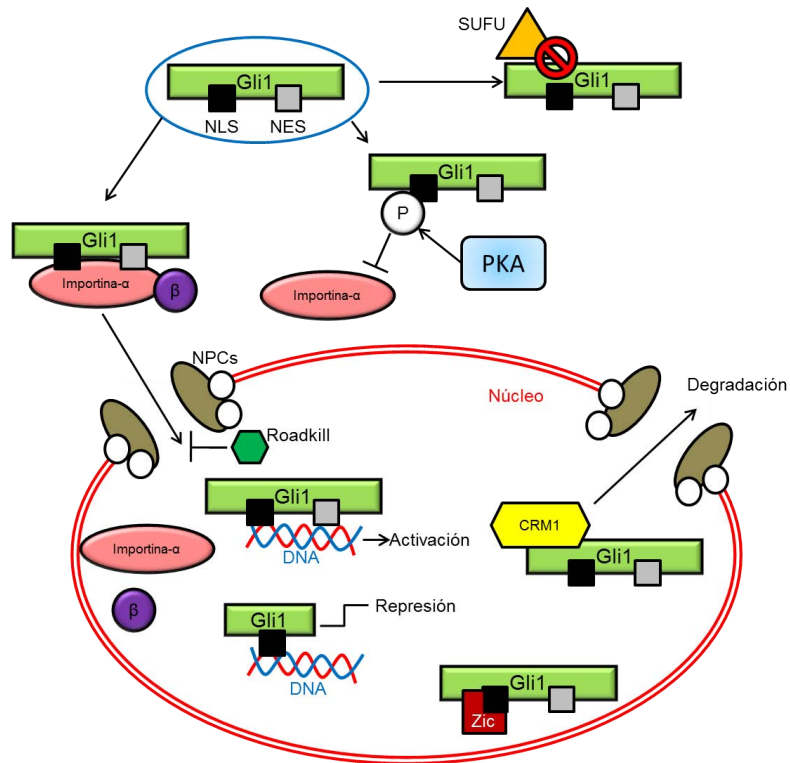


Fig. 10. Regulación del shuttling núcleo-citoplasma de Gli1 por NLS y NES. La NLS de Gli1 se une a la importina- α , por otro lado la importina- β se une al complejo Gli1/importina- α . Este heterodímero es transportado dentro del núcleo por los complejos del poro nuclear (NPCs). La fosforilación de NLS inhibe la localización nuclear, mientras que SUFU solo inhibe el transporte de Gli1 al núcleo. Además la proteína Roadkill quien se localiza alrededor de los NPCs, inhibe la unión de Gli1 a la importina- α y acelera su degradación. Dentro del núcleo, el complejo es desensamblado y la importina α y β son exportados desde el núcleo. La región donde se localiza NES es exportada del núcleo vía CRM-1, donde Gli1 truncado sin NES se acumula en el núcleo. Las proteínas Zic favorecen la localización nuclear de Gli1 presuntamente por la modulación en la función de NLS o NES o ambos, o por la inmovilización de Gli1 en el núcleo por interacciones físicas (Hatayama & Aruga, 2012).

La activación de los factores de transcripción Gli reconocen secuencias conservadas en el DNA de 5'-TGGGTGGTC-3' (Kinzler & Vogelstein, 1990).

Existe una polémica con respecto a los factores de transcripción Gli ya que no se conoce bien el papel de Gli2 y Gli3; una hipótesis es que estos factores se pueden unir directamente a las secuencias de los genes Gli para activar su transcripción (Dai *et al.*, 1999; Ikram *et al.*, 2004). Sin embargo pueden sufrir modificaciones post-traduccionales en sus respectivos N-terminal para actuar como represores de la transcripción (Sasaki *et al.*, 1999).

Por otro lado, se sugiere que Gli1 y Gli2 son los principales activadores de los genes diana, mientras que Gli3 actúa como represor, sin embargo se ha visto que Gli3 también está involucrado en la inducción de la transcripción de los genes diana (Buttitta *et al.*, 2003; Motoyama *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2004).

Por lo tanto, aún se desconoce el papel de Gli2 y Gli3 como activadores o represores de la transcripción (Fig. 11).

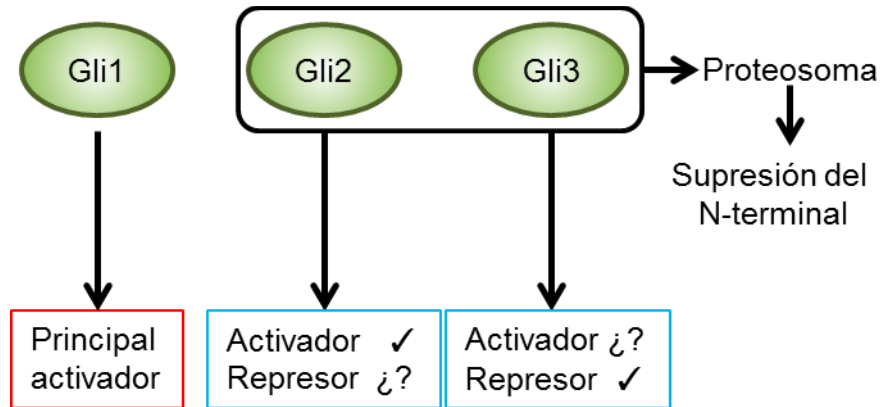


Fig. 11. Actividad activadora/represora de los tres homólogos de la familia de proteínas Gli. El factor de transcripción Gli1 es el principal activador de genes diana mientras que Gli2 y Gli3 pueden ser activadores o represores dependiendo de las modificaciones post-traduccionales en sus respectivos N-terminal.

El único activador directo de los genes diana es Gli1 (Dai *et al.*, 1999; Buttitta *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2004; Ikram *et al.*, 2004), este factor puede activar la transcripción del gen *GLI1*, un oncogén que se ha relacionado con el desarrollo del cáncer de pulmón (Bermudez, *et al.*, 2013).

Para que los factores de transcripción Gli sean activados deben producirse cascadas de señalización relacionadas con la vía Hedgehog, en los mamíferos consta de tres vías: Indian Hedgehog (Ihh), Desert Hedgehog (Dhh) y Sonic Hedgehog (Shh) (Ros, 2009).

En vertebrados, la vía Ihh es activada para el desarrollo de huesos, Dhh es específica al sistema nervioso periférico y órganos reproductivos mientras que Shh se expresa en todo el desarrollo del sistema nervioso y en tejidos epiteliales (Ingham & McMahon, 2001). En este trabajo se utilizaron células de origen epitelial (ATCC, CCL-185) por lo tanto se dará una breve explicación de cómo se activa Gli1 por la vía Shh.

La señalización de Shh se lleva a cabo en el cilio primario (Anderson & Stearns, 2009), un organelo sensorial no móvil basado en microtúbulos (Mahjoub, 2013), mientras que la maduración de ligando se lleva a cabo en el retículo endoplasmático (Fig. 12) (Chen *et al.*, 2011).

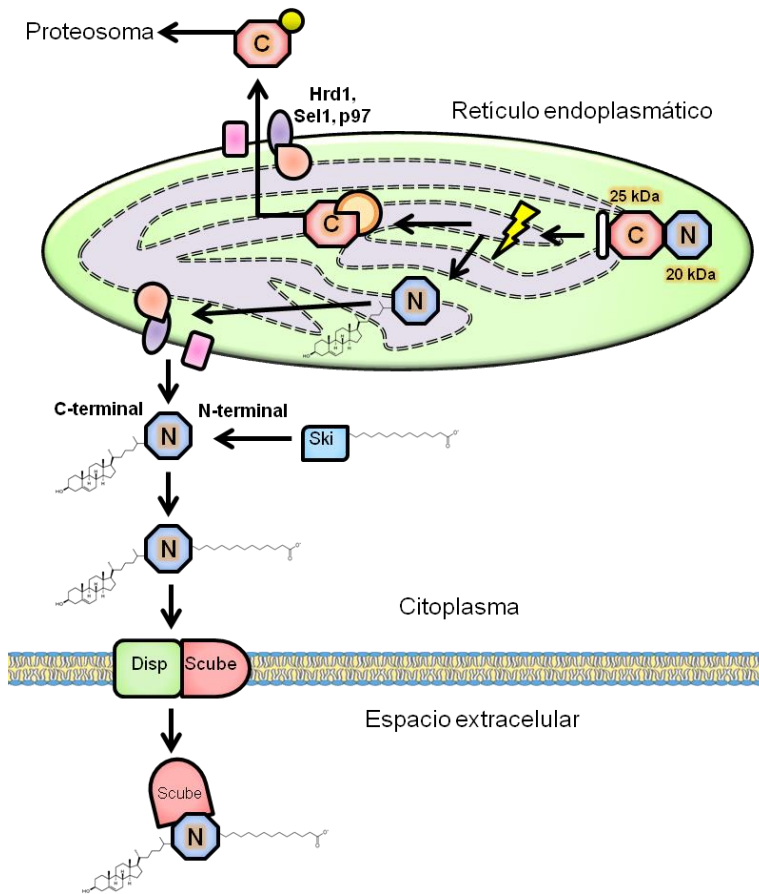


Fig. 12. Maduración del ligando Sonic Hedgehog. En los humanos el ligando de la vía Shh es una proteína de 462 aminoácidos (aa) (R&D Systems) que se sintetiza inicialmente en el retículo endoplasmático (ER) (Chen *et al.*, 2011). Al principio el ligando tiene un peso inicial de 45 kDa (Pepinsky *et al.*, 1998; Buglino *et al.*, 2008) el cual se rompe por auto-escisión en una cisteína libre del carboxi-terminal (C-terminal). (Chen *et al.*, 2011). La auto-escisión da como resultado un extremo C-terminal de 25 kDa que es degradado por la vía asociada al retículo endoplasmático (ERAD) (Hirsch *et al.*, 2009; Xie & Ng, 2010) dependiente del complejo de ubiquitina ligasa Hrd1/Sel1, la ATPasa del citosol p97 y el proteosoma (Chen *et al.*, 2011). El fragmento N-terminal es modificado por la unión de un residuo de colesterol modificado al nuevo N-terminal del ligando, esto se lleva a cabo mediante un tioéster intermediario que sufre un ataque nucleofílico por parte del colesterol (Porter *et al.*, 1996). Posteriormente el ligando sufre una segunda modificación que ocurre en el citoplasma. La modificación es la unión de palmitato al extremo N-terminal por la acetiltransferasa de Hh (Hhat) llamada Skinny Hedgehog (Ski) (Buglino & Resh, 2008). La unión del colesterol al extremo C-terminal le permite una mayor difusión entre los tejidos (Lewis *et al.*, 2001). Una vez que el ligando tiene los dos lípidos unidos en sus respectivos extremos se le conoce como ligando activo (SHHnp) y se puede acumular en las células si no es secretado (Burke *et al.*, 1999). La secreción de SHHnp es dependiente de la proteína Dispatched (Disp) y Scube (Tukachinsky *et al.*, 2012). Una vez secretado el ligando puede viajar distancias de hasta 300µm (Ryan & Chiang, 2012).

Cuando la maduración del ligando ocurre se conoce como SHHnp el cual es secretado por la célula al espacio extracelular, existe la controversia de si SHHnp puede formar complejos (Ros, 2009) con proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) (Ryan & Chiang, 2012).

Independientemente de que SHHnp pueda formar complejos o no, una vez que el ligando es secretado se une al receptor de membrana Patched (Ptch1) que se encuentra localizado en la base del cilio primario (Fig. 13) (Rohatgi *et al.*, 2007).

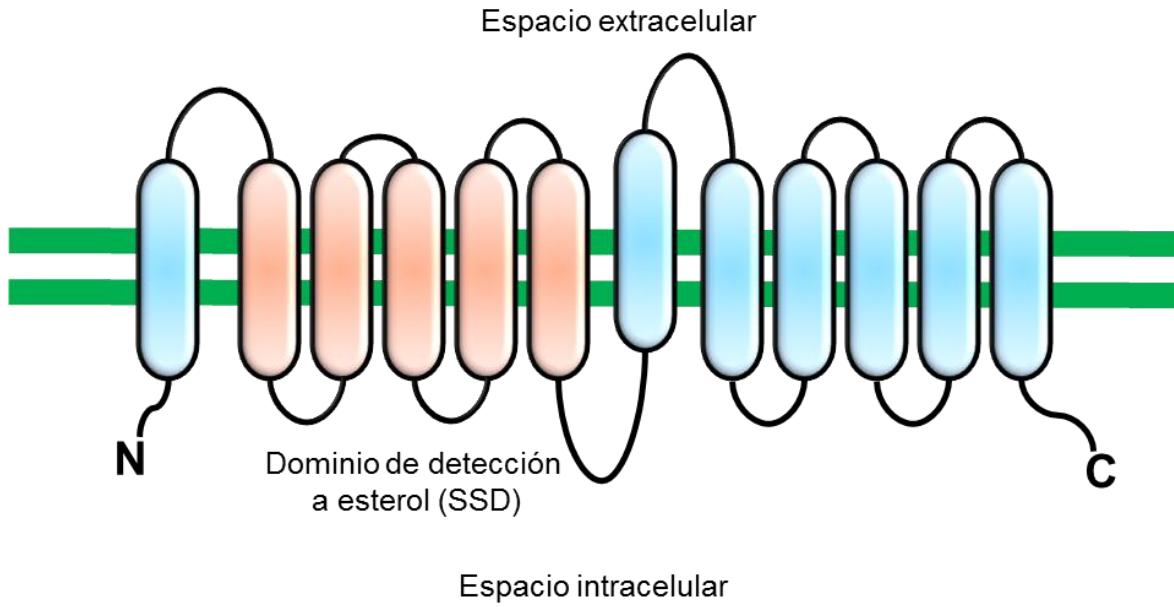


Fig. 13. Esquema de la proteína *Ptch1* en la membrana celular. La región en color rojo representa el dominio de detección a esterol (SSD).

La unión SHhNp-Ptch1 activa a Smoothened (Smo) (Chen *et al.*, 1999) una proteína de siete dominios transmembranales que está ubicada en la membrana de los endosomas intracelulares (Fig. 14) (Corbit, *et al.*, 2005).

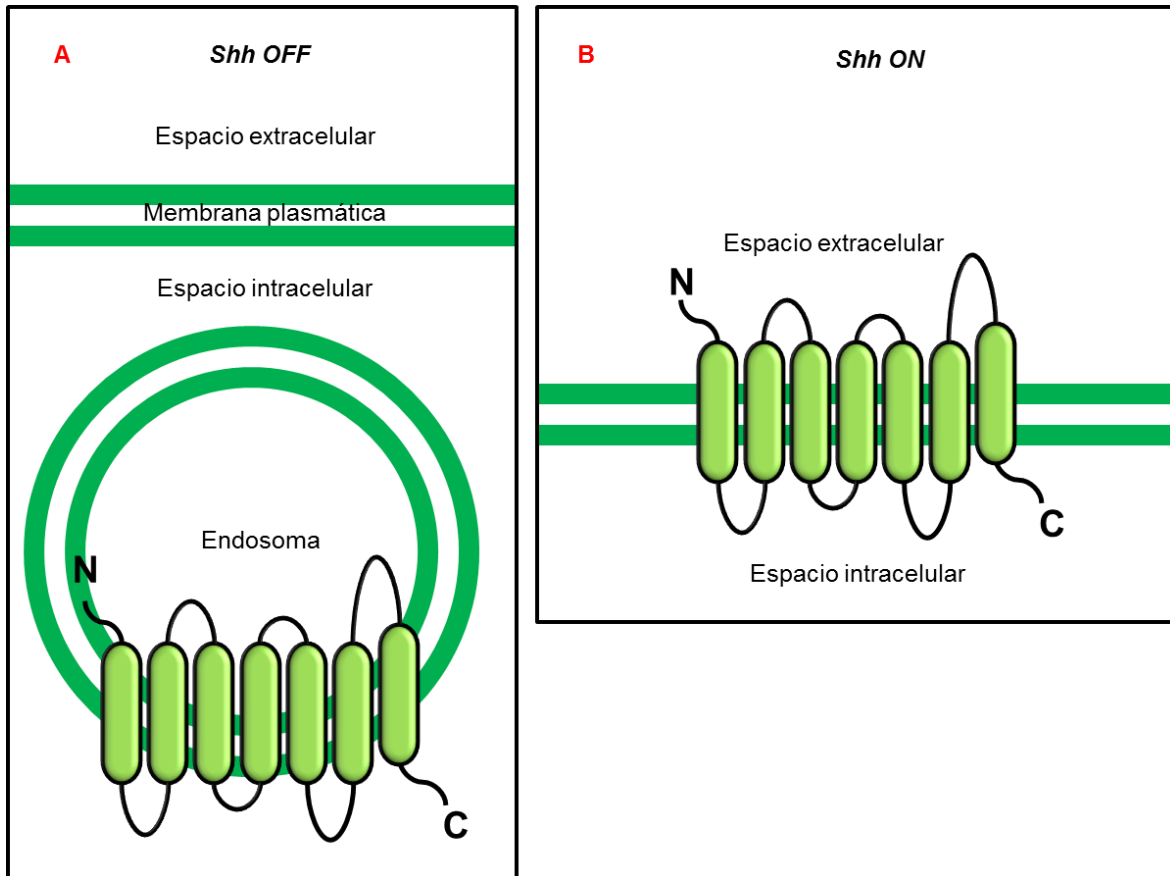


Fig. 14. Estructura ilustrativa de la proteína Smo. A) Antes de la activación de Smo, la proteína se encuentra en endosomas. B) La activación de Smo provoca que se transporte a la membrana celular donde libera a las proteínas Gli. Se ha reportado que Smo puede acumularse en el cilio sin que los genes diana sean transcritos (Ocbina & Anderson, 2008), por lo que Smo puede encontrarse en tres posibles estados: en el citoplasma en un estado inactivo y en el cilio con un estado inactivo o activo (Rohatgi *et al.*, 2009).

La activación de Smo libera a las proteínas Gli1 de un complejo que se encuentra en los microtúbulos formado por el miembro 7 de la familia de cinesina (Kif7) y el supresor del homólogo de fused (SUFU) (Litwack, 2012), además la activación de Smo ocasiona que el complejo SHhNp-Ptch1 sea llevado a los lisosomas para ser degradado (Incardona *et al.*, 2002; Gallet & Therond, 2005).

Una vez que Gli1 es liberado de Kif7 y SUFU, es transportado por la dineína citoplasmática (Hassounah *et al.*, 2012) en dirección retrograda, es decir, de la membrana celular al núcleo (Bloom, 1992).

Como ya se mencionó anteriormente la importación de Gli1 al núcleo es llevado a cabo por la importina- α (Goldfarb *et al.*, 2004) y dentro del núcleo, Gli1 puede activar al gen *GLI1*, para que se active la transcripción de proteínas relacionadas

con la diferenciación celular, proliferación, sobrevivencia y metástasis (Kasper *et al.*, 2006; Milla, *et al.*, 2012) de aquí surge la importancia de estudiar la expresión del factor de transcripción Gli1 ya que es un marcador de migración celular.

A continuación se muestra una tabla de la expresión de proteínas relacionadas a la vía Shh y sus efectos en cáncer de pulmón y otros tipos de cáncer (Tabla 3).

Tabla 3. Expresión de proteínas relacionadas a la vía Shh y sus efectos en diferentes tipos celulares.

Proteínas	Tipo celular	Efecto	Autor
↑ Ptch1, Gli1, Gli2	Células epiteliales de fibrosis pulmonar idiopática (IPF)	Incremento en la proliferación, migración, producción de la matriz extracelular y sobrevivencia de fibroblastos	Bolaños <i>et al.</i> , 2012
↑ Gli1	Células pequeñas de pulmón	Regulación de la transición epitelio-mesenchima	Yue <i>et al.</i> , 2014
↓ Gli1, Gli2	Adenocarcinoma de pulmón (A549) y carcinoma escamoso de pulmón (H520)	Reduce la proliferación celular	Bermudez <i>et al.</i> , 2013
↑ Gli1	Biopsias de cáncer de mama	Promueve la metástasis de los ganglios linfáticos axilares	Wang <i>et al.</i> , 2012
↑ Gli1, Shh, Ptch, Smo	34 líneas celulares de carcinoma de células escamosas de esófago humano pronóstico	Asocia con la profundidad del tumor, metástasis de ganglios linfáticos positivos y un mal pronóstico	Mori <i>et al.</i> , 2006
↑ Ptch, Gli1	Cáncer de ovario	Incremento de la expresión de E-caderina, vimentina, Bcl-2, integrina b1, MT1-MMP, VEGF	Liao <i>et al.</i> , 2009
↑ Gli1	Melanocitos humanos	Proliferación y sobrevivencia de los melanomas humanos inducidos por Ras	Bar-Eli, 2007; Stecca <i>et al.</i> , 2007
↑ Ptch, Smo, Gli1	Células de epitelio derivadas de adenomas colorrectales malignas y adenocarcinomas colorrectales	Incremento en la sobrevivencia celular	Qualtrough <i>et al.</i> , 2004

1.6 Migración celular en cáncer de pulmón

A nivel global alrededor del 90% de todas las muertes por cáncer son el resultado del proceso de metástasis y no de los tumores primarios (Mehlen & Puisieux, 2006).

En el caso de cáncer de pulmón, cada año hay una mortandad de casi 1.6 millones de personas en todo el mundo (GLOBOCAN, 2012).

Las etapas básicas de la invasión y metástasis implican la separación de las células tumorales de la matriz extracelular, la invasión de la lámina basal y tejidos circundantes, intravasación en el torrente sanguíneo, la supervivencia, el transporte a través en el torrente sanguíneo, la migración, la adhesión, extravasación en un sitio distal y finalmente la formación de metástasis (Perlikos *et al.*, 2013).

Para inhibir los procesos de migración celular partiendo de cultivos de neumocitos humanos tipo II se han utilizado una gran variedad de fármacos, por ejemplo, timoquinona A549 (Yang *et al.*, 2014), astragalosida IV (Cheng *et al.*, 2014), licochalcona A (Huang *et al.*, 2014), salidroside (Wang *et al.*, 2014), creabanina (Yodkeeree *et al.*, 2014), y para el caso de fibroblastos se ha utilizado la ciliobrevina (Firestone *et al.*, 2013).

1.7 La Ciliobrevina D

La ciliobrevina D (CBD) (Fig. 15) es una sustancia en polvo color naranja que posee una masa molar de 392.6 g/mol. La CBD tiene una solubilidad en dimetil sulfóxido (DMSO) mayor a 25 mM, puede ser almacenada en polvo a 4°C hasta por un año, diluida en DMSO a 4°C por tres meses y diluida en DMSO a -20°C hasta por un año.

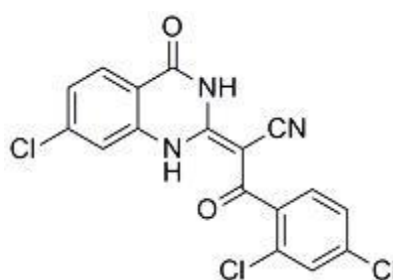


Fig. 15. Estructura química de la ciliobrevina D.

La CBD es permeable a las células, es un derivado de benzoil-dihidroquinazolinona, su nombre completo es 2-(7-cloro-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina-2(1H)-ilideno)-3-(2,4-diclorofenil)-3-oxopropanonitrilo, su fórmula química es $C_{17}H_8Cl_3N_3O_2$.

Entre los blancos de la CBD se encuentra la dineína citoplasmática y los factores de transcripción Gli2 y Gli3. Se ha visto que cuando se inhibe a dineína citoplasmática se altera el huso mitótico, la formación de microtúbulos y la unión de microtúbulos-cinetocoros en concentraciones de 50 μM (Firestone *et al.*, 2013).

Sin embargo no hay trabajos donde evalúen los efectos de la inhibición de dineína citoplasmática sobre la localización de Gli1, el principal activador de la familia de proteínas Gli que activa la transcripción de los genes diana.

2.0 Antecedentes

Se ha reportado en células epiteliales bronquiales humanas (BEAS-2B), que las TiO₂ NPs dentro de las células se encuentran en aglomerados los cuales ocasionan la liberación de citosinas inflamatorias, activan vías de señalización para apoptosis e inducen aductos en el DNA a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (Park *et al.*, 2008; Bhattacharya *et al.*, 2009).

Para el caso de los neumocitos humanos tipo II (células A549), las NPs se pueden encontrar libres en el citoplasma, además la respuesta biológica de las células depende del tamaño de la partícula, fase cristalina y composición química (Simon-Deckers *et al.*, 2008).

La muerte celular causada por las NPs depende de la concentración y el tiempo de exposición ya que por ejemplo en células A549 la viabilidad celular se ve afectada con la exposición a 50 µg/ml de NPs por 4 h (Tang *et al.*, 2013), así mismo la viabilidad celular se reduce en concentraciones de 10 y 250 µg/ml por 24 h (Aueviriyavit *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2012) y 1500 µg/ml por 48 h (Sayes *et al.*, 2006).

Por otro lado la exposición de NPs a 100 µg/ml durante 24 y 48 h en células A549 no causa muerte celular (Simon-Deckers *et al.*, 2008; Moschini *et al.*, 2013), este mismo resultado se obtiene con la exposición de células A549 a 10 µg/cm² por 7 días (Medina-Reyes *et al.*, 2014; Medina-Reyes *et al.*, 2015).

Con respecto a la localización de las TiO₂ NPs en la célula, se ha observado que son internalizadas en cuerpos multivesiculares (Moschini *et al.*, 2013) o lisosomas (Bhattacharya *et al.*, 2009; Simon-Deckers *et al.*, 2008) y se localizan cerca del núcleo, retículo endoplasmático y mitocondria (Bhattacharya *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2007).

Como consecuencia de la internalización de las TiO₂ NPs, se ha reportado que la concentración de 10 µg/ml incrementa la granularidad de las células A549 a las 3 h de tratamiento (Moschini *et al.*, 2013), este mismo incremento se observa a las

24 h de exposición de fibroblastos primarios de embrión de ratón (Xu *et al.*, 2009), y en el caso de macrófagos alveolares de rata, la granularidad aumenta a 1 h de tratamiento con $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Scherbart *et al.*, 2011).

Se sabe que en células A549 una gran variedad de nanopartículas pueden unirse a los microtúbulos, para ocasionar arresto en el ciclo celular y apoptosis, tal es el caso de NPs de oro (Choudhury *et al.*, 2013), y nanotubos de carbono en células HeLa (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012). Las NPs de óxido de hierro promueven cambios conformacionales en tubulina purificada lo que ocasiona que ocurran procesos de despolimerización (Khaleghian *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas NPs (Fierro) en células endoteliales no causan la desorganización de los microtúbulos, el cual son propuestos como vehículo en la producción de fármacos (Apopa *et al.*, 2009).

Las TiO_2 NPs también pueden interaccionar con los microtúbulos y promover cambios conformacionales en la tubulina purificada generando procesos de despolimerización (Gheshlaghi *et al.*, 2008), en células epiteliales aumentan la contracción lo que impide la migración de las células (Tay *et al.*, 2013).

Así mismo, en la industria electrónica, los microtúbulos pueden servir como moldes para fabricar plantillas de NPs de plata (Behrens *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010), dispositivos de paladium (Kirsch *et al.*, 1997; Behrens *et al.*, 2002). Y en ultrasonidos se utilizan NPs de oro como vehículo de contraste (Bekeredjian *et al.*, 2002).

3.0 Justificación

El TiO_2 es un pigmento muy utilizado en todo el mundo, en la última década su demanda ha incrementado ya que es uno de los materiales más fáciles de sintetizar y sus ganancias de comercialización son muy grandes con respecto a la inversión económica para su síntesis. Los productores de TiO_2 más importantes a nivel mundial son China y Estados Unidos. Para su producción se requiere de millones de trabajadores que realicen los procesos de síntesis, procesamiento, almacenamiento y comercialización.

Actualmente a nivel internacional hay diversas agencias que han propuesto diferentes límites de exposición a TiO_2 en ambientes ocupacionales, incluso algunos países como Alemania y Holanda han propuesto sus propios límites de exposición laboral. Sin embargo en México no existe una legislación apropiada para su exposición.

En los ambientes ocupacionales los trabajadores están expuestos al TiO_2 en concentraciones bajas pero tiempos largos, donde la respiración de las NPs es una de las principales vías de exposición, esto representa un problema de salud a nivel mundial ya que estos materiales al ser depositados pueden ser internalizados por diferentes células que constituyen a los pulmones, por ejemplo los neumocitos tipo II son células que secretan proteínas surfactantes para prevenir el colapso de los pulmones al realizar el intercambio gaseoso. Estas células tienen la capacidad de internalizar a las NPs en el citoplasma y localizarlas dentro de vesículas y cuerpos lamelares. Cuando las NPs están dentro de la célula incrementan el contenido citoplasmático, ocurren procesos de inflamación, estrés oxidativo, daño a organelos y generación de aductos en el DNA.

Entre los organelos que son afectados por las NPs se encuentran los microtúbulos, estructuras que pertenecen al citoesqueleto, que sirven de sostén para dar la forma celular así como eje para la actividad de la dineína citoplasmática (proteína motora), que participa en el transporte de vesículas las

cuales pueden contener NPs, sin embargo no se conoce si la dineína citoplasmática puede regular su internalización o el tamaño de las células.

Por otro lado, cuando Gli1 (factor de transcripción) es activado, su transporte al núcleo depende de la dineína citoplasmática a través del cilio primario, una estructura formada por microtúbulos, La relación entre dineína citoplasmática y Gli1 no se conoce si puede ser alterada por las NPs.

La migración celular es importante para el desarrollo embrionario, sin embargo en enfermedades como el cáncer las células malignas tienden a migrar a otros tejidos u órganos. La formación de tumores secundarios es una de las principales causas de muerte en cáncer de pulmón y se conoce que la dineína citoplasmática es pieza clave para la migración ya que se acumula en la periferia de la membrana, en dirección a donde la célula se moverá, por esta razón es importante el estudio de la dineína citoplasmática en la migración celular.

Las NPs pueden interactuar con las subunidades α y β -tubulina de los microtúbulos, promover procesos de despolimerización y causar la degradación de las subunidades, sin embargo no se conoce si la inhibición de la proteína motora altera la estructura de los microtúbulos y si esto puede influir en la localización de Gli1.

4.0 Hipótesis

La internalización de las TiO₂ NPs (10 µg/cm²) en células A549 durante 24 h será posiblemente dependiente de la dineína citoplasmática, así mismo su inhibición (CBD) no modificará la granularidad y tamaño de las células pero reducirá la tasa de migración.

Al inhibir a la dineína citoplasmática por 24 h y exponer a las células a TiO₂ NPs por las siguientes 24 h más habrá mayor muerte celular y se disminuirá el tamaño celular por la desorganización de la red de microtúbulos.

5.0 Objetivos

5.1 *Objetivo general*

Evaluar la migración y cambios morfológicos en neumocitos humanos tipo II causados por la inhibición de dineína citoplasmática y la exposición a TiO₂ NPs.

5.2 *Objetivos particulares*

- ❖ Caracterizar las TiO₂ NPs por microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM).
- ❖ Determinar la concentración inhibitoria (IC₅₀) por la CBD en células A549.
- ❖ Evaluar la viabilidad celular de células A549 expuestas a los tratamientos de TiO₂ NPs, CBD y CBD+TiO₂ NPs.
- ❖ Observar la morfología de células A549 con los diferentes tratamientos.
- ❖ Observar la ultraestructura de células A549 expuestas a los diferentes tratamientos.
- ❖ Cuantificar la granularidad y tamaño de células A549 con los diferentes tratamientos.
- ❖ Observar la localización de Gli1 y α-tubulina en células A549 con los diferentes tratamientos.
- ❖ Cuantificar la intensidad de fluorescencia de Gli1 y α-tubulina en células A549 con los diferentes tratamientos.
- ❖ Evaluar la migración de células A549 con los diferentes tratamientos.

6.0 Materiales y métodos

6.1 Caracterización de las TiO₂ NPs

Las NPs fueron esterilizadas a 120°C por 15 min. Se realizó el stock de 1 mg de TiO₂ NPs (Sigma Aldrich, cat. No. 637254) en 1 ml de medio F12K suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (F12K+SFB). El stock fue sonicado a 60 Hz por 15 min. Para la caracterización por TEM se realizó una concentración de 3.43×10^{-3} de TiO₂ NPs y se tomaron 10 μ l los cuales se dejaron secar en papel filtro por 1 semana. Las imágenes fueron tomadas en el aparato JEOL JEM 1010 (JEOL, Japón) a un voltaje de 60 kV, magnificación de 75000 X y una resolución de 0.533 pixeles/nm².

Las imágenes para SEM fueron tomadas en el aparato JEOL 5800 (LV Japón) a un voltaje de 15 kV, magnificación de 5000 X y resolución de 26 pixeles/nm².

6.2 Cultivo celular

Los neumocitos humanos tipo II (células A549) fueron obtenidos de ATCC (cat. No. CCL-185) y cultivados en medio F12K (In Vitro, cat. No. ME-038) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (BioWest, cat. No. S-1650-500) SR-15) sin antibiótico (F12K+SFB), las células fueron mantenidas en una atmósfera de oscuridad a 37°C y 5% de CO₂.

Las células fueron tripsinizadas dos veces por semana con tripsina-EDTA (In Vitro, cat. No. EN-003) y centrifugadas a 1500 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min, posteriormente el sobrenadante fue desechado y el pellet fue resuspendido en 1 ml de F12K+SFB. El conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer con azul de tripano al 0.4% (In Vitro, cat. No. SR-15), el número total de células se calculó con la siguiente fórmula:

$$\Sigma \text{ células} = \frac{(\text{Conteo total})(\text{Volumen de células})(\text{Factor de dilución})(10,000)}{(4 \text{ cuadrantes})}$$

6.3 Reducción de MTT

Se sembraron 15,000 células en una placa de 96 pozos con 100 μ l de F12K+SFB por 24 h. Posteriormente se les retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos:

- A) *Concentración inhibitoria de CBD*. Se realizó un stock de 4000 μ M de CBD (DNS Microgenomics, cat. No. 250401) en dimetilsulfóxido grado molecular (DMSO), la solución fue almacenada a -20°C . Posteriormente las células fueron expuestas a 0, 10, 50, 100 y 250 μ M de CBD e incubadas a 37°C y 5% de CO_2 por 24 h.
- B) Gráfica de DMSO-CBD. Las células fueron expuestas a DMSO (1.25 % del volumen final) y CBD (50 μ M) e incubadas a 37°C y 5% de CO_2 por 24 h.
- C) Gráfica de inhibición-toxicidad. Las células fueron expuestas a CBD por 24 h y posteriormente fueron expuestas a TiO_2 NPs por 24 h. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO_2 .

Al finalizar los tratamientos, a todos los pozos se les retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con PBS, posteriormente las células fueron incubadas con el reactivo de MTT (Sigma Aldrich, cat. No. M2128) (Stock 5 mg de MTT en 1 ml de H_2O , dilución 1:10 v/v en medio F12K sin SFB) a 37°C y 5% de CO_2 por 2:30 h. Finalmente los sobrenadantes fueron retirados y a cada pozo se le agregó 150 μ l de isopropanol. La placa se leyó a una longitud de onda de 545 nm en el sistema de espectrofotómetro BioTek Epoch Multi-Volumen. Los datos fueron arrojados en Excel y se tomó como el 100% de reducción de MTT al grupo control. Se realizaron tres experimentos independientes y los datos fueron expresados con la media \pm SD. Los datos fueron graficados en gráfica de barras en el programa GraphPad Prism 5.

6.4 Diseño experimental

En los experimentos solamente se utilizó la concentración de $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs mientras que para la CBD se usó la concentración de $50\ \mu\text{M}$. Las células fueron divididas en los siguientes grupos: A) Control, B) TiO_2 NPs, C) CBD y D) CBD+ TiO_2 NPs.

Los grupos B y C fueron expuestos a NPs y CBD por 24 h respectivamente. Por otro lado, el grupo D fue incubado con CBD por 24 h y TiO_2 NPs por 24 h (48 h de tratamiento) (Fig. 13).

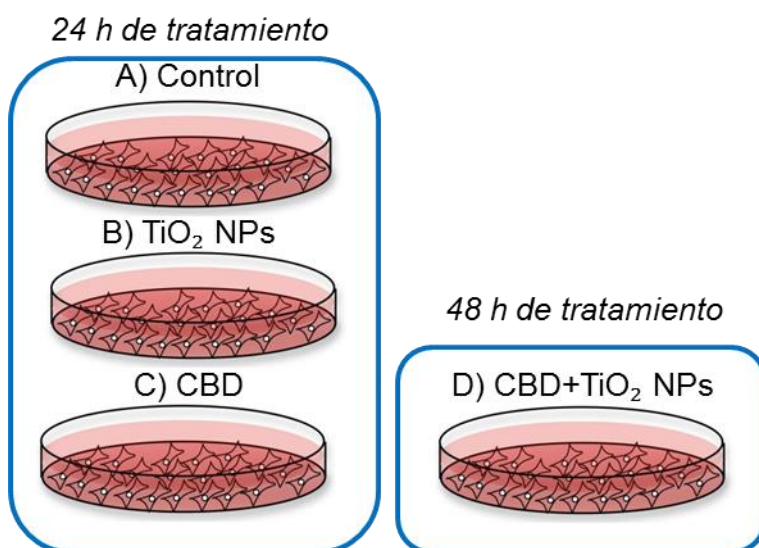


Fig. 16. Esquema general de la experimentación. El primer grupo estuvo formado por los grupos A, B y C los cuales fueron tratados por 24 h. En el segundo grupo consistió en el tratamiento de CBD seguido de la exposición a TiO_2 NPs. Al terminar los respectivos tiempos de experimentación, las células fueron procesadas para ser cuantificadas por los diferentes métodos.

6.5 Tinción con hematoxilina y eosina

Se cultivaron 170,000 células en una placa de 12 pozos con 1 ml de F12K+SFB e incubadas a 37°C y 5% de CO_2 por 24 h. Posteriormente a las células se les aplicaron los diferentes tratamientos (Ver 6.4) y al término de la experimentación las células se fijaron en 2 ml de paraformaldehído al 4% en PBS durante 2 h, enseguida fueron lavadas con PBS. El núcleo de las células fue teñido con hematoxilina por 5 min y las células se lavaron tres veces con PBS. Por último el

citoplasma fue teñido con eosina durante 10 min y las células se lavaron tres veces con PBS. Las imágenes fueron tomadas en campo claro con el microscopio Leica DMC 2900 a un aumento de 40 X. Se realizaron tres experimentos independientes y se escogieron las imágenes más representativas, los resultados fueron presentados en panel de imágenes.

6.6 Ultraestructura celular

Se sembraron 200,000 células en cajas de 8 cm² con 1 ml de medio F12K+SFB e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente se aplicaron los diferentes tratamientos (Ver 6.4) y las células fueron despegadas con tripsina-EDTA y centrifugadas a 1500 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min. Las células fueron resuspendidas en glutaraldehído al 2% a temperatura ambiente por 2 h para después ser resuspendidas en la solución de fosfatos Sorensen y centrifugadas tres veces a 1500 rpm por 5 min.

Las células fueron post-fijadas con tetraóxido de osmio (O₂O₄)-Sorensen (2% de osmio en 200µl de buffer de fosfatos Sorensen (Na₂HPO₄+NaH₂PO₄·H₂O)) durante toda la noche. Enseguida las muestras fueron lavadas y centrifugadas a 1500 rpm, tres veces con el buffer “fosfatos Sorensen”. Para la deshidratación las muestras fueron resuspendidas en alcohol etílico al 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%, por intervalos de 10 min, cada uno. Enseguida las células fueron infiltradas en una mezcla de alcohol absoluto: Resina epoxica a proporciones de 1:1, 1:2 y 1:3 por tiempos de 2 h y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Finalmente las células fueron inmersas en resina pura y polimerizadas a 80°C durante 48 h. las muestras fueron cortadas en un ultramicrotomo a 70 nm de grosor.

6.7 Citometría de flujo

Se sembraron 500,000 células en cajas de 21 cm² con 3 ml de F12K+SFB e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente se aplicaron los diferentes tratamientos (Ver 6.4) y fueron despegadas con EDTA estéril y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Las células fueron resuspendidas en alcohol

etílico al 70% en frío previamente filtrado y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Para su lectura las muestras fueron resuspendidas en 1 ml de Fasc Flow (BD Biosciences cat. No. 342003) en tubos BD Falcon para leer 10,000 eventos en el citómetro de flujo (BD FASCalibur).

Los datos fueron representados en histogramas, la dispersión de luz frontal (FSC) representó el tamaño de las células mientras la dispersión frontal (SS) mostró la densidad intracelular.

Se realizaron cuatro experimentos independientes y los datos fueron expresados con la media \pm SD y graficados en el programa GraphPad Prism 5.

6.8 Inmunofluorescencia de Gli1 y α -tubulina

En placa de 12 pozos se colocó un cubreobjetos donde se cultivaron 150,000 células con 1 ml de medio F12K+SFB e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente se aplicaron los diferentes tratamientos (Ver 6.4) y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS por 2 h, lavadas con PBS y permeabilizadas con acetona fría por 5 min. Los epítomos fueron bloqueados con albúmina sérica (1%) en PBS a temperatura ambiente por 2:30 h. Enseguida las células fueron incubadas con el anticuerpo Gli1 anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, cat. No. sc-20687) dilución 1:50 en PBS a 4°C por toda la noche. Posteriormente se lavaron con PBS-tritón (0.5%) 3 veces por 5 min y PBS. Las células fueron incubadas a 37°C por 2:30 h en oscuridad con el segundo anticuerpo anti-gli1 (Texas Red Jackson ImmunoResearch, cat. No. 111-075-003) dilución 1:100 en PBS. Para el núcleo se utilizó Hoechst (Thermo Scientific, cat. No. 62249), dilución 1:100 en PBS.

Para la tinción de los microtúbulos, se siguió la previa metodología solo que utilizando el anticuerpo α -tubulina anti-ratón (Abcam, cat. No. ab80779) dilución 1:50 en PBS y como segundo anticuerpo a FITC (Jackson ImmunoResearch cat. No. 111-075-003) dilución 1:100 y Hoechst (Thermo Scientific, cat. No. 62249) dilución 1:100 en PBS.

Para finalizar las células fueron lavadas con PBS y montadas en portaobjetos con 7 μ l de PBS-Glicerol (1:3), selladas con barniz de uñas las imágenes se tomaron en el microscopio Carl Zeiss.

6.9 Ensayo de cicatrización de herida

Se sembraron 400,000 células en una placa de 12 pozos y las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h. Después de su incubación, en la monocapa celular se realizó una herida con ayuda de una punta de una micropipeta de 1000 μ l, las células se lavaron con PBS y se les aplicaron los diferentes tratamientos (Ver 6.4).

Las células se fijaron con 2 ml de paraformaldehído al 4% en PBS por 2 h y fueron lavadas con PBS. Las imágenes fueron tomadas a campo claro con el microscopio Leica DMC 2900 a un aumento de 4X y procesadas en el programa TScratch. La sanación de la herida en el grupo control se tomó como el 100% de tasa de migración. Se realizaron cuatro experimentos independientes y los datos fueron expresados con la media \pm SD para ser graficados en el programa GraphPad Prism 5.

6.10 Análisis estadístico

Las diferencias relacionadas con los tratamientos fueron evaluados utilizando análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con el test de Kruskal-Wallis y prueba de Dunns. Los datos con una $p < 0.05$ fueron considerados significantes y fueron expresados con su media y desviación estándar \pm SD en el programa GraphPad Prism 5.

7.0 Resultados

7.1. Caracterización de las TiO_2 NPs

A) Las TiO_2 NPs suspendidas en medio F12K+SFB (10%) y observadas por microscopía electrónica de barrido formaron agregados mayores a $1\ \mu m$. B) Las TiO_2 NPs en seco observadas por microscopía electrónica de transmisión se observaron dispersas y menores a $100\ nm$ (Fig. 17).

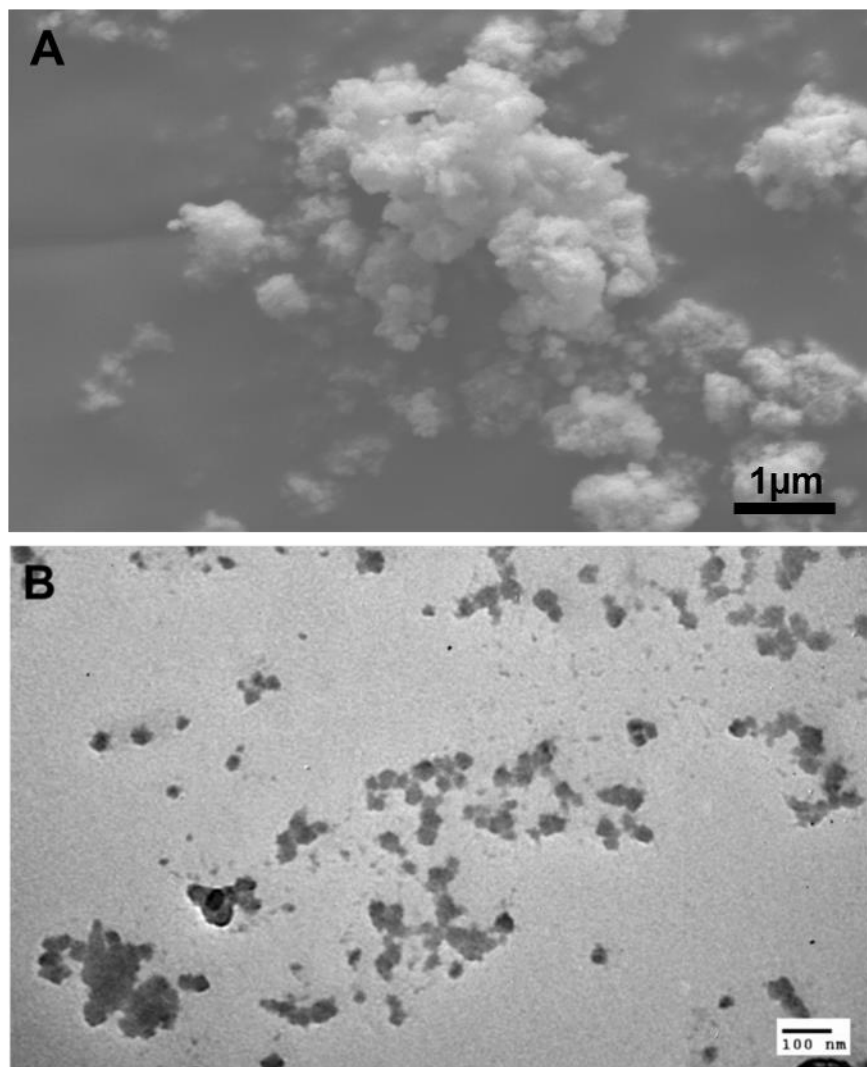


Fig. 17. Caracterización de TiO_2 NPs. A) Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las TiO_2 NPs en medio F12K+SFB (10%) y B) por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en seco. Barra de escala = $1\ \mu m$ y $100\ nm$ respectivamente.

7.2. Viabilidad celular

A) La concentración de 50, 100 y 200 μ M de CBD provocó 18.35 \pm 5.30%, 57.72 \pm 3.10% y 71.87 \pm 3.86% de muerte celular respectivamente. B) El vehículo DMSO no disminuyó la viabilidad celular, mientras que la CBD (50 μ M) causó una muerte celular de 20.61 \pm 3.63%. C) La exposición a CBD (50 μ M)+TiO₂ NPs exacerbó la disminución de la viabilidad celular (Fig. 18).

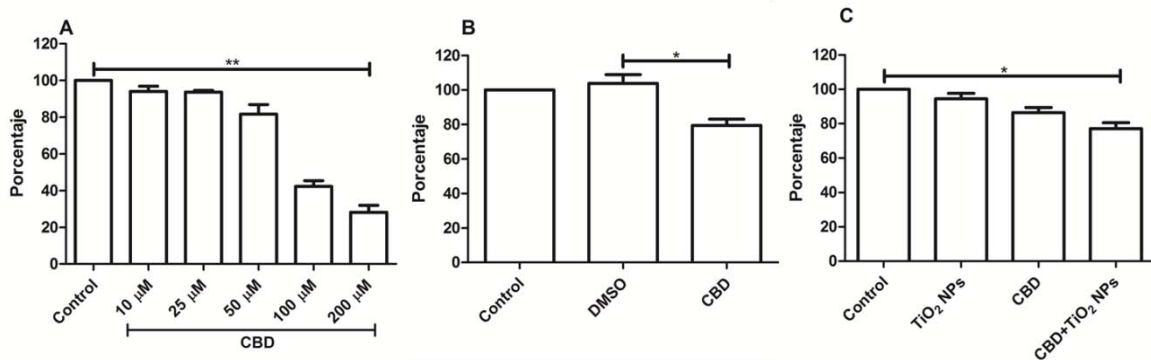


Fig. 18. Viabilidad celular en neumocitos humanos tipo II. Células A549 expuestas a A) CBD (0, 10, 25, 50, 100, 250 μ M), B) DMSO (1.25%) y CBD (50 μ M), C) TiO₂ NPs (10 μ g/cm²), CBD (50 μ M) y CBD (50 μ M)+TiO₂ NPs (10 μ g/cm²). Los resultados fueron comparados con el grupo control. Se realizó tres experimentos independientes. \pm SD **p<0.05, ***p<0.001.

7.3. Forma celular A549

La tinción de hematoxilina y eosina nos permitió observar el citoplasma (tonalidad rosa) y núcleo de las células (tonalidad morada) respectivamente. En el panel de imágenes se presenta al grupo control (Fig. 19A), la exposición de células A549 a TiO_2 NPs (Fig. 19B), CBD (Fig. 19C) y CBD+ TiO_2 NPs (Fig. 19D). Las TiO_2 NPs se observaron en el citoplasma de las células A549, por lo que estamos seguros que fueron internalizadas (Fig. 19B, 19D).

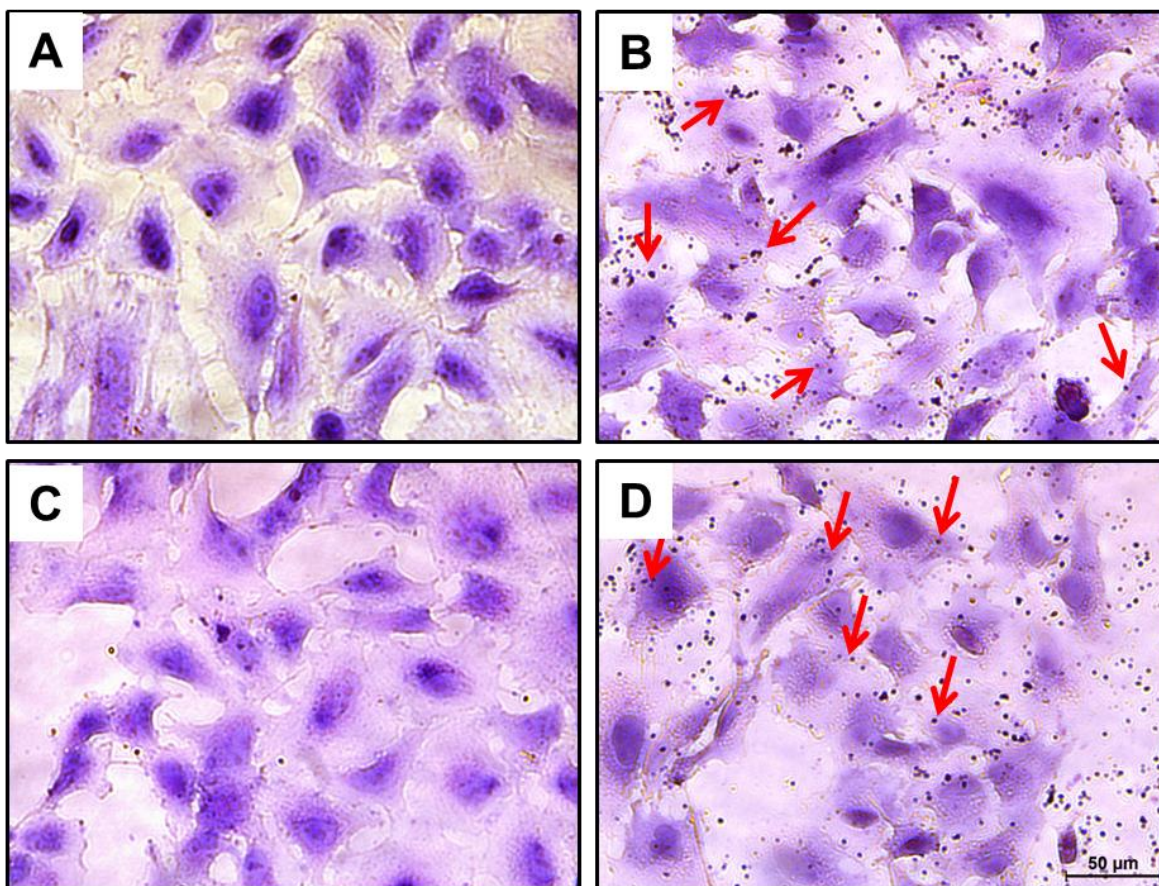


Fig. 19. Imágenes de células A549 teñidas con hematoxilina y eosina. Imágenes obtenidas por microscopía en campo claro en el microscopio Leica DMC 2900 con aumento de 40 X. A) Control, B) TiO_2 NPs y C) CBD a las 24 h de tratamiento. D) CBD+ TiO_2 NPs a las 48 h de tratamiento. Se muestran las imágenes más representativas de tres experimentos independientes, las flechas rojas señalan a las NPs. Barra de escala=50µm.

7.4. Ultraestructura de células A549 con los diferentes tratamientos

Las células fueron procesadas para TEM. Células binucleadas fueron observadas en muestras control y tratadas con TiO₂ NPs (Fig. 20A, 20B); en las células control se observó un gran contenido de vesículas y cuerpos lamelares en el citoplasma (Fig. 20A); la CBD no afectó la cantidad de vesículas y cuerpos lamelares, sin embargo el núcleo se observó más grande (Fig. 20C). Las TiO₂ NPs fueron localizadas en el citoplasma, dentro de vesículas y cerca de cuerpos lamelares (Fig. 20B, 20D).

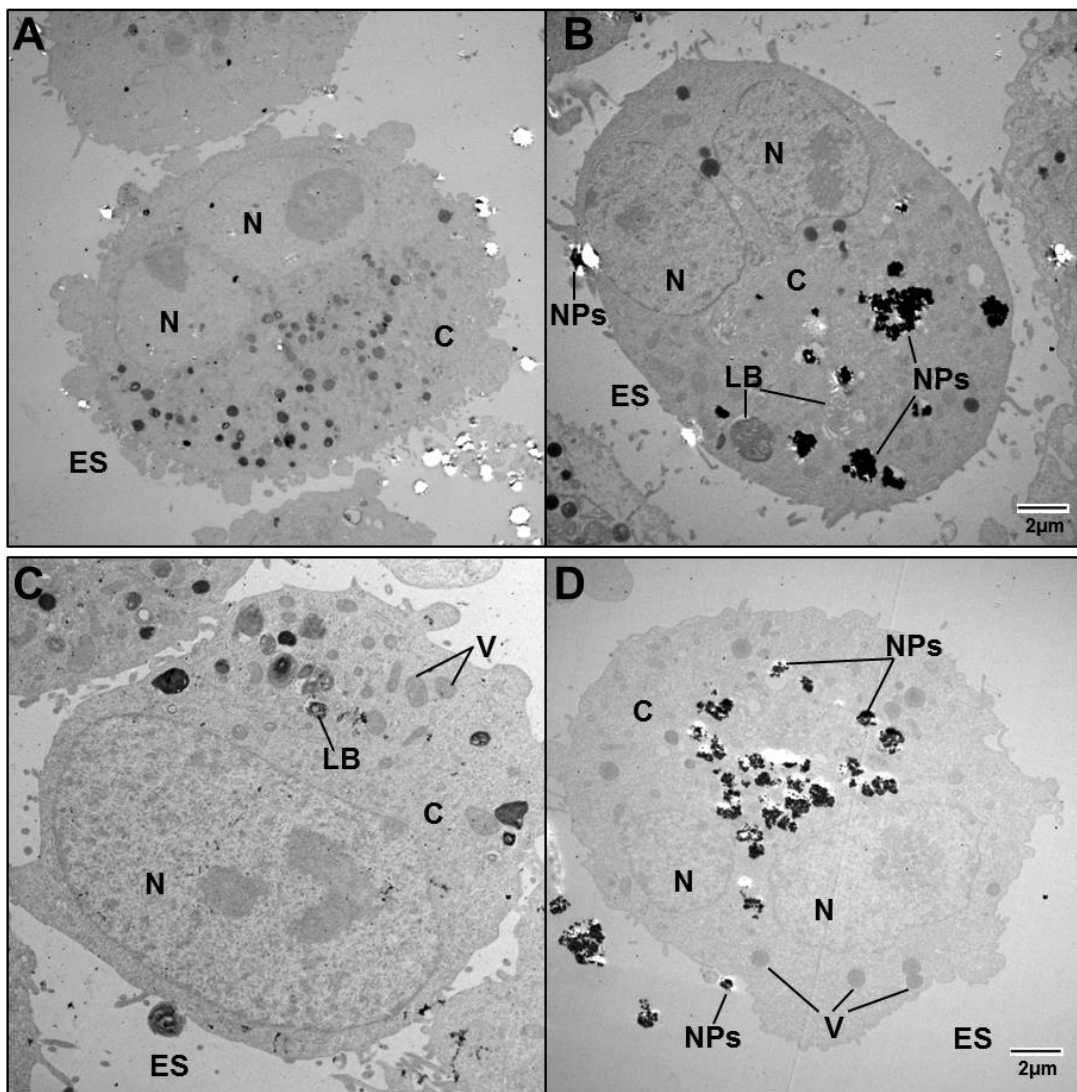


Fig. 20. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células A549. Las imágenes fueron tomadas en el aparato JEOL JEM con una magnificación de 4000x a 15000x. A) Grupo control, B) TiO₂ NPs, C) CBD y D) CBD+TiO₂ NPs. NPs=TiO₂ NPs, C=citoplasma, N=núcleo, ES=espacio extracelular, V=vesículas, LB=cuerpos lamelares, MB=cuerpos multivesiculares. Se realizaron cortes de 70 nm de grosor y se muestran las imágenes más representativas. Barra de escala=2 μm.

7.5. Granularidad y tamaño de células A549

La granularidad se refiere al contenido de la célula como estructuras y organelos (Zucker et al., 2010), este parámetro y el tamaño celular se cuantificó por citometría de flujo y los datos fueron representados en histogramas (Fig. 21A, 21C). Las TiO₂ NPs incrementaron la granularidad (Fig. 21B) y la exposición a CBD y TiO₂ NPs disminuyeron el tamaño de las células (Fig. 21D), los resultados fueron comparados entre los diferentes tratamientos.

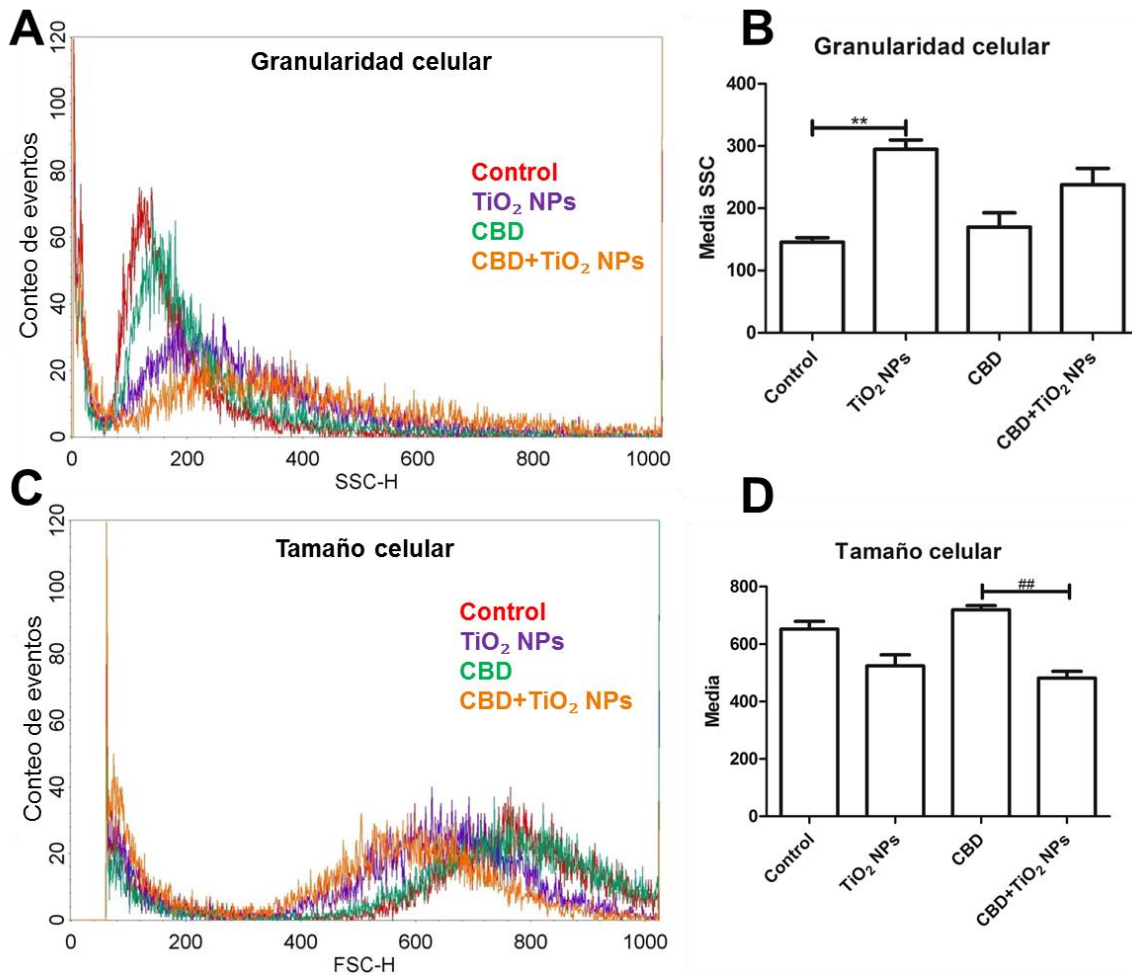


Fig. 21. Granularidad y tamaño de células A549 por citometría de flujo. A, B) Histograma y gráfica de granularidad celular, C, D) Histograma y gráfica de tamaño de células A549. Se realizaron cuatro experimentos independientes, cada lectura consistió en 10,000 eventos. SSC (Side-scattered light), FSC (Forward-scattered light). Los resultados se presentan como el promedio \pm SD; ** $p < 0.01$ vs TiO₂ NPs; ## $p < 0.01$ vs CBD.

7.6. Localización e intensidad de fluorescencia de Gli1

En todos los tratamientos la localización de Gli1 se sugiere su presencia en citoplasma (Fig. 22A). Sin embargo, cuando se usó la CBD se incrementó la intensidad de fluorescencia en 41.72 unidades con respecto al grupo control mientras que la exposición a CBD+TiO₂ NPs ocasionó que la intensidad de fluorescencia fuera similar con respecto al control (Fig. 22B).

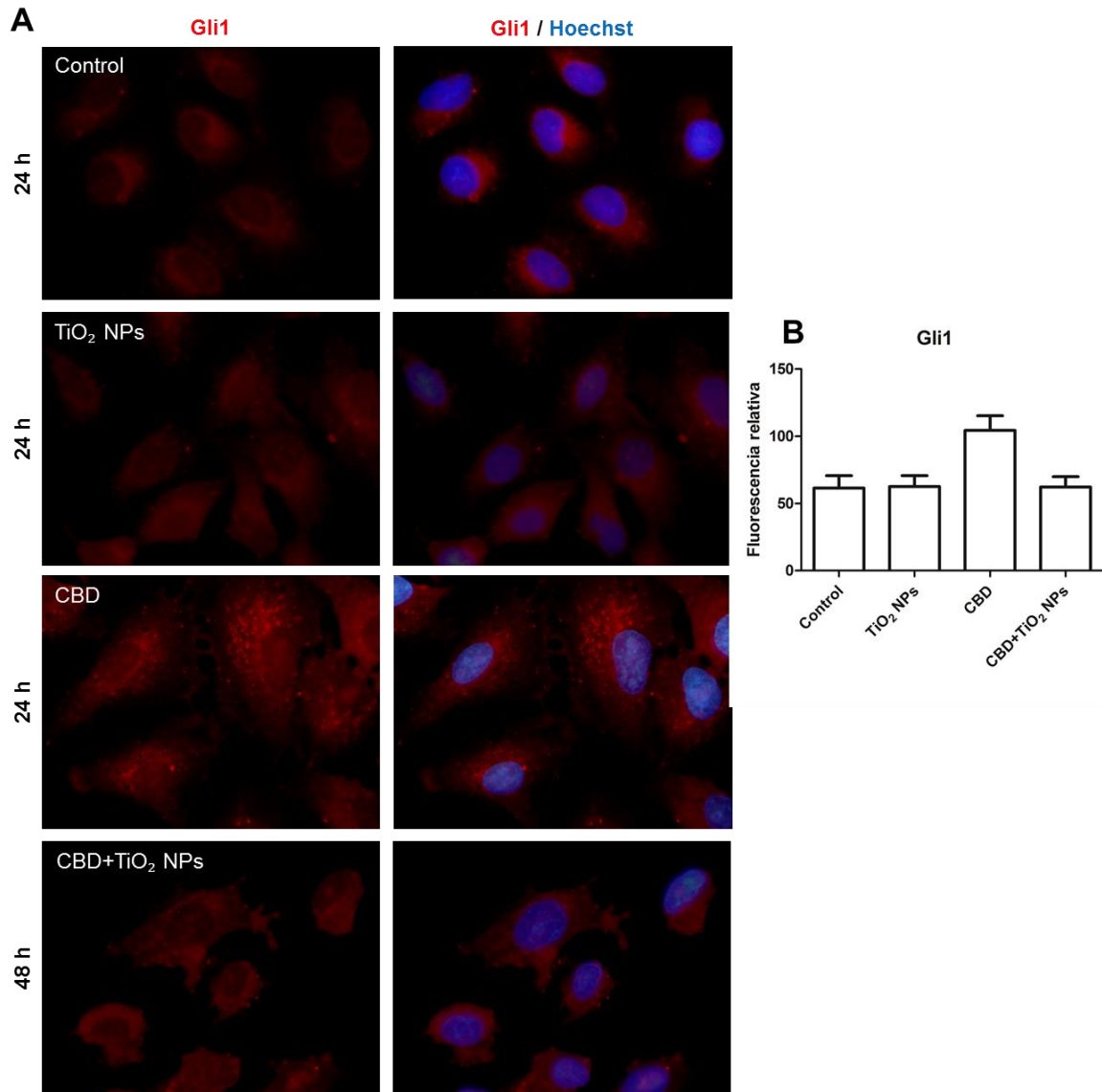


Fig. 22. Localización de Gli1 en células A549 y su fluorescencia relativa. A) El factor de transcripción Gli1 fue localizado con el anticuerpo anti-Gli1 (color rojo) y el núcleo fue teñido con Hoechst (color azul). B) La fluorescencia relativa se cuantificó a través de Software del microscopio confocal Leica y los datos se presentaron con el promedio \pm SD. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

7.6. Localización e intensidad de fluorescencia de α -tubulina

En el grupo control, α -tubulina se localizó en el citoplasma, además fue posible observar la red de microtúbulos lo cuales fueron desorganizados por las NPs. Los tratamientos de TiO₂ NPs y CBD incrementaron la intensidad de fluorescencia en 33.91 y 41.06 unidades respectivamente, comparados contra el grupo control.

La exposición a CBD+TiO₂ NPs disminuyó en 19.13 unidades, la intensidad de fluorescencia de α -tubulina ocasionada por la inhibición de dineína citoplasmática (Fig. 23).

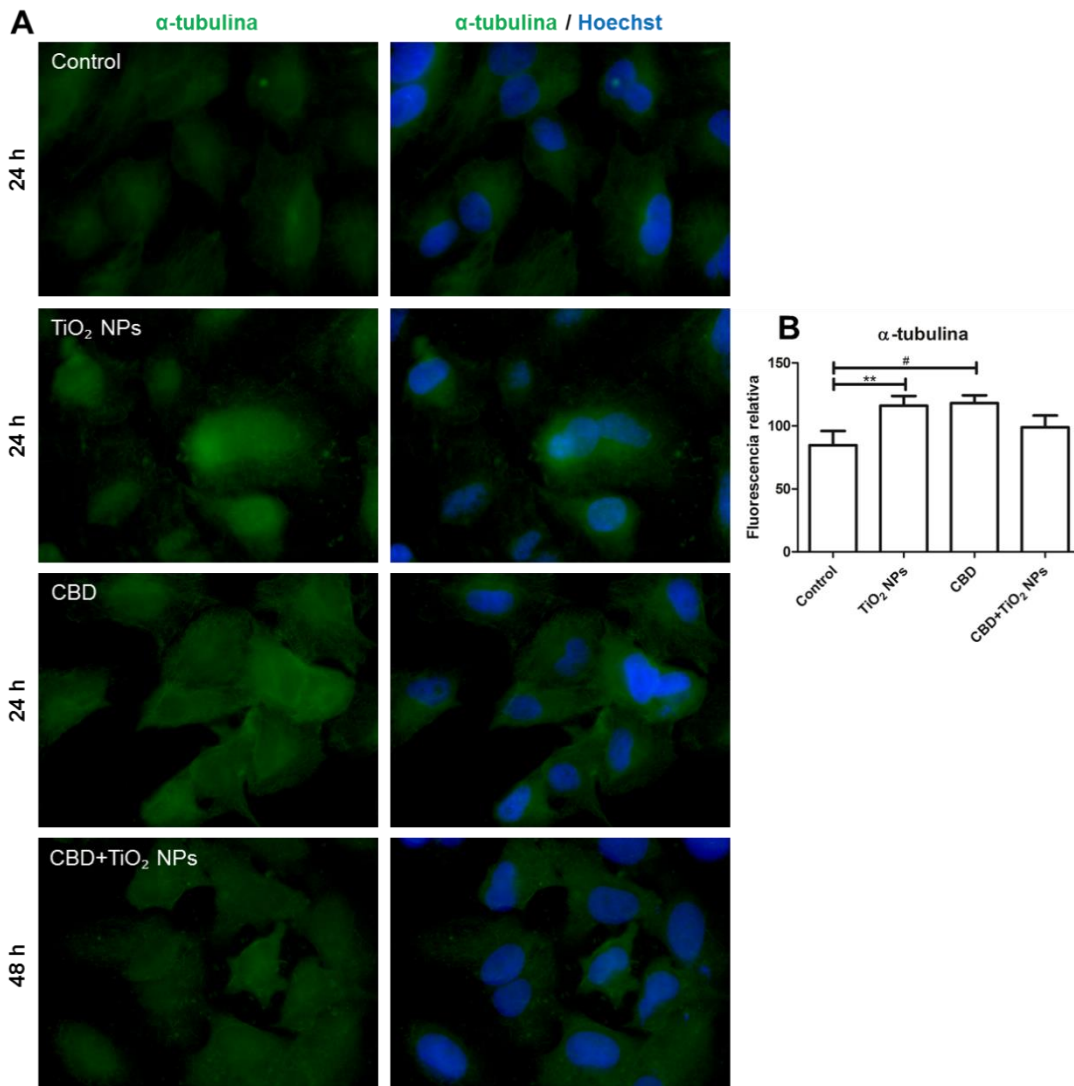


Fig. 23. Localización de α -tubulina en células A549 y su fluorescencia relativa. A) La subunidad α -tubulina fue teñida con el anticuerpo anti- α -tubulina (color verde) y el núcleo fue teñido con Hoechst (color azul). B) La fluorescencia relativa se cuantificó a través de Software del microscopio confocal Leica y los datos se presentaron con el promedio \pm SD. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

7.7. Tasa de migración celular

El área en la monocapa celular a las 0 h se tomó como el 100% de área de migración disponible (Fig. 24A). La tasa de migración del grupo control y TiO₂ NPs a las 48 h fue de 50.62 ±6.46% y 52.71 ±6.51% respectivamente (Fig. 24A, 24B). Sin embargo los tratamientos con CBD y CBD+ TiO₂ NPs redujeron parcialmente la migración celular en 14.73 ±4.08% y 26.87 ±6.80% (Fig. 24C, 24D). Los resultados fueron corroborados por gráfico de barras (Fig. 24E).

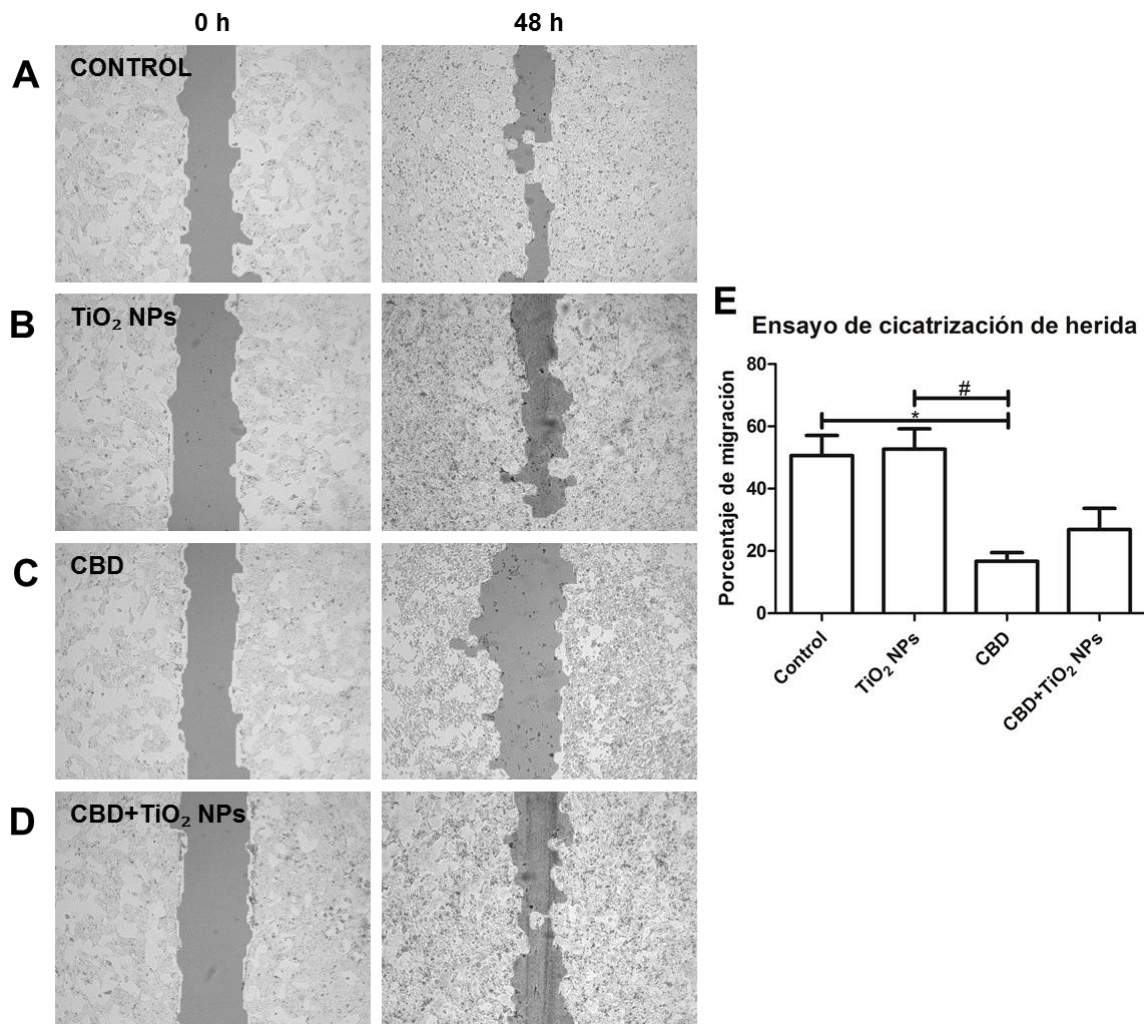


Fig. 24. Tasa de migración de células A549 a las 48 h y su cuantificación. Las TiO₂ NPs no causan un aumento en la tasa de migración mientras que la CBD reduce la migración de células A549. Se realizaron cuatro experimentos independientes y los datos se presentan como el promedio ±SD *p<0.05 vs control; ##p<0.05 vs TiO₂ NPs.

8. Discusión

Los aglomerados que forman las TiO₂ NPs en suspensión determinan su efecto citotóxico y genotóxico (Magdolenova *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 2013). En este trabajo el tamaño de los aglomerados de >1 µm de NPs puede deberse a la formación de la “proteína corona” en su superficie. Esta es una capa de diferentes componentes en suspensión que se asocian a las NPs (Hamad-Schifferli, 2013). Esta “proteína corona” no necesariamente está formada de proteínas, ya que las NPs pueden interactuar con diversos componentes (Saptarshi *et al.*, 2013), por ejemplo el medio de cultivo F12K+SFB contiene albúmina, antitripsina, alipoproteínas, biotina (Baker *et al.*, 1988), sales inorgánicas, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, lípidos y factores de crecimiento (Zheng *et al.*, 2006) los cuales pueden favorecer que se formen los aglomerados de las NPs.

Para la caracterización de las TiO₂ NPs en seco se observaron tamaños mayores a 100 nm, esto es atribuido a la absorción de humedad en su superficie que les permite formar los aglomerados (Kozlov *et al.*, 2003), incluso esta humedad relativa reduce la actividad fotocatalítica del TiO₂ (Kakinoki *et al.*, 2003).

En cuanto a su toxicidad se sabe que las NPs más pequeñas son las que pueden causar más daño celular (Demir *et al.*, 2015) ya que por ejemplo las NPs de 12 (Simon-Deckers *et al.*, 2008), 20 (Chen *et al.*, 2006), 25 (Aueviriyavit *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2012) y 47 nm (Moschini *et al.*, 2013) son más tóxicas que las NPs de 140 (Simon-Deckers *et al.*, 2008), 200 (Gurr *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2009) y 250 nm (Chen *et al.*, 2006).

El tiempo y la frecuencia de sonicación son factores a considerar para la toxicidad de las NPs, ya que las TiO₂ NPs previamente sonicadas a 100 Hz por 5 min (Srivastava *et al.*, 2012) y 60 Hz por 30 min (Sayes *et al.*, 2006) disminuyen la población celular en 7 y 16% respectivamente.

Hay trabajos en donde las NPs son resuspendidas en DMEM-F12+SFB (Srivastava *et al.*, 2012), MEM (Tang *et al.*, 2013), F12K+SFB (Aueviriyavit *et al.*,

2012), H₂O (Simon-Deckers *et al.*, 2008; Moschini *et al.*, 2013) y H₂O Milli-Q (Sayes *et al.*, 2006). Todos estos medios son diferentes en cuanto a sus componentes y esto influye en la formación de la “proteína corona”, pieza clave para la toxicidad de las NPs ya que puede favorecer su internalización, acumulación, degradación y liquidación de las nanopartículas (Saptarshi *et al.*, 2013).

Las concentraciones de TiO₂ y el tiempo de exposición a células A549 son una variable para la toxicidad en la que pocos trabajos coinciden. En la mayoría de los estudios, los tratamientos consisten en la exposición de 24 h a las concentraciones de 10 (Srivastava *et al.*, 2012), 100 (Simon-Deckers *et al.*, 2008; Moschini *et al.*, 2013) y 250 µg/ml de TiO₂ (Aueviriyavit *et al.*, 2012) donde se ha encontrado que las NPs podrían causar hasta 28% de muerte celular o no causarla (Aueviriyavit *et al.*, 2012; Moschini *et al.*, 2013). En otros estudios la exposición de 50 µg/ml por 4 h (Tang *et al.*, 2013) y 1500 µg/ml por 48 h (Sayes *et al.*, 2006) causan muerte celular del 12.5 y 16% respectivamente.

Los datos anteriores muestran la dificultad para comparar los efectos de TiO₂ NPs en las células A549. Entre las variables a considerar se encuentran: medio de resuspensión, tiempo y frecuencia de sonicación, concentración de NPs y tiempo de exposición, etc.

Uno de los parámetros a observar fue la forma celular que depende en parte de la estabilidad de los microtúbulos (Wloga & Gaertig, 2010). Entre los factores que pueden dañar su estabilidad se encuentran las NPs, las cuales pueden interactuar con las subunidades α/β-tubulina, promoviendo la despolimerización de la red de microtúbulos y rompiendo la compresión intracelular (Gheshlaghi *et al.*, 2008; Tay *et al.*, 2013), esto trae como consecuencia que la célula entre en estrés estructural.

En los resultados obtenidos, la intensidad de fluorescencia de α-tubulina incrementa con los tratamientos de NPs y CBD con respecto al control, mientras que en el grupo CBD+TiO₂ NPs no mostró diferencias significativas con respecto a

los demás tratamientos. Los resultados sugieren que las NPs y la CBD podrían estar desestabilizando y promoviendo la despolimerización de los microtúbulos, lo cual se vio reflejado en el cambio de forma celular, corroborado con la tinción de H&E.

En diferentes estudios se ha observado la internalización de TiO₂ NPs en diferentes regiones de la célula, por ejemplo: en el citoplasma (Susuki *et al.*, 2007), dentro de vesículas (Márquez-Ramírez *et al.*, 2012; Moschini *et al.*, 2013), cuerpos lamelares (Singh *et al.*, 2007), cerca del aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso y mitocondria (Singh *et al.*, 2007; Bhattacharya *et al.*, 2009), incluso dentro del núcleo donde pueden causar daños a DNA (Bhattacharya *et al.*, 2009). En nuestros resultados las NPs solo se observaron dentro de vesículas y cuerpos lamelares distribuidas en el citoplasma. Aunque en este trabajo no se determinó el mecanismo por el cual fueron internalizadas, se conoce que las NPs pueden entrar a la célula por difusión pasiva, fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis dependiente de caveolina, endocitosis dependiente de clatrina y endocitosis independiente de caveolina y clatrina (Panariti *et al.*, 2012; Saptarshi *et al.*, 2013).

Las NPs al ser internalizadas por las células pueden incrementar la granularidad celular dependiendo de la concentración utilizada. Por ejemplo: 1, 10 y 100 µg/ml de NPs de MgNPs-Fe₃O₄ (Watanabe *et al.*, 2013) y 1µg/ml de óxido de cerio (CeO₂) (Mittal & Pandey, 2014) incrementan la granularidad.

En células A594 expuestas a 10 µg/ml TiO₂ por 3 h se incrementa la granularidad de manera dependiente de la concentración (Zucker *et al.*, 2010; Moschini *et al.*, 2013). Los resultados de este trabajo (10 µg/cm² por 24 h) apoyan lo antes descrito.

Actualmente no hay referencias que reporten si la expresión de Gli1 se ve afectada por las TiO₂ NPs o por la inhibición de dineína citoplasmática. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la inhibición de dineína citoplasmática por efecto de la CBD promueve el incremento en la intensidad de

fluorescencia de Gli1, sin embargo, en el co-tratamiento de CBD+TiO₂ NPs la intensidad de fluorescencia de Gli1 disminuyó y fue similar al grupo control. Una posible explicación es: 1.- En el grupo de CBD, Gli1 no fue transportado a núcleo de manera normal y se acumuló en citoplasma. 2.- Debido a que Gli1 es un factor de transcripción que activa cascadas de señalización. En el tratamiento de CBD+TiO₂ NPs las células estuvieron en constante estrés durante 48 h lo que pudo promover la degradación de Gli1 por vías de señalización. Tal sugerencia puede ser demostrada por Western Blotting y otras técnicas.

Finalmente, en trabajos recientes han reportado que las TiO₂ NPs con tamaños de 14 nm causan mayor migración de células madre mesenquimales con respecto a las de 108 y 196 nm (Hou *et al.*, 2013). En este trabajo se utilizaron NPs de 25 nm donde no hubo diferencias significativas en el incremento de la tasa de migración celular, estos resultados son apoyados en células de la mucosa oral (células TRI46) expuestas a TiO₂ NPs de 21±8 nm (Tay *et al.*, 2014), lo cual reflejan que la migración depende del tipo de células y el tamaño de las NPs. Además, que las nanopartículas son más tóxicas que las micropartículas (Demir *et al.*, 2015).

9.0 Conclusiones

- Las TiO₂ NPs suspendidas en medio F12K+SFB forman agregados.
- Las NPs sonicadas y a 10 µg/cm² no causan muerte celular a las 24 h.
- La previa inhibición de dineína citoplasmática y la posterior exposición a NPs disminuyó el tamaño y causó muerte celular a las 48 h.
- La dineína citoplasmática no regula el tamaño de las células ni la internalización de las NPs.
- La exposición a TiO₂ NPs y la inhibición de la proteína promueve la despolimerización de los microtúbulos sin embargo el co-tratamiento no tiene efecto aditivo.
- La migración celular puede depender parcialmente de la dineína citoplasmática.

10.0 Recomendaciones

En México la producción de TiO₂ está incrementando debido a la gran demanda de nanomateriales en todo el mundo. Sólo en Altamira, Tamaulipas la empresa DuPont actualmente produce 150,000 toneladas de TiO₂ y para el 2016 se ampliará esta planta para que se produzcan 300,000 toneladas. Este nuevo proyecto generará entre 150 y 200 empleos directos y un promedio de 200 a 300 empleos indirectos. Esto involucra que nuevos trabajadores estén expuestos al TiO₂ por lo que se recomienda una mejor legislación para los límites de exposición a estos nanomateriales.

Ya que las TiO₂ NPs causan daños tóxicos en pulmón se propone que se tomen medidas de precaución adecuadas para reducir la inhalación de estas NPs ya que si se hace caso omiso a este punto, los daños que causan las NPs pueden ser potencializadas por los materiales derivados de la combustión automotriz, otro problema que se presenta en las grandes ciudades.

También es importante mencionar que las TiO₂ NPs pueden llegar a dañar los ecosistemas, incluso hay estudios en peces donde se ha visto que las NPs se depositan en sus branquias y esto también genera problemas a estos organismos,

por lo que también debe de existir una ley acerca de donde desechar los residuos de las TiO_2 NPs.

Por último se recomienda investigar más acerca de las dineínas citoplasmáticas y las funciones que llevan a cabo ya que son un blanco importante para reducir la migración celular y proteínas importantes para un posible tratamiento contra el cáncer de pulmón.

11.0 Esquema propuesto en este trabajo

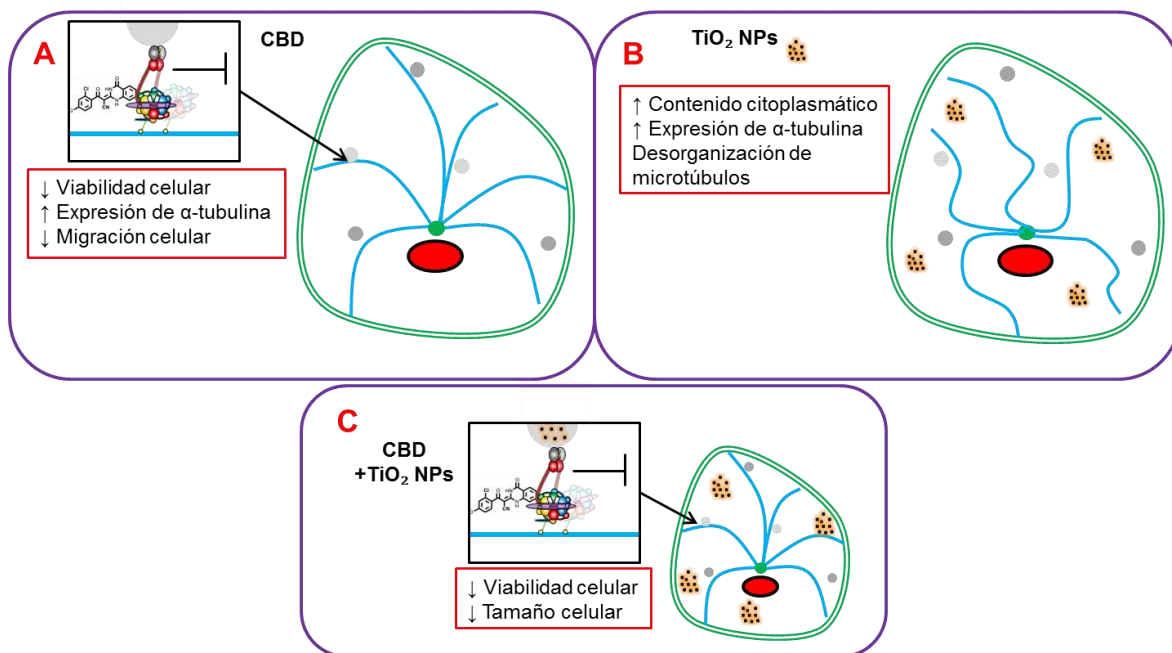


Fig. 25. Consecuencias de la inhibición de la dineína citoplasmática y la posterior exposición a TiO_2 NPs en células A549. **A)** La inhibición de dineína citoplasmática disminuye la viabilidad posiblemente porque se activan vías de apoptosis, así mismo la cantidad de α -tubulina aumenta porque no ocurren procesos de despolimerización y polimerización y esto repercute en que se inhiba parcialmente la migración celular. **B)** Las TiO_2 NPs pueden ser internalizadas por los procesos de endocitosis y ser localizadas en el citoplasma, esto trae como consecuencia que aumente la granularidad y la expresión de α -tubulina porque las NPs pueden interactuar con los microtúbulos y causar su desorganización. **C)** Al inhibir previamente la proteína motora y exponer las células a TiO_2 NPs disminuye la viabilidad celular debido al posible estrés causado por el inhibidor, la internalización de las NPs y la desorganización de los microtúbulos que disminuye el tamaño celular.

12.0 Perspectivas

- Realizar los tratamientos en un co-cultivo para evaluar la migración de células A549 en superficie de tercera dimensión.
- Cuantificar la cantidad de TiO_2 internalizado por las células A549.
- Evaluar la expresión de Gli1 en citoplasma y núcleo con la inhibición de dineína citoplasmática y la exposición a TiO_2 NPs.
- Evaluar la expresión de moléculas de adhesión como MMP-2, MMP-9, E-caderina.
- Realizar una coimmunoprecipitación de la CBD con receptores Ptch1 y Smo.

13.0 Referencias

- ACGIH. 2001. Titanium dioxide. In: Documentation of the threshold limit values for chemical substances. 7th ed. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
- Acharya B. R., S. Bhattacharyya, D. Choudhury, G. Chakrabarti. 2011. The microtubule depolymerizing agent naphthazarin induces both apoptosis and autophagy in A549 lung cancer cells. *Apoptosis*. Sep;16(9):924-39.
- Allouche J. 2008. Synthesis of Organic and Bioorganic Nanoparticles: An Overview of the Preparation Methods. *Nanomaterials: A Danger or a Promise?*. 27-74.
- Anderson C. T., T. Stearns. 2009. Centriole Age Underlies Asynchronous Primary Cilium Growth in Mammalian Cells. *Current Biology*. 19:1498-1502.
- Apopa P. L., Y. Qian, R. Shao, N. L. Guo, D. Schwegler-Berry, M. Pacurari, D. Porter, X. Shi, V. Vallyathan, V. Castranova, D. C. Flynn. 2009. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Particle and Fibre Toxicology*. Jan 9;6:1.
- ATCC. A549 (ATCC® CCL-185™). [Fecha de consulta: Febrero 2015]. Disponible en: <http://www.atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#generalinformation>
- Aueviriyavit S., D. Phummiratch, K. Kulthong, R. Maniratanachote. 2012. Titanium dioxide nanoparticles-mediated in vitro cytotoxicity does not induce Hsp70 and Grp78 expression in human bronchial epithelial A549 cells. *Biological Trace Element Research*. Oct;149(1):123-32.
- Baan R., K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Coglianò, on behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. 2006. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. 7.
- Bai C. B., D. Stephen, A. L. Joyner. 2004. All Mouse Ventral Spinal Cord Patterning by Hedgehog Is Gli Dependent and Involves an Activator Function of Gli3. *Developmental Cell*. 6:103-115.
- Baker H., B. DeAngelis, O. Frank. 1988. Vitamins and other metabolites in various sera commonly used for cell culturing. *Experientia*. 44(11-12):1007-1010.
- Bar-Eli, M. 2007. The HOG-GLI face of melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 20:341-342.
- Barillet S., A. Simon-Deckers, N. Herlin-Boime, M. Mayne-L'Hermite, C. Reynaud, D. Cassio, B. Gouget, M. Carrière. 2010. Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study. *Journal of Nanoparticle Research*. 12:61-73.
- Bhattacharya K., M. Davoren, J. Boertz, R. PF Schins, E. Hoffmann, E. Dopp. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 6:17.
- Behrens S., K. Rahn, W. Habicht, K.-J. Böhm, H. Rösner, E. Dinjus, E. Unger. 2002. Nanoscale Particle Arrays Induced by Highly Ordered Protein Assemblies. *Advanced Materials*. 14:1621-1625.
- Behrens S., W. Jin, H. Wilhelm, E. Unger. 2004. Silver Nanoparticle and Nanowire Formation by Microtubule Templates. *Chemistry of Materials*. 16(16),3085-3090.
- Bekeredjian R., S. Behrens, J. Ruef, E. Dinjus, E. Unger, M. Baum, H. F. Kuecherer. 2002. Potential of gold-bound microtubules as a new ultrasound contrast agent. *Ultrasound in Medicine and Biology*. May;28(5):691-5.
- Bermudez O., E. Hennen, I. Koch, M. Lindner, O. Eickelberg. 2013. Gli1 Mediates Lung Cancer Cell Proliferation and Sonic Hedgehog-Dependent Mesenchymal Cell Activation. *Plos One*. 8:5.
- Bloom G. S. 1992. Motor proteins for cytoplasmic microtubules. *Current Opinion in Cell Biology*. Feb;4(1):66-73.
- Bolaños, A. L., C. M. Milla, J. C. Lira, R. Ramírez, M. Checa, L. Barrera, J. García-Alvarez, V. Carbajal, C. Becerril, M. Gaxiola, A. Pardo, M. Selman. 2012. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 303:L978-L990.
- Bravo-Cordero J. J., L. Hodgson, J. Condeelis. 2012. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Current Opinion in Cell Biology*. 24(2):277-283.
- Buglino J. A., M. D. Resh. 2008. What Is a Palmitoyltransferase with Specificity for N-Palmitoylation of Sonic Hedgehog. *Journal Of Biological Chemistry*. 283:32.
- Burke, R., D. Nellen, M. Bellotto, E. Hafen, K. A. Senti, B. J. Dickson, K. Basler. 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*. 99:803-815.
- Buttitta L., R. Mo, C. Hui, C. Fan. 2003. Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development*. 130:6233-6243.
- Buzea C., I. I. Pacheco, K. Robbie. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. Dec;2(4):MR17-71.
- Campbell, N., B. J. Greece. 2007. Biología. Barcelona: Medica Panamericana.

- Carlier M. F., D. Pantaloni. 1982. *Biochemistry*. 21(6):1215-1224.
- Caviston J. P., E. L. Holzbaur. 2006. Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends in Cell Biology*. (10):530-537.
- Charest P. G., R. A. Firtel. 2007. Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochemical Journal*. 401(2):377-390.
- Chen C. H., D. P. von Kessler, W. Park, B. Wang, Y. Ma, P. A. Beachy. 1999. Nuclear Trafficking of Cubitus interruptus in the Transcriptional Regulation of Hedgehog Target Gene Expression. *Cell*. 98:305-316.
- Chen H. W., S. F. Su, C. T. Chien, W. H. Lin, S. L. Yu, C. C. Chou, J. J. Chen, P. C. Yang. 2006. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. Nov;20(13):2393-5.
- Chen X., S. S. Mao. 2007. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chemical Reviews*. 107:2891-2959.
- Chen X., H. Tukachinsky, C. H. Huang, C. Jao, Y. Chu, H. Tang, B. Mueller, S. Schulman, T. A. Rapoport, A. Salic. 2011. Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*. 192:5.
- Cheng X., J. Gu, M. Zhang, J. Yuan, B. Zhao, J. Jiang, X. Jia. 2014. Astragaloside IV inhibits migration and invasion in human lung cancer A549 cells via regulating PKC- α -ERK1/2-NF- κ B pathway. *International Immunopharmacology*. Nov;23(1):304-13.
- Choudhury D., P. L. Xavier, K. Chaudhari, R. John, A. K. Dasgupta, T. Pradeep, G. Chakrabarti. 2013. Unprecedented inhibition of tubulin polymerization directed by gold nanoparticles inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Nanoscale*. May 21;5(10):4476-89.
- Corbit K. C., P. Aanstad, V. Singla, A. R. Norman, D. Y. R. Stainier, J. F. Reiter. 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*. 437:13
- Dai P., H. Akimaru, Y. Tanaka, T. Maekawa, M. Nakafuku, S. Ishii. 1999. Sonic Hedgehog-induced Activation of the *Gli1* Promoter Is Mediated by GLI3. *The Journal Of Biological Chemistry*. 274:12.
- Demir E., H. Akça, F. Turna, S. Aksakal, D. Burgucu, B. Kaya, O. Tokgün, G. Vales, A. Creus, R. Marcos. 2015. Genotoxic and cell-transforming effects of titanium dioxide nanoparticles. *Environmental Research*. Jan;136:300-8.
- Diebold U. 2003. The surface science of titanium dioxide. *Surface Science Reports*. 48:53-229.
- Dodding M. P., M. Way. 2011. Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *EMBO Journal*. 30(17):3527-3539.
- Drechsel D. N., M. W. Kirschner. 1994. The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Current Biology*. 1994 Dec 1;4(12):1053-61.
- Dujardin D. L., L. E. Barnhart, S. A. Stehman, E. R. Gomes, G. G. Gundersen, R. B. Vallee. 2003. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *Journal of Cell Biology*. 163(6):1205-11.
- Etienne-Manneville S., A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420(6916):629-635.
- Etienne-Manneville S. 2004. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control?. *Traffic*. 5(7):470-477.
- Etienne-Manneville S. 2013. Microtubules in Cell Migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 29:471-499.
- Fabian E., R. Landsiedel, L. Ma-Hock, K. Wiench, W. Wohlleben, B. van Ravenzwaay. 2008. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Archives of Toxicology*. 82:151-157.
- Firestone A. J., J. S. Weinger, M. Maldonado, K. Barlan, L. D. Langston, M. O'Donnell, V. I. Gelfand, T. M. Kapoor, J. K. Chen. 2012. Small-molecule inhibitors of the AAA+ ATPase motor cytoplasmic dynein. *Nature*. 484(7392):125-9.
- FDA. 2002. Listing of color additives exempt from certification. In Code of Federal Regulations Title 21-Food and Drugs. 21 CFR 73.2575. Washington, DC: US Government Printing Office.
- Friedl P., D. Gilmour. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10(7):445-457.
- Fygenson D. K., J. F. Marko, A. Libchaber. 1997. Mechanics of Microtubule-Based Membrane Extension. *Physical Review Letters*. 79(22):4497-4500.
- Gallet A., P. P. Therond. 2005. Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Developmental Biology*. 277:51-62.
- Geiser M., W. G. Kreyling. 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*. 7:2.
- Gheshlaghi Z. N., G. H. Riazzi, S. Ahmadian, M. Ghafari, R. Mahinpour. 2008. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim Biophys Sinica (Shanghai)*. 40(9):777-782.
- Gierke S., T. Wittmann. 2012. EB1-recruited microtubule +TIP complexes coordinate protrusion dynamics during 3D epithelial remodeling. *Current Biology*. 22(9):753-762.

- Global and China Titanium Dioxide Industry Report, 2014-2017. [citado en Febrero 2015]. Disponible en: <http://www.researchandmarkets.com/reports/3021866/global-and-chinese-titanium-dioxide-industry.pdf>
- GLOBOCAN. 2012. Lung Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [citado en Febrero 2015]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Goldfarb, D. S., A. H. Corbett, D. A. Mason, M. T. Harreman, S. A. Adam. 2004. Importin alpha: A multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends in Cell Biology*. 14:505-514.
- Gurr J. R., A. S. Wang, C. H. Chen, K. Y. Jan. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. Sep 15;213(1-2):66-73.
- Gwinn M. R., Vallyathan V. 2006. Nanoparticles: Health Effects - Pros and Cons. NIOSH. 2:114.
- Hamad-Schifferli K. 2013. How can we exploit the protein corona?. *Nanomedicine (London)*. 8(1):1-3.
- Hamilton R. F., N. Wu, D. Porter, M. Buford, M. Wolfarth, A. Holian. 2009. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Particle and Fibre Toxicology*. 6, 35.
- Hanaor D. A. H., C. C. Sorrell. 2011. Review of the anatase to rutile phase transformation. *Journal of Materials Science*. Feb. 46:4. 855-874.
- Harrell J. M., P. J. Murphy, Y. Morishima, H. Chen, J. F. Mansfield, M. D. Galigniana, W. B. Pratt. 2004. Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *Journal of Biological Chemistry*. 279(52):54647-54654.
- Hassounah, N. B., T. A. Bunch, K. M. McDermott. 2012. Molecular Pathways: The Role of Primary Cilia in Cancer Progression and Therapeutics with a Focus on Hedgehog Signaling. *Clinical Cancer Research*. 18:2429-2435.
- Hatayama M., J. Aruga. 2012. Gli protein nuclear localization signal. *Vitamins & Hormones*. 88:73-89.
- Hext P. M., J. A. Tomenson, P. Thompson. 2005. Titanium Dioxide: Inhalation Toxicology and Epidemiology. *Annals of Occupational Hygiene*. 6:461-472.
- Hirsch C., R. Gauss, S. C. Horn, O. Neuber, T. Sommer. 2009. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature*. 458:26.
- Holleran E. A., S. Karki, E. L. F. Holzbau. 1998. The Role of the Dynactin Complex in Intracellular Motility. *International Review of Cytology*. 182.
- Höök P., R. B. Vallee. 2006. The Dynein Family at a Glance. *Journal of Cell Science*. 21:119.
- Hou Y., K. Cai, J. Li, X. Chen, M. Lai, Y. Hu, Z. Luo, X. Ding, D. Xu. 2013. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine*. 8:3619-30.
- Huang H. C., L. L. Tsai, J. P. Tsai, S. C. Hsieh, S. F. Yang, J. T. Hsueh, Y. H. Hsieh. 2014. Licochalcone A inhibits the migration and invasion of human lung cancer cells via inactivation of the Akt signaling pathway with downregulation of MMP-1/-3 expression. *Tumour Biology*. Dec;35(12):12139-49.
- Hui C., S. Angers. 2011. Gli Proteins in Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 27:513-537.
- IARC. 2006. "Titanium dioxide group 2B," in IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 9, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France.
- IARC. 2010. "Carbon black, titanium dioxide, and talc," in IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 93, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France.
- Iavicoli I, V. Leso, L. Fontana, A. Bergamaschi. 2011. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. May;15(5):481-508.
- Incardona J. P., J. Gruenberg, H. Roelink. Sonic Hedgehog Induces the Segregation of Patched and Smoothed in Endosomes. *Current Biology*. 12:983-995.
- Ikram M. S., G. W. Neill, G. Regl, T. Eichberger, A. Frischauf, F. Aberger, A. Quinn, M. Philpott. 2004. GLI2 Is Expressed in Normal Human Epidermis and BCC and Induces GLI1 Expression by Binding to its Promoter. *The Journal of Investigative Dermatology*. 122:6
- Ingham P. W., A. P. McMahon. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development* 15:3059-3087.
- Islam A. F., P. K. Moly, Y. Miyamoto, T. G. Kusakabe. 2010. Distinctive expression patterns of Hedgehog pathway genes in the *Ciona intestinalis* larva: implications for a role of Hedgehog signaling in postembryonic development and chordate evolution. *Zoological Science*. 2010 Feb;27(2):84-90.
- Johnston J. A, M. E. Illing, R. R. Kopito. 2002. Cytoplasmic dynein/dynactin mediates the assembly of aggresomes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. Sep;53(1):26-38.

- Kakinoki K., K. Yamane, R. Teraoka, M. Otsuka, Y. Matsuda. 2004. Effect of relative humidity on the photocatalytic activity of titanium dioxide and photostability of famotidine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Mar;93(3):582-9.
- Karki, S., E. L. Holzbaur. 1999. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Current Opinion in Cell Biology*. (1):45-53.
- Kasper M., G. Regl, A. Frischauf, F. Aberger. 2006. GLI transcription factors: Mediators of oncogenic Hedgehog signaling. *European Journal of Cancer*. 42:437-445.
- Khaleghian A., G. H. Riaz, S. Ahmadian, M. Ghafari, M. Rezaie, A. Takahashi, Y. Nakaya, H. Nazari. 2010. Effect of ferric oxide nanoparticles on microtubules organization. *African Journal of Biochemistry Research*. 4(4):99-104,
- Kinzler K. W., S. H. Bigner, D. D. Bigner, J. M. Trent, M. L. Law, S. J. O'Brien, A. J. Wong, B. Vogelstein. 1987. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*. 236(4797):70-73.
- Kinzler K. W., B. Vogelstein. 1990. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Molecular and Cellular Biology*. 10(2): 634-642.
- Kirsch R., M. Mertiga, W. Pompea, R. Wahla, G. Sadowskib, K. J. Böhm, E. Ungerc. 1997. Three-dimensional metallization of microtubules. *Thin Solid Films*. 305:248-253.
- Kitchin K. T., R. Y. Prasad, K. Wallace. 2010. Oxidative stress studies of six TiO₂ and two CeO₂ nanomaterials: Immuno-spin trapping results with DNA. *Nanotoxicology*, 5:546-556.
- Kozlov D. V., A. A. Panchenko, D. V. Bavykin, E. N. Savinov, P. G. Smirniotis. 2003. Influence of humidity and acidity of the titanium dioxide surface on the kinetics of photocatalytic oxidation of volatile organic compounds. *Russian Chemical Bulletin*. May;52(5):1100-1105.
- Kramer N, A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschläger, H. Dolznig. 2013. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research*. Jan-Mar;752(1):10-24.
- Kural C., H. Kim, S. Syed, G. Goshima, V. I. Gelfand, P. R. Selvin. 2005. Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement?. *Science*. 308(5727):1469-1472.
- Jovanović B. 2015. Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive. *Integrated Environmental Assessment and Management*. Jan;11(1):10-20.
- Lange A., R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine, A. H. Corbett. 2007. Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin alpha. *Journal of Biological Chemistry*. 282:5101-5105.
- Lewis M. T. 2001. Hedgehog Signaling in Mouse Mammary Gland Development and Neoplasia. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 6:1.
- Liang G., Y. Pu, L. Yin, R. Liu, B. Ye, Y. Su, Y. Li. 2009. Influence of different sizes of titanium dioxide nanoparticles on hepatic and renal functions in rats with correlation to oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 72:740-745.
- Liao G., T. Nagasaki, G. G. Gundersen. 1995. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *Journal Cell of Science*. 108 (Pt 11):3473-3483.
- Liao X., M. K. Y. Siu, C. W. H. Au, E. S. Y. Wong, H. Y. Chan, P. P. C. Ip, H. Y. S. Ngan, A. N. Y. Cheung. 2009. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis*. 30:1 131-140.
- Ling S. C., P. S. Fahrmer, W. T. Greenough, V. I. Gelfand. 2004. Transport of *Drosophila* fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(50):17428-17433.
- Linsinger T. P., Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. von der Kammer, E. H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede, S. Weigel. 2013. Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food. *Food Chemistry*. 138. 1959-1966.
- Litwack, G. 2012. *Hedgehog Signaling*. Academic Press; Primera Edición. 584pp.
- MacAskill A. F., J. T. Kittler. 2010. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends in Cell Biology*. (2):102-112.
- Magdolenova Z., D. Bilaničová, G. Pojana, L. M. Fjellsbø, A. Hudecova, K. Hasplova, A. Marcomini, M. Dusinska. 2012. Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity. *Journal of Environmental Monitoring*. Feb;14(2):455-64.
- Mandelkow E., E. Mandelkow. 1994. Microtubule structure. *Current Opinion in Structural Biology*. 4:171-179.
- Mahjoub M. R. 2013. The importance of a single primary cilium. *Organogenesis*. Apr-Jun;9(2):61-9.
- Marfori M., A. Mynott, J. J. Ellis, A. M. Mehdi, N. F. Saunders, P. M. Curmi, J. K. Forwood, M. Boden, B. Kobe. 2010. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1813:1562-1577.
- Márquez-Ramírez S. G., N. L. Delgado-Buenrostro, Y. I. Chirino, G. G. Iglesias, R. López-Marure. 2012. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology*. 16;302(2-3):146-156.

- Medina-Reyes E. I., L. Bucio-López, V. Freyre-Fonseca, Y. Sánchez-Pérez, C. M. García-Cuéllar, R. Morales-Bárceñas, J. Pedraza-Chaverri, Y. I. Chirino. 2014. Cell cycle synchronization reveals greater G2/M-phase accumulation of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research International*. Nov 26.
- Medina-Reyes E. I., A. Déciga-Alcaraz, V. Freyre-Fonseca, N. L. Delgado-Buenrostro, J. O. Flores-Flores, G. F. Gutiérrez-López, Y. Sánchez-Pérez, C. M. García-Cuéllar, J. Pedraza-Chaverri, Y. I. Chirino. 2015. Titanium dioxide nanoparticles induce an adaptive inflammatory response and invasion and proliferation of lung epithelial cells in chorioallantoic membrane. *Environmental Research*. Jan;136:424-34.
- Mehlen P., A. Puisieux. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*. Jun;6(6):449-58.
- Menard A., D. Drobne, A. Jemec. 2011. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environmental Pollution*. 159:677-684.
- Milla L. A., C. N. González-Ramírez, V. Palma. 2012. Sonic Hedgehog in cancer stem cells: a novel link with autophagy. *Biological Research*. 45:223-230.
- Mitchison T., M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237-242.
- Mittal S., A. K. Pandey. 2014. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. *BioMed Research International*. 2014:891934.
- Mori Y., T. Okumura, S. Tsunoda, Y. Sakai, Y. Shimada. 2006. Gli-1 Expression Is Associated with Lymph Node Metastasis and Tumor Progression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*. 70:378-389.
- Morimoto Y., N. Kobayashi, N. Shinohara, T. Myojo, I. Tanaka, J. Nakanishi. 2010. Hazard Assessments of Manufactured Nanomaterials. *Journal of Occupational Health*. 52:325-324.
- Moschini E., M. Gualtieri, M. Colombo, U. Fascio, M. Camatini, P. Mantecca. 2013. The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO₂ in human alveolar epithelial cells. *Toxicology Letters*. 222(2):102-116.
- Motoyama J., L. Milenkovic, M. Iwama, Y. Shikata, M. P. Scott, C. Hui. 2003. Differential requirement for Gli2 and Gli3 in ventral neural cell fate specification. *Developmental Biology*. 259:150-161.
- NIOSH. 2011. Occupational Exposure to Titanium Dioxide. In Current Intelligence Bulletin 63. Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health.
- Oberdörster G. 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health*. 74:1-8.
- Panariti A., G. Miserocchi, I. Rivolta. 2012. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, Science and Applications*. 5:87-100.
- Park E. J., J. Yi, K. H. Chung, D. Y. Ryu, J. Choi, K. Park. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*. Aug 28;180(3):222-9.
- Pepinsky R. B., C. Zeng, D. Wen, P. Rayhorn, D. P. Baker, K. P. Williams, S. A. Bixler, C. M. Ambrose, E. A. Garber. 1998. Identification of a Palmitic Acid-modified Form of Human Sonic hedgehog. *Journal Biological Chemistry*. 273:22.
- Perlikos F., K. J. Harrington, K. N. Syrigos. 2013. Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: a comprehensive review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Jul;87(1):1-11.
- Pfister K. K., P. R. Shah, H. Hummerich, A. Russ, J. Cotton, A. A. Annuar, S. M. King, E. M. Fisher. 2006. Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genetics*. 2(1):e1.
- Porter J. A., K. E. Young, P. A. Beachy. 1996. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*. 274(5285):255-9.
- Powers K. W., S. C. Brown, V. B. Krishna, S. C. Wasdo, B. M. Moudgil, S. M. Roberts. 2006. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. *Toxicological Sciences*. 90(2):296-303.
- Prasad R. Y., S. O. Simmons, M. G. Killius, R. M. Zucker, A. D. Kligerman, C. F. Blackman, R. C. Fry, D. M. Demarini. 2014. Cellular interactions and biological responses to titanium dioxide nanoparticles in HepG2 and BEAS-2B cells: role of cell culture media. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. May;55(4):336-42.
- Project on emerging nanotechnologies. <http://www.nanotechproject.org/cpi>
- Qualtrough, D., A. Buda, W. Gaffield, A. C. Williams, C. Paraskeva. 2004. Hedgehog Signalling In Colorectal Tumour Cells: Induction Of Apoptosis With Cyclopamine Treatment. *International Journal of Cancer*. 110,831-837.
- Rajagopalan V., J. P. D'amico, D. E. Wilkes. 2013. Cytoplasmic dynein-2: from molecules to human diseases. *Frontiers of biology*. 8(1):119-126.
- Rodriguez-Fernandez L., R. Valiente, J. Gonzalez, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga. 2012. Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties in vivo, enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano*. Aug 28;6(8):6614-25.
- Rohatgi R., L. Milenkovic, M. P. Scott. 2007. Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science*. 317:372-376.

- Ros L. M. A. 2009. La vía de Hedgehog: embriogénesis y enfermedad. RUFF DATABASE - <http://ruff.info/>
- Ryan K. E., C. Chiang. 2012. Hedgehog Secretion and Signal Transduction in Vertebrates. *The Journal Of Biological Chemistry*. 287:22.
- Saptarshi S. R., A. Duschl, A. L. Lopata. 2013. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal Nanobiotechnology*. Jul 19;11:26.
- Sasaki H., Y. Nishizaki, C. Hui, M. Nakafuku, H. Kondoh. 1999. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*. 126:3915-3924.
- Sayes C. M., R. Wahi, P. A. Kurian, Y. Liu, J. L. West, K. D. Ausman, D. B. Warheit, V. L. Colvin. 2006. Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells. *Toxicological Sciences*. 92(1):174–185.
- Scherbart A. M., J. Langer, A. Bushmelev, D. van Berlo, P. Haberzettl, F. J. van Schooten, A. M. Schmidt, C. R. Rose, R. P. Schins, C. Albrecht. 2011. Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. *Particle and Fibre Toxicology*. Oct 13;8:31.
- Schroer T. A. 2004. Dynactin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20:759–779.
- Schroer T. A., E. R. Steuer, M. P. Sheetz. 1989. Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles. *Cell*. 56:6. 937-946.
- Shi H., R. Magaye, V. Castranova J. Zhao. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*. 10:15.
- Shimeld S. M., M. van den Heuvel, R. Dawber, J. Briscoe. 2007. An amphioxus Gli gene reveals conservation of midline patterning and the evolution of hedgehog signalling diversity in chordates. *PLoS One*. Sep 12;2(9):e864.
- Shrum C. K., D. Defrancisco, M. K. Meffert. 2009. Stimulated nuclear translocation of NF-kappaB and shuttling differentially depend on dynein and the dynactin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 106(8):2647-2652.
- Simon-Deckers A., B. Gouget, M. Mayne-L'Hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud, M. Carrière. 2008. *In vitro* investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*. 253:137-146.
- Singh S., T. Shi, R. Duffin, C. Albrecht, D. van Berlo, D. Höhr, B. Fubini, G. Martra, I. Fenoglio, P. J. Borm, R. P. Schins. 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222(2):141-151.
- Srivastava R. K., Q. Rahman, M. P. Kashyap, A. K. Singh, G. Jain, S. Jahan M. Lohani, M. Lantow, A. B. Pant. 2012. Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Human and Experimental Toxicology*. 32:2.
- Stearns R. C., J. D. Paulauskis, J. J. Godleski. 2001. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 24(2):108-115.
- Stecca B., C. Mas, V. Clement, M. Zbinden, R. Correa, V. Piguet, F. Beermann, A. Ruiz i Altaba. 2007. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:14. 5895-5900.
- Suzuki H., Toyooka T., Ibuki Y. 2007. Simple and Easy Method to Evaluate Uptake Potential of Nanoparticles in Mammalian Cells Using a Flow Cytometric Light Scatter Analysis. *Environmental Science & Technology*. 41:3018-3024.
- Swidwińska-Gajewska A. M., Czerczak S. 2014. Titanium dioxide nanoparticles: occupational exposure limits. *Medycyna pracy*. 2014;65(3):407-418.
- Tang Y., F. Wang, C. Jin, H. Liang, X. Zhong, Y. Yang. 2013. Mitochondrial injury induced by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36:66-72.
- Tay C. Y., P. Cai, M. I. Setyawati, W. Fang, L. P. Tan, C. H. Hong, X. Chen, D. T. Leong. 2014. Nanoparticles strengthen intracellular tension and retard cellular migration. *Nano Letters*. Jan 8;14(1):83-8.

- Tedja R., C. Marquis, M. Lim, R. Amal. 2011. Biological impacts of TiO₂ on human lung cell lines A549 and H1299: particle size distribution effects. *Journal of Nanoparticle Research*. 13:3801-3813.
- Tukachinsky H., R. P. Kuzmickas, C. Y. Jao, J. Liu, A. Salic. 2012. Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell Report*. Aug 30;2(2):308-20.
- (USGS) United States Geological Survey. 2013. Titanium and titanium dioxide. Mineral commodity summaries. p. 172–173. [citado en Febrero 2015]. Disponible en: <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/titanium/mcs-2013-titan.pdf>
- Vallee R. B., J. C. Williams, D. Varma, L. E. Barnhart. 2003. Dynein: An Ancient Motor Protein Involved in Multiple Modes of Transport. *Wiley Periodicals, Inc.*
- Vasiliev J. M., I. M. Gelfand, L. V. Domnina, O. Y. Ivanova, S. G. Komm, L. V. Olshevskaja. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*. 24(3):625-640.
- Vicente-Manzanares M., D. J. Webb, A. R. Horwitz. 2005. Cell migration at a glance. *Journal Cell of Science*. 118(Pt 21):4917-4919.
- Wadsworth P. 1999. Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 42(1):48-59.
- Wang H., X. Y. Mao, T. T. Zhao, X. Y. Zheng, F. Jin, J. G. Li. 2012. Study on the skip metastasis of axillary lymph nodes in breast cancer and their relation with Gli1 expression. *Tumor Biology*. 33(6):1943-1950.
- Wang J. J., B. J. Sanderson, H. Wang. 2007. Cyto-and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research*. 628:99-106.
- Wang J., J. Z. Li, A. X. Lu, K. F. Zhang, B. J. Li. 2014. Anticancer effect of salidroside on A549 lung cancer cells through inhibition of oxidative stress and phospho-p38 expression. *Oncology Letters*. Apr;7(4):1159-1164.
- Wang S., J. Kurepa, J. A. Smalle. 2011. Ultra-small TiO₂ nanoparticles disrupt microtubular networks in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment*. 34(5):811-820.
- Warheit D.B., R. A. Hoke, C. Finlay, E. M. Donner, K. L. Reed, C. M. Sayes. 2007. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology Letters*. 171:99-110.
- Watanabe M., M. Yoneda, A. Morohashi, Y. Hori, D. Okamoto, A. Sato, D. Kurioka, T. Nittami, Y. Hirokawa, T. Shiraishi, K. Kawai, H. Kasai, Y. Totsuka. 2013. Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. Jul 25;14(8):15546-60.
- Welsch, U., J. Sobotta, 2008. Histologia (Segunda ed.). Madrid: Medica Panamericana.
- Westermann S. K. Weber. 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003 Dec;4(12):938-47.
- Wloga D., J. Gaertig. 2010. Post-translational modifications of microtubules. *Journal of Cell Science*. 123:3447-3455.
- Wu J., G. Misra, R. J. Russell, A. J. Ladd, T. P. Lele, R. B. Dickinson. 2011. Effects of dynein on microtubule mechanics and centrosome positioning. *Molecular Biology of the Cell*. (24):4834-4841.
- Xie W., D. T. W. Ng. 2010. ERAD substrate recognition in budding yeast. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21. 533–539.
- Xu A., Y. Chai, T. Nohmi, T. K. Hei. 2009. Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in *gpt* delta transgenic MEF cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 6:3.
- Yang J., X. R. Kuang, P. T. Lv, X. X. Yan. 2015. Thymoquinone inhibits proliferation and invasion of human nonsmall-cell lung cancer cells via ERK pathway. *Tumor Biology*. Jan;36(1):259-69.
- Yodkeeree S., W. Pompimon, P. Limtrakul. 2014. Crebanine, an aporphine alkaloid, sensitizes TNF- α -induced apoptosis and suppressed invasion of human lung adenocarcinoma cells A549 by blocking NF- κ B-regulated gene products. *Tumour Biology*. Sep;35(9):8615-24.
- Yue, D., H. Li, J. Che, Y. Zhang, H. K. Tseng, J. Q. Jin, T. M. Luh, E. Giroux-Leprieur, M. Mo, Q. Zheng, H. Shi, H. Zhang, X. Hao, C. Wang, D. M. Jablons, B. He. 2014. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 33:34.
- Zhao J., L. Bowman, X. Zhang, V. Vallyathan, S. H. Young, V. Castranova, M. Ding. 2009. Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles Induce JB6 Cell Apoptosis Through Activation of the Caspase-8/Bid and Mitochondrial Pathways. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 72:1141-1149.
- Zheng X., H. Baker, W. S. Hancock, F. Fawaz, M. McCaman, E. Pungor. 2006. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology Progress*. Sep-Oct;22(5):1294-300.
- Zhou J. C., X. Wangb, M. Xuec, Z. Xua, T. Hamasakid, Y. Yanga, K. Wangc, B. Dunn. 2010. Characterization of gold nanoparticle binding to microtubule filaments. *Materials Science and Engineering C*. 30:20–26.
- Zucker R. M., E. J. Massaro, K. M. Sanders, L. L. Degn, W. K. Boyes. 2010. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry A*. Jul;77(7):677-85.