



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A NANOPARTÍCULAS  
DE DIÓXIDO DE TITANIO EN LA REMODELACIÓN DE  
CITOESQUELETO”**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:**

**BIÓLOGA**

**Presenta:**

**Laurel Hernández Gutiérrez**

**Asesora: Dra. Yolanda Irasema Chirino López**



**México, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Créditos

La parte experimental del presente estudio fue realizada en laboratorio de toxicología y carcinogénesis número 10 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED), Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de CONACYT 166727 y de la beca para la realización de tesis 2012-12/63-3821.

Comisión Dictaminadora del trabajo de tesis de investigación:

Dra.	Norma Laura Delgado Buenrostro	Presidente
Dr.	Maximiliano Ibarra Barajas	Vocal
Dra.	Yolanda Irasema Chirino López	Secretario
Dra.	Martha Ofelia Salcedo Álvarez	Suplente
Dr.	Hugo Virgilio Perales Vela	Suplente

Agradezco, también, el apoyo académico de la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro y de la M. en C. Verónica Freyre Fonseca.

## **Dedicatoria**

Agradezco a mis padres Mara y Gabriel por todo el apoyo que siempre me han dado, también, a mi tía Mercu por todo su afecto y porque sé que siempre contaré con ustedes.

A mi prima Andrea por todo su apoyo moral y a mi abuelita Efi por darme ánimos.

A mis compañeros del laboratorio 10 por compartir este tiempo conmigo y alentarme a terminar esta tesis.

Dedico esta tesis también a Rebe, Miriam, Mary, Esme y Sanch por compartir conmigo historias, viajes, risas, enojos y por supuesto prácticas de campo. Gracias por su amistad.

A mis amigos Perla, Maryela, Mirna, Mario y Michael por tan buenos recuerdos.

A mis amigos Belén, Liz, Mundo, Vic y César por ayudarme a cambiar mis paradigmas.

A mis maestros porque no desistieron al enseñarme, aunque muchas veces no ponía atención en clase, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí.

“Al comenzar mis estudios, el primer paso me agradó mucho,  
El mero hecho consciente, las formas, el poder moverme,  
El menor insecto o animal, los sentidos, la vista, el amor.”

"Creo que una brizna de hierba no es inferior a la jornada de los astros  
y que la hormiga no es menos perfecta ni lo es un grano de arena  
y que el esfuerzo es una obra de arte para los gustos más exigentes..."

“Al comenzar mis estudios”; “Hojas de hierba” , Walt Whitman

## Contenido

<b>Índice de Figuras</b>	3
<b>Lista de Abreviaturas</b>	5
<b>Resumen</b>	6
<b>1. Introducción</b>	7
<b>1.1. Nanomateriales</b>	7
<b>1.2. Clasificación de los NMs</b>	8
<b>1.3. Nanopartículas de dióxido de Titanio</b>	9
<b>1.4. Endocitosis de las NPs-TiO<sub>2</sub></b>	9
<b>1.5. Exocitosis de las NPs-TiO<sub>2</sub></b>	11
<b>1.6. Efectos tóxicos de las NPs-TiO<sub>2</sub> in vivo</b>	11
<b>1.7. Efectos tóxicos de las NPs-TiO<sub>2</sub> in vitro</b>	12
<b>1.8. Citoesqueleto</b>	12
<b>1.8.1. Microfilamentos; actina</b>	13
<b>1.8.2. Filamentos Intermedios; vimentina</b>	14
<b>1.8.3. Microtúbulos; tubulina</b>	16
<b>1.8.4. Efecto de las NPs-TiO<sub>2</sub> sobre citoesqueleto</b>	17
<b>2. Justificación</b>	18
<b>3. Hipótesis</b>	18
<b>4. Objetivo</b>	18
<b>4.1. Objetivos particulares</b>	19
<b>5. Materiales y métodos</b>	19
<b>5.1. Cultivo celular</b>	19
<b>5.2. Exposición a nanopartículas</b>	20
<b>5.3. Tinción hematoxilina y eosina (H&amp;E)</b>	21
<b>5.4. Inmunofluorescencia</b>	21
<b>5.5. Contraste interdiferencial Nomarsky (DIC)</b>	22
<b>5.6. Análisis de imágenes (ADI)</b>	22

5.6.1. Parámetros de morfología celular	24
5.6.2. Parámetros de morfología de los filamentos	25
5.6.3. Análisis estadístico	26
6. Resultados	27
7. Discusión	45
8. Conclusiones	54
9. Perspectivas	54
10. Importancia de este trabajo	54
11. Anexo	55
12. Referencias	63

## Índice de figuras

- Figura 1 Esquema del estudio de los nanomateriales en diversas áreas.
- Figura 2 Internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub>. Microscopia electrónica de transmisión (TEM) de células A549 expuestas a 40 µg/ml de NPs-TiO<sub>2</sub>.
- Figura 3 Representación esquemática del proceso de formación de los microfilamentos.
- Figura 4 Dinámica de los filamentos de vimentina con la integrina β3 mediante microscopia confocal láser.
- Figura 5 Representación esquemática del proceso de polimerización y despolimerización de los microtúbulos.
- Figura 6 Se muestra la cámara de Neubauer dividida en cuatro cuadrantes A, B, C y D para realizar el conteo de las células.
- Figura 7 Proceso de análisis digital de imágenes mediante el software Image J 1.47m.
- Figura 8 Procesamiento de las células epiteliales de pulmón A549 mediante el software Image J 1.47m.
- Figura 9 Parámetros de morfología utilizados.
- Figura 10 Parámetros de estructura de los filamentos.
- Figura 11 Morfología e internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub> en células epiteliales de pulmón A549 mediante la tinción H&E, 100x y Nomarsky.
- Figura 12 Localización de los filamentos de actina-F expuestos a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> mediante microscopia confocal.
- Figura 13 Imágenes de microscopia confocal láser analizadas mediante el software Image J 1.47 m para la obtención de parámetros morfológicos celulares.
- Figura 14 Cuantificación del área mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 15 Cuantificación del perímetro mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 16 Cuantificación de la circularidad mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 17 Cuantificación del diámetro de Feret mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 18 Cuantificación del número de ramificaciones de actina-F mediante el software Image J en células epiteliales de pulmón A549.
- Figura 19 Cuantificación de la longitud de ramas de actina-F mediante el software Image J
- Figura 20 Cuantificación de la longitud máxima de ramas de actina-F mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 21 Cuantificación del número de uniones de actina-F mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 22 Cuantificación del número de triples uniones de actina-F mediante el software Image J 1.47 m



- Figura 23 Localización de los filamentos de vimentina expuestos a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> mediante microscopia confocal láser.
- Figura 24 Cuantificación de la longitud máxima de ramas de actina-F mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 25 Cuantificación del número de uniones de vimentina mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 26 Cuantificación del número de triples uniones de vimentina mediante el software Image J 1.47 m
- Figura 27 Localización de los filamentos de tubulina expuestos a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> mediante microscopia confocal láser.
- Figura 28 Esquema de la localización de los filamentos de actina-F, vimentina y tubulina dentro de la célula.

## **Abreviaturas**

NMs: Nanomateriales

NPs: Nanopartículas

CNTs: Nanotubos de carbono

NPs-TiO<sub>2</sub>: Nanopartículas de dióxido de titanio

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

FIs: Filamentos Intermedios

MT: Microtúbulos

MF: Microfilamentos

DIC: Contraste interferencial

H & E: Hematoxilina y Eosina

RA: Relación de aspecto

ADI: Análisis digital de imágenes

## Resumen

Las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO<sub>2</sub>) son un material ampliamente utilizado a nivel industrial con una gran producción anual. En estudios recientes se ha demostrado que las NPs-TiO<sub>2</sub> tienen efectos inflamatorios, oxidativos, y genotóxicos. Las NPs-TiO<sub>2</sub> pueden introducirse vía inhalatoria al cuerpo, y debido a sus pequeñas dimensiones pueden atravesar las membranas celulares y acumularse dentro de la célula donde pueden interactuar con el citoesqueleto. El citoesqueleto juega un papel esencial en numerosos aspectos de la biología celular, tales como el transporte intracelular, movilidad y contractibilidad, dar estructura y soporte, proporcionar soporte mecánico y la división celular. Por consiguiente, es importante profundizar en el conocimiento de los efectos de las NPs-TiO<sub>2</sub> sobre el citoesqueleto. El objetivo de este trabajo fue evaluar la remodelación del citoesqueleto, mediante el patrón de distribución de actina-F, vimentina y microtúbulos, inducida por la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> durante 7 días en células epiteliales A549 de pulmón.

Las células epiteliales de pulmón A549 se cultivaron sobre cubreobjetos en cajas petri de 35mm y fueron expuestas a concentraciones crecientes de 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 7 días. Para observar la morfología e internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub> se utilizó la tinción con hematoxilina y eosina. El análisis de citoesqueleto se realizó mediante la inmunodetección de α/β tubulina y vimentina conjugados a FITC, la actina fue marcada con Ph-rodaminada. La dilución utilizada para los tres anticuerpos fue la misma (1:100). Se realizó la cuantificación de los parámetros de morfología celular y la estructura de los filamentos de actina-F y vimentina mediante el software Image J.

Se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia de actina-F, para las concentraciones de 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>, en vimentina a 1,5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> y para tubulina a 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>. En los filamentos de actina aumentó el número y la longitud de las ramificaciones, número de uniones y triples uniones, también disminuyó la longitud máxima de los filamentos principales, por otra parte en vimentina disminuyó la longitud de los filamentos, el número de uniones y triples uniones. Los parámetros de morfología celular mostraron incremento en el área, perímetro y diámetro de Feret y disminución en el índice de circularidad de las células epiteliales de pulmón A549.

La exposición e internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub> (1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>) a nivel de citoplasma en células A549 promueve fenómenos de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina-F y vimentina, los cuales están asociados a los cambios en los parámetros de estructura de los filamentos así como a cambios en la localización de dichos filamentos. Esto genera cambios en la morfología celular evaluados por el área, perímetro, circularidad y diámetro de Feret.

## 1. Introducción

### 1. Nanomateriales

En las últimas décadas ha existido un rápido desarrollo de la nanotecnología, con más de 1000 productos de consumo disponibles en el mercado (The Project of Emerging Nanotechnologies, <http://www.nanotechproject.org/inventories>). Las aplicaciones de la nanotecnología se han ampliado y destacado en gran medida con la producción en masa de los nanomateriales (NMs) (Klaine *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

La Fundación Nacional para la Ciencia define a los NMs como los que se encuentran en una escala de 1-100nm (NSTC, 2000). En octubre del 2011 la Unión Europea definió a los NMs como un material natural, accidental o fabricado que contenga partículas sueltas, formando agregados o aglomerados, donde el 50% o más de las partículas muestren una o más dimensiones externas en un rango de tamaño de 1-100 nm (Shi *et al.*, 2013).

También los materiales de tamaño nanométrico pueden diferenciarse por su forma de producción, primero se encuentran las partículas ultrafinas que no se producen intencionadamente. Estas son el producto de procesos de combustión, la fundición, la quema de combustible, los incendios y los volcanes. Por otra parte se encuentran los NMs fabricados intencionalmente, entre sus formas de producción se encuentran la deposición física y química del vapor, la síntesis de fase líquida y el autoensamblaje (Yokel *et al.*, 2011).

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de los NMs debido a que sus propiedades difieren de manera fundamental y valiosa de los materiales tamaño micro y macro (Yokel *et al.*, 2011). Es por ello que diversas áreas como la Química, la Ecología y las Ciencias Biomédicas estudian los NMs (ver Fig. 1). Estas propiedades que hacen únicos a los NMs se atribuyen a su pequeño tamaño (superficie de área y distribución), a su composición química como la pureza, cristalinidad y propiedades electrónicas, su estructura de superficie (reactividad de la superficie, grupos superficiales, recubrimientos inorgánicos u orgánicos, etc.), la solubilidad, forma y agregación (Net *et al.*, 2006). Sin embargo estas propiedades también generan interés por conocer los posibles efectos adversos que se puedan dar sobre los sistemas biológicos.

La exposición a los NMs se ha asociado en estudios recientes con numerosos efectos adversos a la salud como inflamación pulmonar (Monteiller *et al.*, 2007; Stebounova *et al.*, 2011) daño al tejido cardiaco (Abdelhalim, 2011), y genotoxicidad (Gomaa *et al.*, 2013).

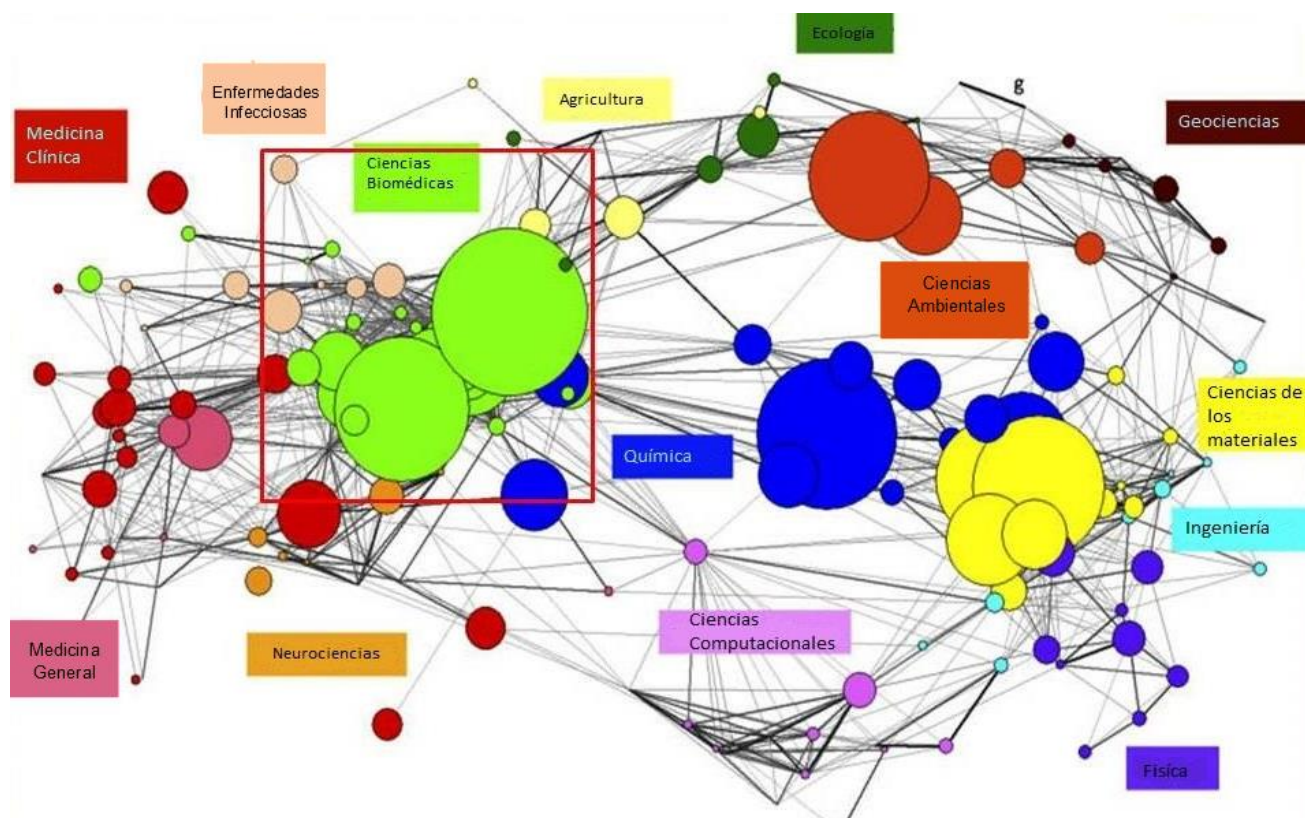


Figura 1. Esquema del estudio de los nanomateriales en diversas áreas (modificado de Klaine *et al.*, 2012).

## 2. Clasificación de los NMs

Los NMs no pueden ser considerados como un grupo uniforme de sustancias ya que se producen a partir de muchas sustancias, en muchas formas y tamaños y con una variedad de revestimientos de superficie (Savolainen *et al.*, 2010).

Los NMs manufacturados pueden ser organizados en cuatro tipos en función de sus formas químicas (GAO, 2010): (1) los NMs basados en carbón como por ejemplo los nanotubos de carbono (CNTs) son tubos a base de carbono largos y tienen el potencial de actuar como fibras biopersistentes (Klaine *et al.*, 2012) y los fullerenos; (2) los NMs basados en metales como el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), óxido de zinc (ZnO); (3) dendrímeros tales como polímeros a nanoescala; (4) y los compuestos tales como el platino con sílice (Wang *et al.*, 2013).

### **3. Nanopartículas de dióxido de titanio**

El dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es un material semiconductor, con actividad fotocatalítica. (Skocaj *et al.*, 2011). El aumento de su actividad catalítica se ha atribuido a la disminución de su tamaño y es permitida por el área de superficie más grande por unidad de masa.

Existen cuatro polimorfismos de origen natural de dióxido de titanio: rutilo, anatasa, brookita y dióxido de titanio (B). La anatasa y el rutilo son tetragonales, la brookita es ortorrómbica y el dióxido de titanio (B) es monoclinico (Baan, 2010). La mayor parte del  $\text{TiO}_2$  se sintetiza a partir del mineral ilmenita ( $\text{FeTiO}_3$ ), mediante el proceso de “sulfato” o el de “cloruro” (Baan, 2010; Skocaj *et al.*, 2011). En el proceso de sulfato, la ilmenita se hace reaccionar con ácido sulfúrico. El hidróxido de titanio se precipita a continuación por hidrólisis, se filtra y se calcina. En el proceso de cloruro, el rutilo se convierte en tetracloruro de titanio por cloración en presencia de coque de petróleo. El tetracloruro de titanio es oxidado por aire u oxígeno a aproximadamente  $1000^\circ\text{C}$ , y el dióxido de titanio resultante se calcina para eliminar el cloro residual y cualquier ácido clorhídrico que pueda haberse formado en la reacción (Baan, 2010). Estas características y el precio relativamente bajo de la materia prima y su procesamiento lo hacen un material con un amplio campo de aplicaciones a nivel industrial, farmacéutico, cosmético, y médico (Skocaj *et al.*, 2011; Weir *et al.*, 2012). El dióxido de titanio se utiliza en más de 170 países. Las principales regiones exportadoras son América del Norte y Australia, y la mayoría de los países en el resto del mundo son importadores netos (Baan, 2010).

En el año 2005 se estimó una producción de alrededor de 5 millones de toneladas de nanopartículas de dióxido de titanio (NPs- $\text{TiO}_2$ ). Sin embargo para el año 2010 se estimó en 4 millones de toneladas el consumo mundial anual de este pigmento (Shi *et al.*, 2013), por lo que su producción masiva es un riesgo potencial para el ambiente y la salud (Ahmad *et al.*, 2012).

### **4. Endocitosis de las NPs- $\text{TiO}_2$**

Las cuatro rutas por las que es más probable que exista exposición a los NMs en los órganos son la dérmica, oral, inhalatoria y ocular (Yokel *et al.*, 2011). Por esta razón se han realizado estudios para conocer la habilidad de las células epiteliales para internalizar dichas partículas. Mediante los mecanismos endocíticos la célula interactúa con su

ambiente y existen muchas rutas de captación por endocitosis: mediada por clatrina, asociada a caveolina, fagocitosis, macropinocitosis y formación de ruffles.

En un estudio realizado en células cancerígenas de próstata PC-3M se mostró que la internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> se produjeron a través de endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, y macropinocitosis de una manera dependiente de la temperatura, concentración y tiempo (Thurn *et al.*, 2011).

La vía de exposición a NMs por inhalación es la más estudiada debido a que es la vía más común de exposición en el lugar de trabajo (Yokel *et al.*, 2011). Diversos estudios han informado de internalización de NPs por las células epiteliales del pulmón. Se ha reportado la internalización de microesferas fluorescentes en células epiteliales alveolares (Foster *et al.*, 2001). También se observó la internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub> en células epiteliales de pulmón A549 mediante fagocitosis después de ser expuestas a 40 µg/ml de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 6 horas (Stearns *et al.*, 2011) (Ver Fig. 2).

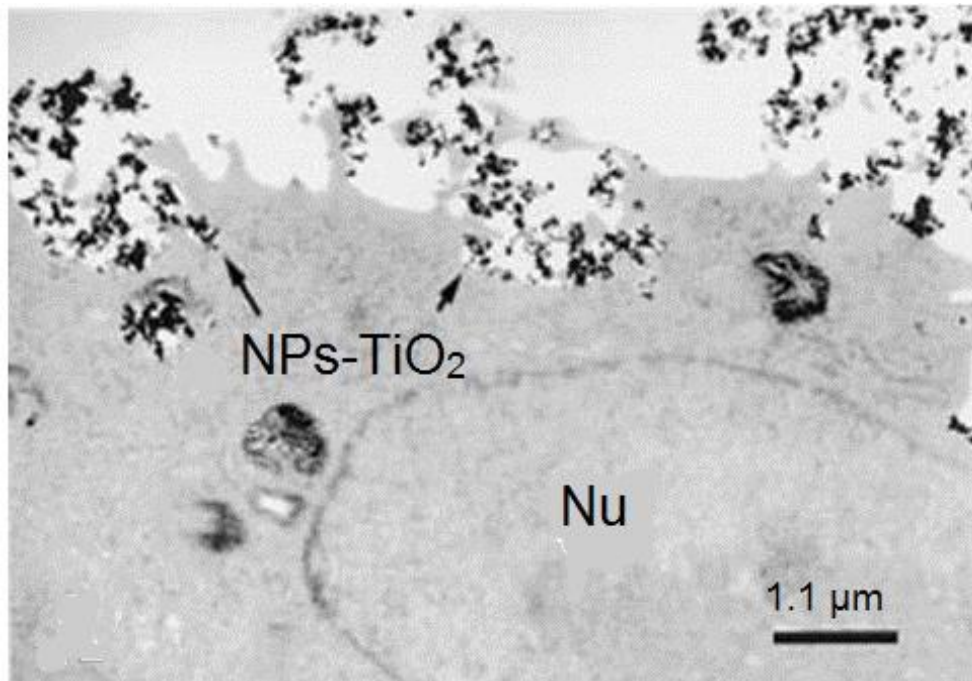


Figura 2. Internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub>. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células A549 expuestas a 40 µg/ml de NPs-TiO<sub>2</sub> (modificado de Stearns *et al.*, 2001). Nu, núcleo; flechas, señalan la internalización de NPs-TiO<sub>2</sub>.

## 5. Exocitosis de las NPs-TiO<sub>2</sub>

Un porcentaje de las NPs-TiO<sub>2</sub> internalizadas por las células es secretado al exterior mediante la exocitosis. En un estudio realizado por Wang *et al.*, (2013) en células madre neurales expuestas a tres tipos de NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 50 mg L<sup>-1</sup> y 100mg L<sup>-1</sup> durante 24 horas, se observó mediante microscopia confocal la exocitosis de las NPs-TiO<sub>2</sub> en porcentajes de 35.0%, 34.6% y 41.7%. Asimismo en células musculares lisas vasculares humanas expuestas durante una hora a NPs de poly (D, L-lactida-co-glicolida) a concentraciones de 10–1000 µg/mL, se encontró 65% de exocitosis de las NPs mediante la medición cuantitativa de la retención de nanopartículas dentro de la célula usando HPLC y microscopia confocal sin embargo a mayor concentración de NPs es mayor su retención en las células concluyendo que la exocitosis es dependiente de la concentración de NPs (Panyam *et al.*, 2003).

## 6. Efectos tóxicos de las NPs-TiO<sub>2</sub> *in vivo*

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer clasifica el TiO<sub>2</sub> como posible carcinógeno para humanos (Grupo 2B). Las NPs-TiO<sub>2</sub> son potencialmente tóxicas debido a sus propiedades únicas, incluyendo su gran área de superficie, lo que puede hacerlas muy reactivas o catalíticas. Además, su pequeño tamaño hace posible que puedan pasar a través de las membranas celulares y otras barreras biológicas (Yin *et al.*, 2012).

Se encontró disfunción microvascular y disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico después de exponer ratas macho Sprague-Dawley a NPs-TiO<sub>2</sub> por vía inhalatoria a concentraciones de aerosol de 1.5-1.6 mg/m<sup>3</sup> mediante una cámara conectada a un generador de dispersión de polvo (Nurkiewicz *et al.*, 2009). Por otra parte se observó neutrofilia pulmonar en ratones hembra BALB/c/Sca expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub> por vía inhalatoria (Rossi *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Moon *et al.*, (2010) encontraron inflamación pulmonar tras la administración vía intraperitoneal de NPs-TiO<sub>2</sub> 40 mg/kg aunque esta no es la mejor vía de administración para reproducir la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> en el ambiente. También Baisch *et al.*, (2014) encontraron inflamación pulmonar tras la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> sin embargo se administraron dosis de 33 ± 4 mg/m<sup>3</sup> y 13 ± 1 mg/m<sup>3</sup> a ratas macho Fischer



por instilación intratraqueal y por inhalación concluyendo que la inflamación es dependiente de la dosis.

## **7. Efectos tóxicos de las NPs-TiO<sub>2</sub> *in vitro***

En diversos estudios se han reportado efectos adversos de las NPs-TiO<sub>2</sub>. Monteiller *et al.*, (2007) encontraron efectos oxidativos y Bhattacharya *et al.*, (2009) encontraron efectos genotóxicos.

En un estudio realizado por Ahmad *et al.*, (2012) se trató un plásmido pUC19 con concentraciones de 5, 10, 25 y 50 µg/ml de TiO<sub>2</sub> encontrando mediante el ensayo de colonias azul: blanco y el análisis de secuencia del DNA del fragmento α del gen LacZ que las NPs-TiO<sub>2</sub> inducen mutagénesis. En otro estudio Bernier *et al.*, (2012) incubaron superficies cubiertas con fibronectina a concentraciones de 40 y 400 µg/ml de NPs-TiO<sub>2</sub>, encontrando que las NPs-TiO<sub>2</sub> afectan la adhesión celular de pre-osteoblastos MC-3T3 mediada por fibronectina, observando también un cambio en la morfología celular y alteraciones en la organización del citoesqueleto de actina.

Para conocer el efecto de la nanoestructura del TiO<sub>2</sub> se incubaron células humanas epiteliales de mama MCF-7 y MDA-MB-468 con concentraciones crecientes de dispersiones de TiO<sub>2</sub> (100% anatasa o mezcla de 75% anatasa - 25% rutilo) durante 48 horas, concluyendo que las NPs-TiO<sub>2</sub> 100% anatasa exhiben efectos citotóxicos superiores (Lagopati *et al.*, 2014).

## **8. Citoesqueleto**

El citoesqueleto es un andamio dinámico que da soporte estructural. Los filamentos del citoesqueleto se forman como monómeros polimerizados en filamentos lineales. Existen tres tipos de filamentos: microfilamentos de actina o actina-F (MF), filamentos intermedios (FIs) y microtúbulos (MTs) (Manelli-Oliveira y Machado-Santelli, 2001). Cada uno de estos filamentos regula actividades fundamentales para la célula. Las principales funciones del citoesqueleto son brindar estructura y soporte a la célula, permitir su contractibilidad y movilidad, interviene en la regulación de varias funciones celulares como el transporte celular y la organización espacial (Reyes *et al.*, 2001).

### 1.8.1. Microfilamentos

#### Actina

Los MF o actina-F son componentes esenciales del citoesqueleto en células eucarióticas y juegan un papel esencial en numerosos aspectos de la biología celular, tales como la adhesión celular, la morfología celular, la citocinesis, y la migración (Akakura y Gelman, 2012).

Los MF se encuentran polimerizados por monómeros globulares de actina de 43 kDa y se agrupan dentro de la célula para formar diversos tipos de estructuras. Primero mediante la acción del complejo Arp 2/3 se lleva a cabo la nucleación la cual requiere la unión de dos o más monómeros de actina en la orientación apropiada, ya que la posición y longitud de los filamentos de actina están establecidas estrictamente en estructuras altamente ordenadas (Campellone y Welch., 2010). Asimismo el grado de polimerización, la estabilidad, la longitud y distribución de los filamentos de actina están regulados por proteínas de unión a actina (Bershadsky y Vasiliev, 1988) (Fig. 3).

La capacidad de una célula para coordinar el montaje y desmontaje de su citoesqueleto de actina es esencial para la integridad celular, la motilidad, el tráfico de membrana y cambios de forma (Millard *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que las funciones del citoesqueleto de actina están relacionadas con la actividad de miembros de la familia de pequeñas GTPasas como Rho, Rac y Cdc42 (Spiering y Hodgson, 2011). La interacción con estas proteínas asegura un control coordinado entre las funciones del citoesqueleto de actina y funciones celulares como la transcripción de genes, la morfogénesis, la migración, la apoptosis, el tráfico de vesículas, la transformación celular y en los fenómenos de adhesión ( Chi *et al.*, 2013).

Las GTPasas Rho juegan un papel clave en el tráfico de vesículas a través de su capacidad para regular el citoesqueleto de actina. En estudios recientes se ha encontrado que los miembros de la familia Rho además de participar en la regulación de la dinámica del citoesqueleto también están involucrados en el tráfico celular y en la tumorigénesis. Rac1 participa en vías de señalización que regulan la movilidad y otros procesos relacionados con el tráfico de membrana y la morfología de la célula. Cdc42 participa en el tráfico celular a través de la interacción con la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (N-WASP) y el complejo Arp2 / 3, lo que lleva a cambios en la dinámica de la actina. Las proteínas de la familia WASP median señales para activar la actividad de nucleación de

novo del complejo Arp2/3, diversos estudios sugieren que las proteínas WASP son fundamentales para la regulación de Arp2/3.

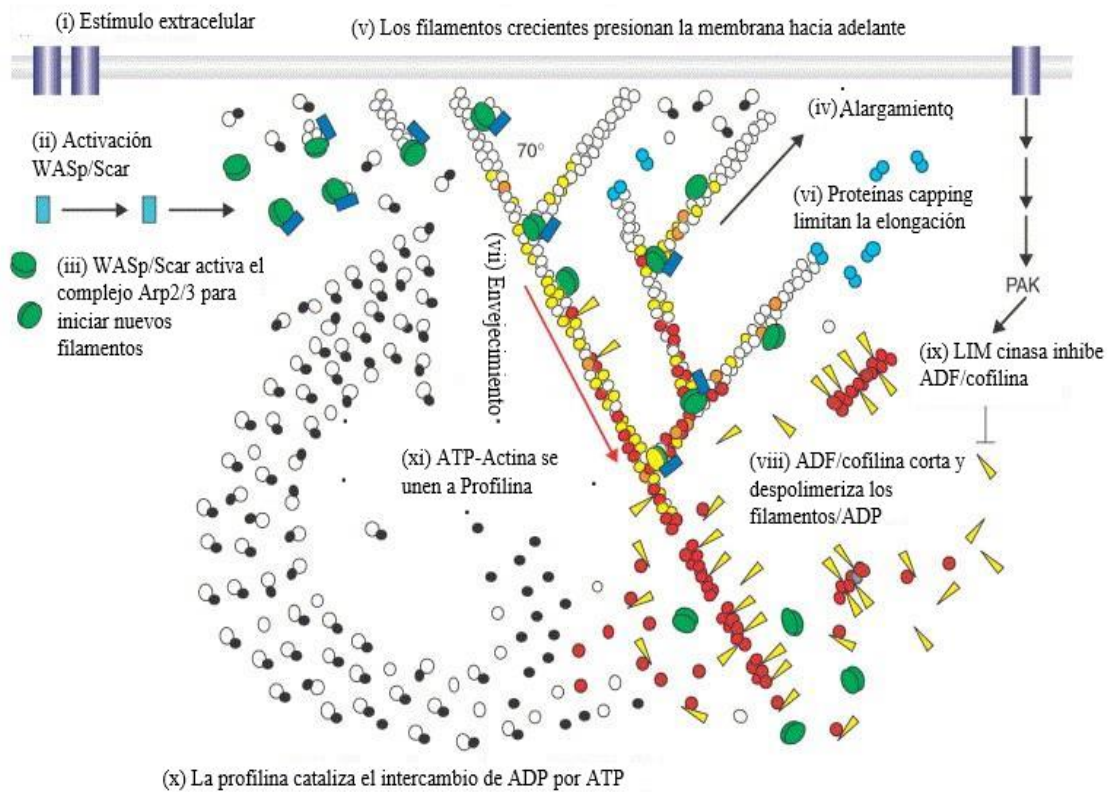


Figura 3. Representación esquemática del proceso de formación de los microfilamentos (modificado de Pollard y Beltzener, 2002).

## 1.8.2. Filamentos Intermedios

### Vimentina

Los FIs están implicados en diversas funciones celulares como el mantenimiento de la integridad global del citoplasma y la forma de la célula (Goldman et al., 1996; Eriksson et al., 2004). Los patrones de expresión de los FIs son específicos al tipo de célula y tejido en que se encuentren (Eriksson et al., 2004; Satelli et al., 2011). Hay seis clases principales de FIs. Estos incluyen, tipo I y II (queratinas ácidas y básicas, que se encuentra principalmente en las células epiteliales), Tipo III vimentina (células mesenquimales) y desmina (células musculares), tipo IV neurofilamentos (neuronas), tipo V laminas (núcleo de células) y el tipo VI nestina (neuronas embrionarias) (Satelli et al., 2011). Los FIs mantienen interacciones complejas con los microfilamentos y los

microtúbulos, y se sabe que los microtúbulos están implicados en la distribución de la vimentina en diversas partes de la célula (Helfand et al., 2004). La vimentina es una proteína de 57 kDa que constituye algunos FIs. Los filamentos de vimentina tienden a concentrarse alrededor del núcleo. Estos filamentos mantienen la posición del núcleo, proporcionándole un soporte mecánico y fijando su posición (Manelli-Oliveira y Machado-Santelli, 2001).

La vimentina al formar parte de las proteínas que constituyen los diversos tipos de FIs comparte una característica común de todas estas proteínas, el dominio con una espiral enrollada alfa hélice, lo que favorece la formación de polímeros altamente estables. La fosforilación afecta la estabilidad del polímero, su estructura y el ensamble de las proteínas. En estudios anteriores se ha mostrado que los FIs se relacionan con la regulación de la señalización, y que esta regulación es controlada mediante fosforilación (Eriksson *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que la mayoría de los contactos focales de integrina  $\alpha\beta3$  situados en el borde de varios tipos de células endoteliales, mostraron asociación con los microfilamentos así como con los filamentos intermedios de vimentina (Tsuruta y Jones, 2003) (ver Fig. 4).

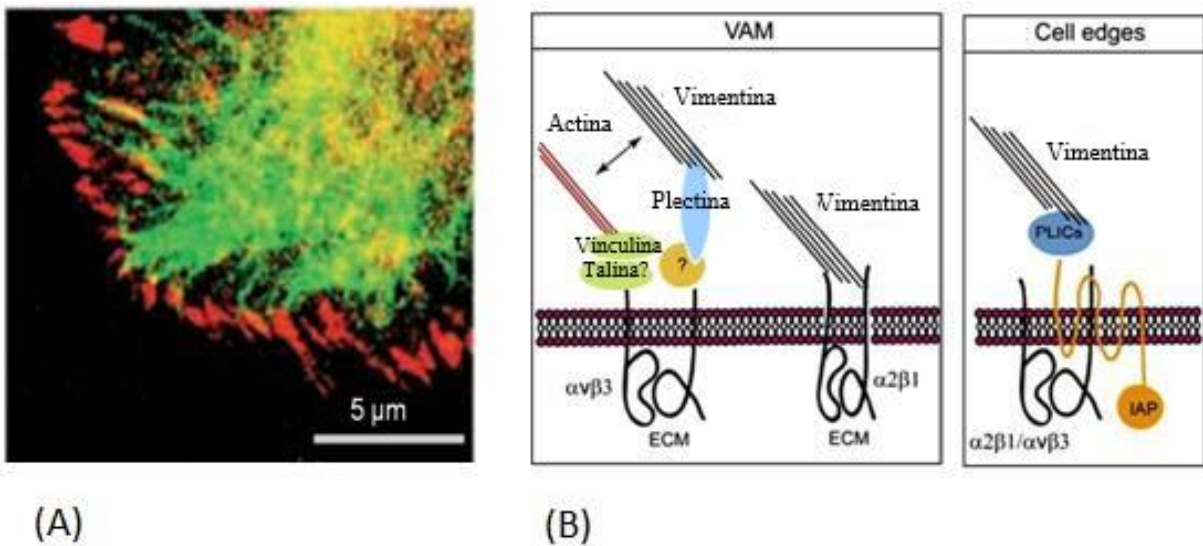


Figura 4. (A) Se muestra la dinámica de los filamentos de vimentina con la integrina  $\beta3$  mediante microscopia confocal láser (Tsuruta y Jones, 2003). (B) Representación esquemática de la vimentina asociada a integrinas en diferentes tipos de uniones celulares. ECM: Matriz extracelular, VAMs: Vimentina asociada a adhesiones de matriz (modificado de Ivaska et al., 2007).

La vimentina ha sido utilizada como un marcador para la transición epitelial-mesenquimal (EMT). Se ha reportado el aumento de la expresión de vimentina en diversos cánceres epiteliales incluyendo cáncer de próstata, tumores gastrointestinales, tumores del SNC, cáncer de mama, melanoma maligno, cáncer de pulmón y otros tipos de cánceres (Satelli *et al.*, 2011).

### **1.8.3. Microtúbulos**

#### **Tubulina**

Los microtúbulos (MT) son componentes esenciales de todas las células eucariotas para la estructura celular, la división celular, y el transporte intracelular. Son filamentos proteicos rígidos (Pringle *et al.*, 2013). Tienen un diámetro aproximado de 25nm. La pared de los MT está formada de protofilamentos. Se forman típicamente de 13 protofilamentos, cada uno de los cuales está construido a partir de en dímeros de moléculas de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ . Las moléculas de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina tienen un peso molecular de 50 kDa (Bershadsky y Vasiliev, 1988; Bowne-Anderson *et al.*, 2013) ver Fig.5.

Los modelos de ensamblaje de los MT implican una fase de nucleación seguida de la elongación de los MT en un número constante de polímero. Tanto la tasa de nucleación de los MT y la elongación se cree que están fuertemente influenciados por la concentración de tubulina- GTP libre (Caudron *et al.*, 2000).

Cada  $\alpha$  o  $\beta$  monómero tiene un sitio de unión para una molécula de GTP. El GTP que está enlazado al monómero  $\alpha$ -tubulina está atrapado físicamente en la interfaz del dímero y nunca se hidroliza o se intercambia, por lo que puede ser considerado como una parte integral de la estructura del heterodímero de tubulina. El nucleótido en la  $\beta$ -tubulina, por el contrario, puede estar en la forma de GTP o de GDP, y es intercambiable (Alberts *et al.*, 2002).

Para formar un nuevo filamento las subunidades se deben montar en un agregado inicial, o núcleo, que es estabilizado por muchos contactos subunidad-subunidad, y entonces puede alargarse rápidamente por adición de más subunidades. El proceso inicial de montaje de núcleo se llama nucleación de filamentos y al posterior crecimiento por adición de subunidades se le llama elongación (Alberts *et al.*, 2002).

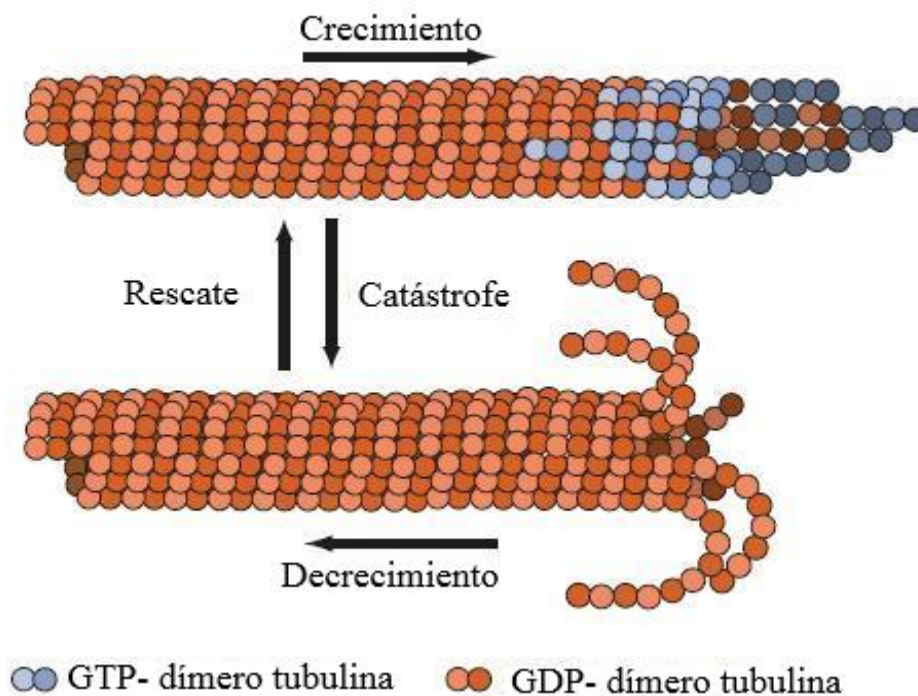


Figura 5. Representación esquemática del proceso de polimerización y despolimerización de los microtúbulos (modificado de Bowne-Anderson et al., 2013).

#### 1.8.4. Efecto de las NPs-TiO<sub>2</sub> sobre citoesqueleto

Se observó de forma *in vitro* que la interacción de las NPs-TiO<sub>2</sub> con los MTs induce la inhibición de su polimerización (Gheshlaghi *et al.*, 2008). Por otro lado en células HaCat tras la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> se produjo ROS y una modificación de los microfilamentos y microtúbulos de una manera dosis dependiente (Chan *et al.*, 2011). Sin embargo no se han realizado estudios de los posibles efectos de las NPs-TiO<sub>2</sub> sobre los filamentos de vimentina.

En un estudio del 2012 realizado por Cui *et al* en ratones con lesiones hepáticas provocadas por exposición a largo plazo a NPs-TiO<sub>2</sub> se encontró que 19.14% de los genes modificados correspondían a genes relacionados a citoesqueleto. En otro estudio realizado por Li *et al*, (2013) en ratones con lesiones pulmonares provocadas por exposición a largo plazo a NPs-TiO<sub>2</sub> se encontró que 17% de los genes modificados también correspondían al citoesqueleto. Por consiguiente, es importante profundizar en el conocimiento de los efectos de las NPs-TiO<sub>2</sub> sobre el citoesqueleto.

## **2. Justificación**

El uso extensivo que se les ha dado a los NMs recientemente hace necesario conocer las implicaciones ocupacionales y los riesgos potenciales en la salud que los NMs conllevan, los cuales son en gran parte desconocidos.

Las propiedades físicas y químicas que hacen únicos a los NMs también pueden hacerlos potencialmente riesgosos para los humanos y el ambiente. Hay gran número de NMs, y las propiedades toxicológicas de estos, varían drásticamente. Por lo que es importante la evaluación de la toxicidad y riesgos de cada uno de estos (Savolainen *et al.*, 2010).

El TiO<sub>2</sub> debido a sus propiedades únicas es uno de los materiales más ampliamente utilizados por la industria, para diversos usos (Baan., 2010). Existen estudios previos que reportan daños inducidos por la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> encontrando: citotoxicidad, genotoxicidad, estrés oxidante, cambios en la expresión de genes del citoesqueleto, entre otros (Bhattacharya *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2012; Jaeger *et al.*, 2012). Por lo tanto, se necesitan más estudios que proporcionen información de la interacción y los mecanismos de daño celular inducido por NPs-TiO<sub>2</sub>, durante una exposición crónica (Baan., 2010).

El estudio de los filamentos del citoesqueleto (actina-F, FIs y MT) es importante en la comprensión de los cambios morfológicos que se producen en las células como resultado a la exposición a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>.

## **3. Hipótesis**

Se observarán cambios en la localización de los filamentos de actina-F, vimentina y tubulina de una manera dependiente de la concentración de NPs-TiO<sub>2</sub> después de siete días de exposición, dando lugar a una reorganización del citoesqueleto.

## **4. Objetivo**

El objetivo de este trabajo es determinar la organización del citoesqueleto en células cancerosas epiteliales de pulmón de la línea A549 después de siete días de exposición a NPs-TiO<sub>2</sub>

## Objetivos particulares

- Realizar la exposición del cultivo celular a diversas concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> (1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>).
- Determinación de la morfología celular.
- Determinar el patrón de distribución de microfilamentos (actina-F), FIs (vimentina) y microtúbulos (tubulina) en células epiteliales de pulmón A549 y definir si existe una redistribución de las proteínas en células tratadas con NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 1,5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>.
- Evaluar la morfología de las células A549 tratadas con NPs-TiO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones a través del área, perímetro, circularidad, diámetro de Feret, relación de aspecto, número y longitud de las ramificaciones, longitud máxima del filamento principal, número de uniones y triples uniones para actina-F y vimentina.

## 5. Materiales y métodos

### 1. Cultivo celular

Se utilizaron células epiteliales humanas de pulmón de la línea A549 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células fueron cultivadas en medio F12K (In Vitro S.A., # cat. ME-038 D.F. México) complementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Bio West, # cat. US1520 Kansas City, MO) en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Para el subcultivo de células en monoplaca se enjuagaron las cajas con PBS y posteriormente se añadió de 2 a 4 ml de tripsina (In Vitro S.A, #cat. EN-008 D.F. México) a las cajas donde se mantenían adheridas las células y se incubó a 37°C durante 5 minutos. Se despegaron las células y después se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm, se recuperó el pellet y se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 1ml de medio F12K complementado con 10 % de SFB. Se diluyeron 10µl de azul de tripano con 10 µl de muestra de células.

Se realizó el conteo de células mediante la cámara de Neubauer en un microscopio invertido Leica Microsystems CMS GmbH (Leica, Germany) ver Fig.6.



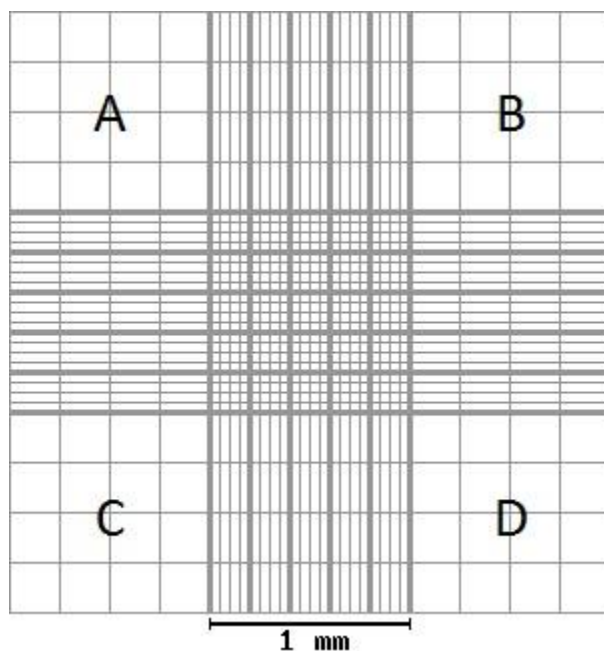


Figura 6. Se muestra la cámara de Neubauer dividida en cuatro cuadrantes A, B, C y D para realizar el conteo de las células.

El total de células se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\frac{(\sum \text{células/cuadrante} \times V \text{ (ml) de medio} \times \text{factor de dilución} \times 10\,000)}{4}$$

Se sembraron las células en cajas petri de 24 cm<sup>2</sup> y 75cm<sup>2</sup> con 2 a 5 ml de medio F12K complementado con 10 % de SFB (Freshney, 2010 modificado).

## 2. Exposición a nanopartículas

Las NPs-TiO<sub>2</sub> (anatasa, diámetro 25 nm) utilizadas (Sigma Aldrich, # cat. 637254-50G, St. Louis, MO) se suspendieron en medio F12K complementado con 10 % de SFB y se colocaron en el sonicador durante 30 min para obtener una suspensión homogénea. Se trataron las células epiteliales de pulmón A549 con concentraciones de 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 7 días.

### **3. Tinción hematoxilina y eosina (H&E)**

Se cultivaron 150,000 células epiteliales de pulmón A549 sobre cubreobjetos en cajas petri de 8.5 cm<sup>2</sup>, se trataron las células con concentraciones de 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 7 días. Posteriormente se lavaron con PBS, y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 1 hora. Se enjuagaron las muestras con agua. Posteriormente se le agregó alcohol a concentraciones decrecientes 100% durante 3 minutos, después 90% ,80% y 60% durante dos minutos cada concentración. Se enjuagó y se le añadió hematoxilina de Harris durante 25 minutos. Se lavó la muestra y después se le añadió la eosina durante 15 minutos. Se enjuagó y finalmente se montaron las muestras y se sellaron con barniz de uñas para su observación al microscopio.

### **4. Inmunofluorescencia**

Para el análisis de citoesqueleto por inmunofluorescencia las células A549 epiteliales de pulmón se cultivaron 150,000 células sobre cubreobjetos en cajas petri de 8.5 cm<sup>2</sup>, se trataron las células con concentraciones de 1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> de NPs-TiO<sub>2</sub> durante 7 días. Posteriormente se lavaron con PBS, y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 1 hora. Enseguida se lavaron 2 veces por 5 minutos en PBS, las células se permeabilizaron con tritón X-100 1% en PBS durante 7 minutos. Se lavaron nuevamente con PBS 2 veces por 5 minutos. Se bloqueó con albúmina sérica bovina 1% en PBS durante una hora y se lavó con PBS 2 veces por 5 minutos. La incubación para los anticuerpos se realizó durante 1 hora a 37 °C, diluidos 1:100. Se utilizó el anticuerpo primario para anti α/β tubulina (Santa Cruz Biotechnology, # cat. SC-51502). El anticuerpo secundario utilizado para α/β tubulina fue anti mouse acoplado a FITC. Se utilizó anti vimentina conjugada a FITC (Santa Cruz Biotechnology, # cat. SC-7558). La actina-F se marcó con phalloidin conjugada a TRITC R415 (Molecular Probes). Finalmente las muestras se lavaron tres veces con PBS-tritón 1%, dos veces con PBS 1X durante 5 minutos y con agua destilada. Las muestras se montaron y se sellaron con barniz de uñas para su observación en el microscopio. Se utilizó el microscopio confocal láser de barrido DM IRB TCS SP2 Leica Ltd. Co., Germany.

## **5. Contraste interdiferencial Nomarski (DIC)**

Se obtuvieron imágenes en contraste de fases utilizando el microscopio confocal láser de barrido DM IRB TCS SP2 Leica Ltd. Co., Germany en condiciones de luz transmitida.

## **6. Análisis digital de imágenes (ADI)**

Para realizar el ADI se realizaron los siguientes pasos: 1.- primero se adquirió la imagen de las células expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> y marcadas por inmunofluorescencia, mediante microscopia confocal láser 2.- después la imagen obtenida se segmentó utilizando el software Image J 1.47m el cual es un programa de procesamiento digital de imagen de dominio público programado en Java 1.6.0\_20 (32-bit) desarrollado en National Institutes of Health 3.- a continuación se pre-procesó la imagen convirtiéndola a 8-bit, modificando el contraste, el brillo y el umbral de color. 4.- posteriormente se procesó la imagen de manera binaria y esqueletonizada para la medición de los parámetros 5.- finalmente se obtuvieron los resultados de los distintos parámetros medidos, esto corresponde al último paso denominado clasificación (Fig. 7).

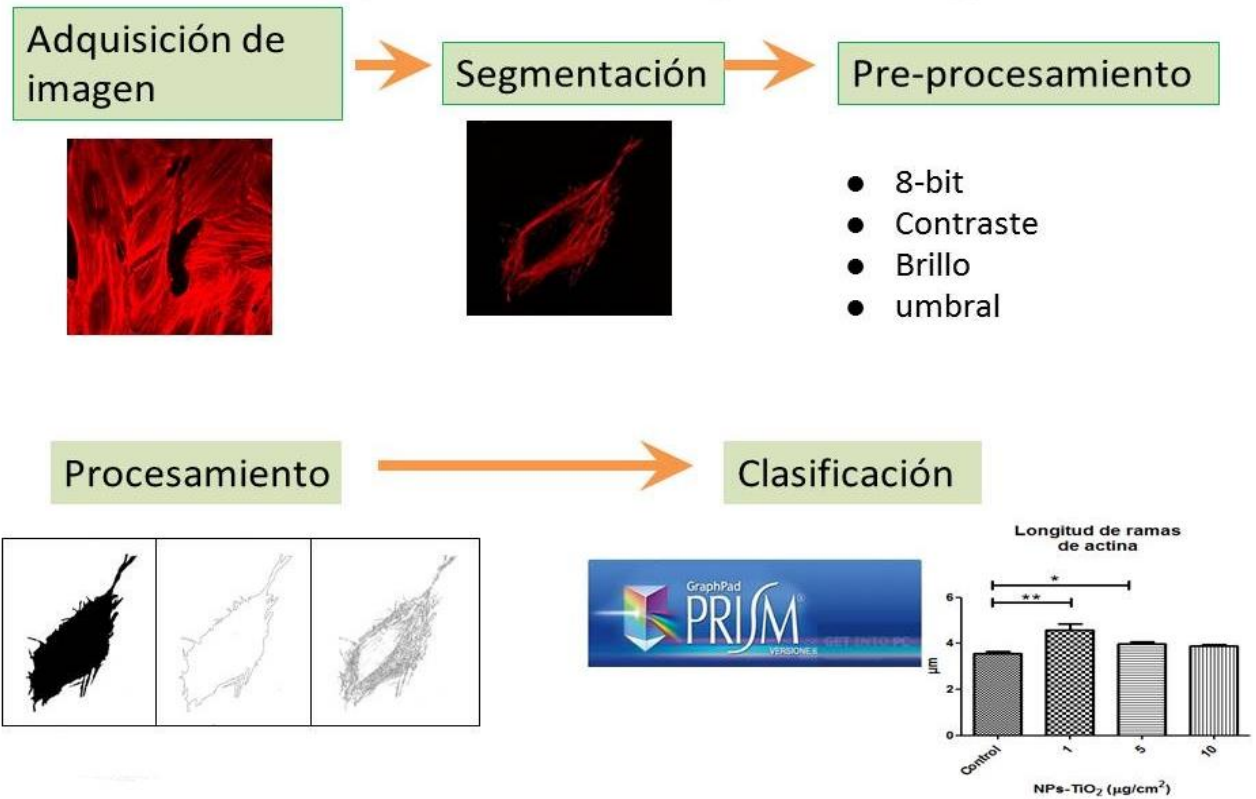


Figura 7. Se esquetizan los pasos seguidos para la realización del ADI.

De manera más amplia el procesamiento de las imágenes mediante el software Image J 1.47m se realizó en dos etapas: 1.- las imágenes se binarizaron y analizaron para la obtención de los parámetros de la morfología celular (área, perímetro, circularidad, diámetro de Feret y RA) 2.- por otro lado las imágenes se binarizaron y esqueletonizaron para cuantificar los cambios en la estructura de los filamentos de actina y vimentina mediante diferentes parámetros (número y longitud de las ramificaciones, longitud máxima del filamento principal, número de uniones y triples uniones), ver procedimiento en Anexo (Fig. 8).

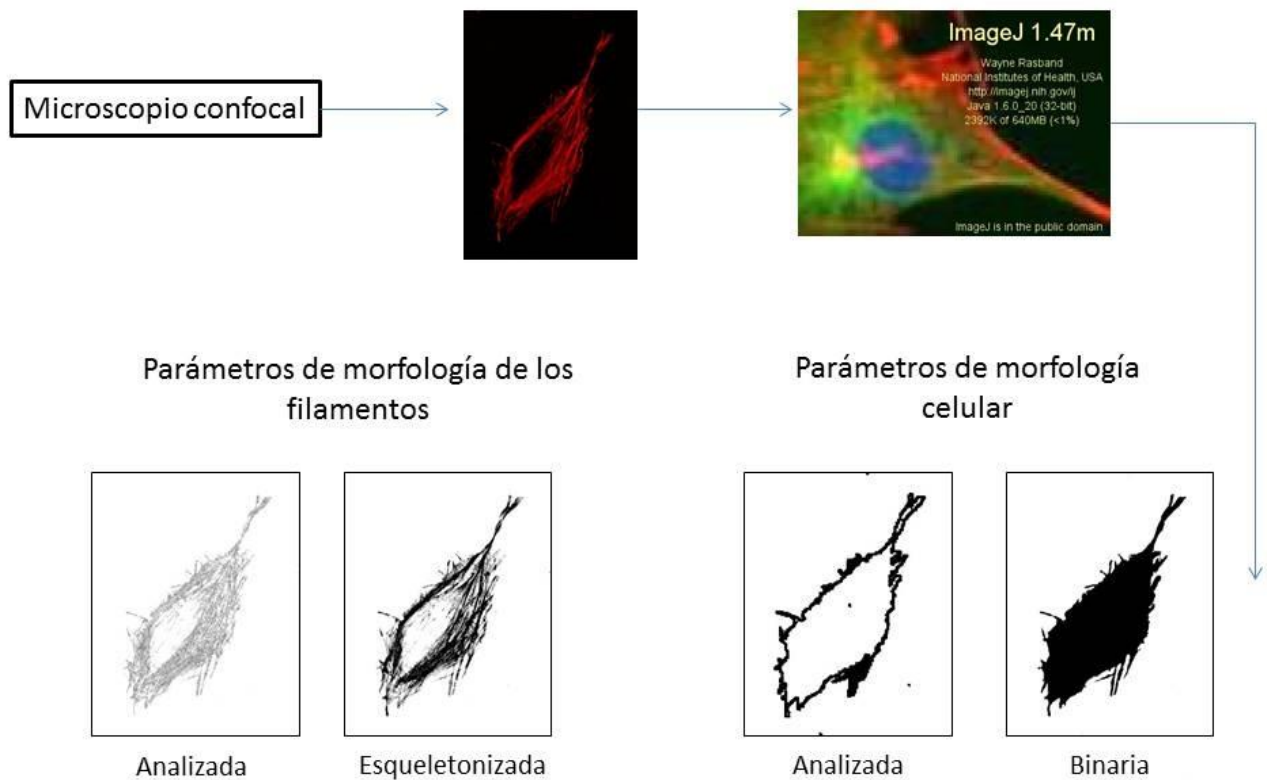


Figura 8. Procesamiento de las células epiteliales de pulmón A549 mediante el software image J 1.47m para la obtención de parámetros morfológicos y de organización estructural del citoesqueleto.

### 5.6.1. Parámetros de morfología celular

**Área:** Es la superficie proyectada de la célula y se define por una curva desarrollada a lo largo del contorno.

**Perímetro:** Es la zona que delimita a la célula y tiene un pixel de grosor.

**Circularidad:** Mide la relación entre el área (A) y el perímetro (P) a través de la expresión:  
 $Ci = 4 \times (A / P^2)$ .

**Diámetro de Feret:** Es la distancia entre los dos puntos más distantes de la célula.

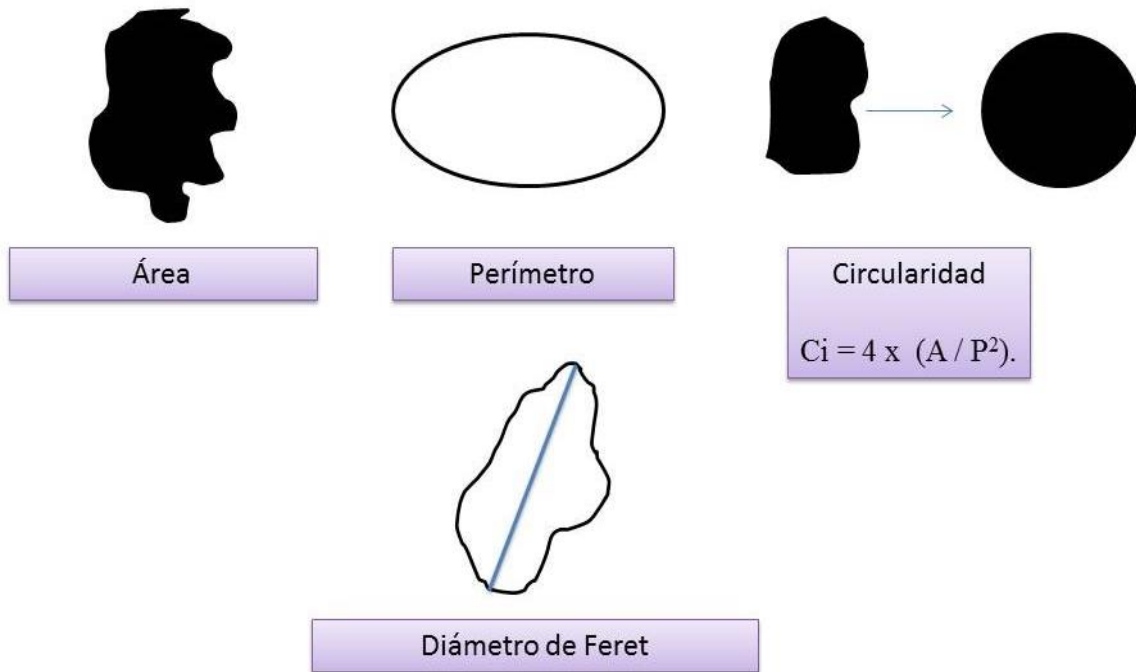


Figura 9. Esquema en donde se ilustran los parámetros de morfología celular utilizados.

### 5.6.2. Parámetros de morfología de los filamentos

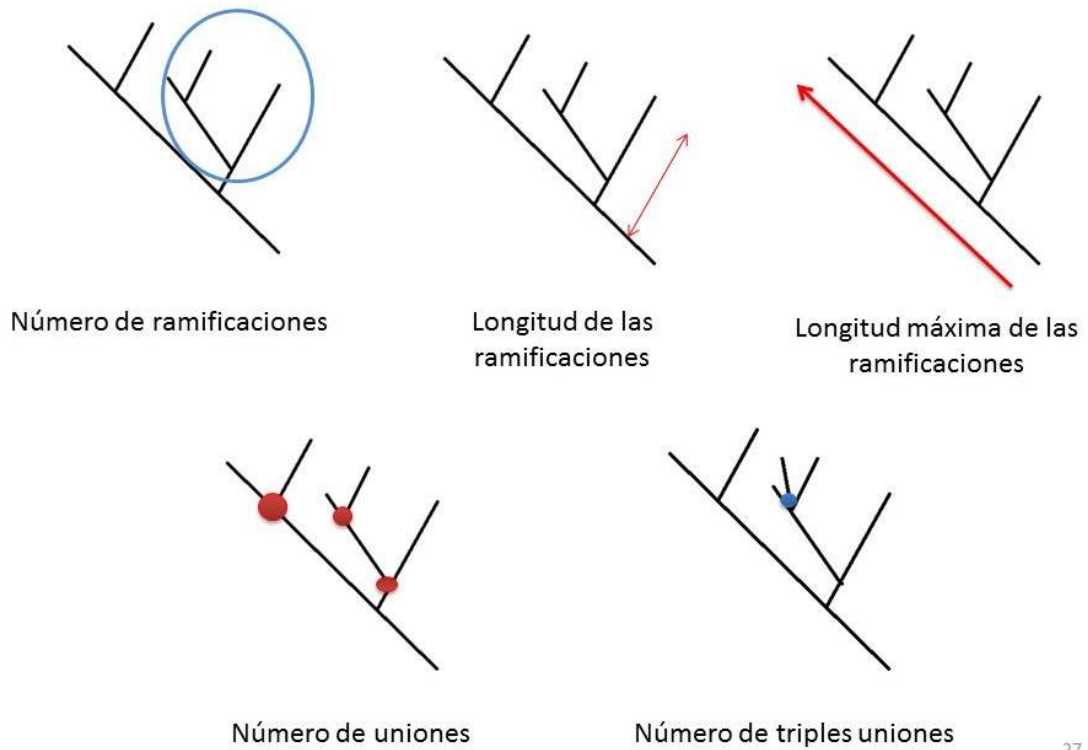
Número de ramificaciones.- Número de filamentos finos derivados de un filamento principal.

Longitud de las ramificaciones.- distancia entre el punto de unión a un filamento principal hasta la punta.

Longitud máxima de las ramificaciones.- Distancia entre el inicio y fin del filamento principal.

Número de uniones totales entre el filamento principal y sus derivados incluyendo dobles y triples enlaces.

Número de triples uniones.- número de puntos de bifurcación entre el filamento principal y su derivado.



27

Figura 10. En este esquema se ilustran los parámetros de estructura de los filamentos.

## 7. Análisis estadístico

Los resultados no muestran una distribución normal por lo que se utilizó el software GraphPad Prism para realizar el test Kruskal-Wallis (análisis no paramétrico de variación (ANOVA)).

## 6. Resultados

Internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> en células epiteliales de pulmón A549 y morfología mediante la técnica de H&E y contraste diferencial Nomarsky

Para observar la internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub> se utilizaron dos técnicas distintas; la tinción con H & E comparada con las imágenes obtenidas por contraste de fases (Nomarski). Mediante ambas técnicas se observó poca internalización a la concentración de 1 µg/cm<sup>2</sup> y una mayor internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> a las concentraciones de 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>. Siendo la internalización dependiente de la concentración. También se observaron cambios aparentes en la morfología celular a las concentraciones de 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> (Fig. 11).

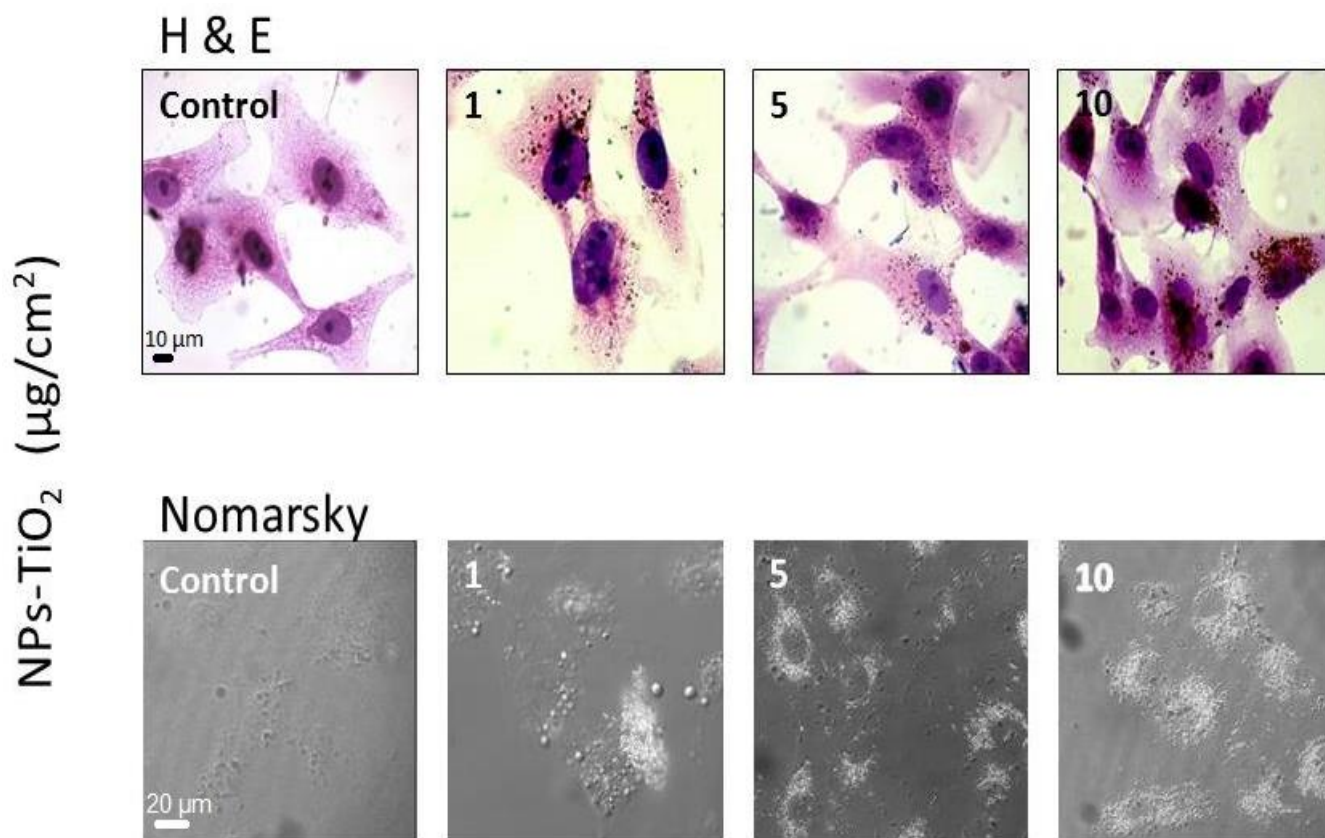


Figura 11. Morfología e internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub> en células epiteliales de pulmón A549 después de 7 días de exposición a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>) observada mediante la tinción H&E, 100x y Nomarsky.



## Localización de actina-F en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub>

Para comprender los cambios morfológicos aparentes de las células se obtuvo la localización de los filamentos de actina en las células epiteliales de pulmón mediante microscopía confocal y para comprobar la internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> se obtuvieron imágenes de contraste de fases. El patrón de actina-F en el control muestra una estructura normal del citoesqueleto de actina. Sin embargo en las células tratadas con NPs-TiO<sub>2</sub> se exhibe una distribución anormal aparente de actina-F. En las imágenes de contraste de fase se muestra la presencia de NPs-TiO<sub>2</sub> en las células tratadas a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>) (Fig. 12 A).

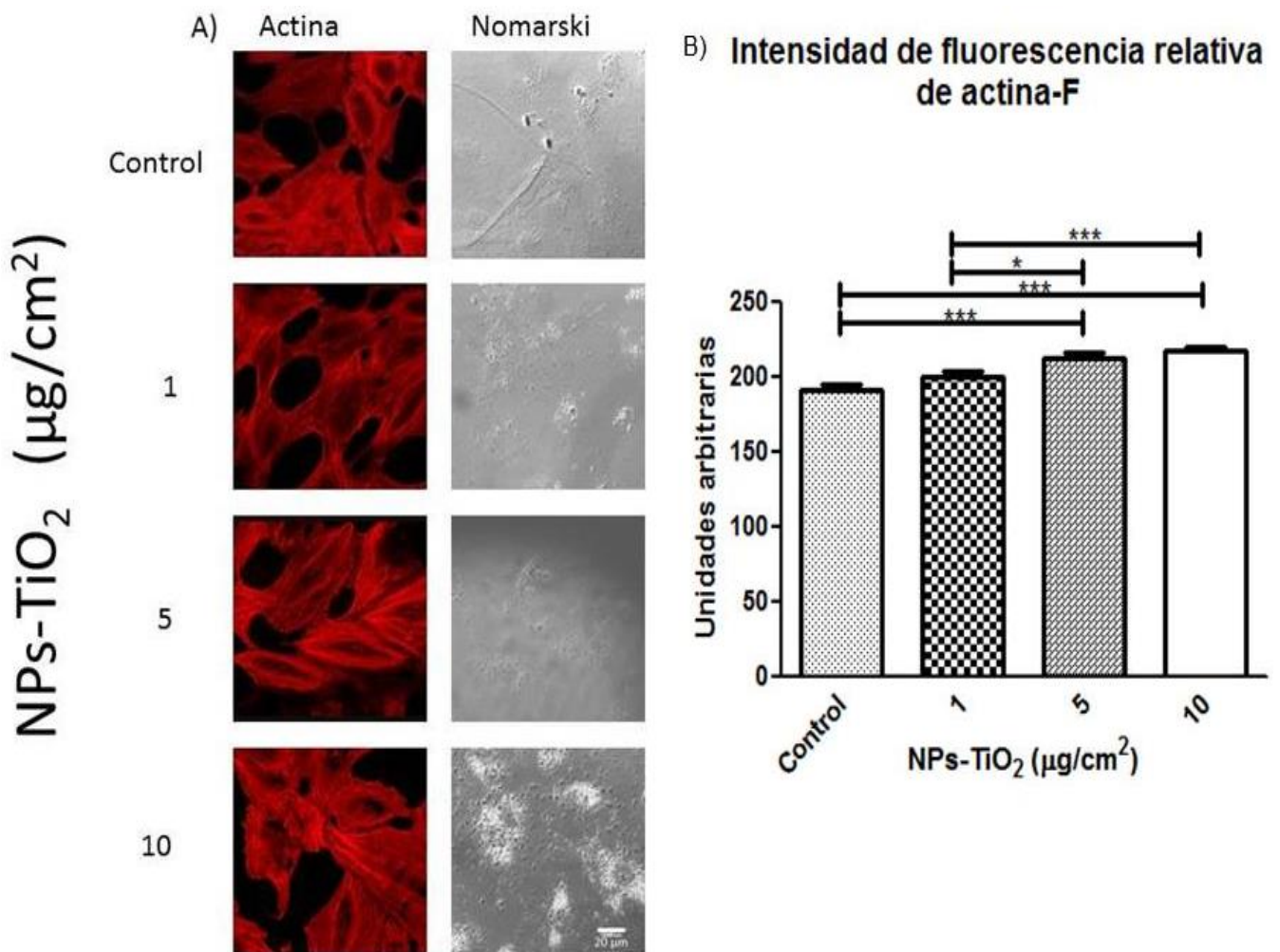


Figura 12. A) Localización de los filamentos de actina-F mediante microscopía confocal láser y contraste de fases (Leica DM IRB TCS SP2) en células de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control;  $n=60-62$ .

Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la intensidad de fluorescencia de Actina-F, a las concentraciones de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  9.3% ( $n = 61$ ) y a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  11.8% ( $n = 60$ ) (Fig. 12 B).

### Análisis digital de imágenes

Los cambios en la morfología exterior de la célula se cuantificaron mediante el área, perímetro, circularidad, diámetro de Féret y la relación de aspecto analizadas a partir de imágenes binarizadas (Fig. 13).

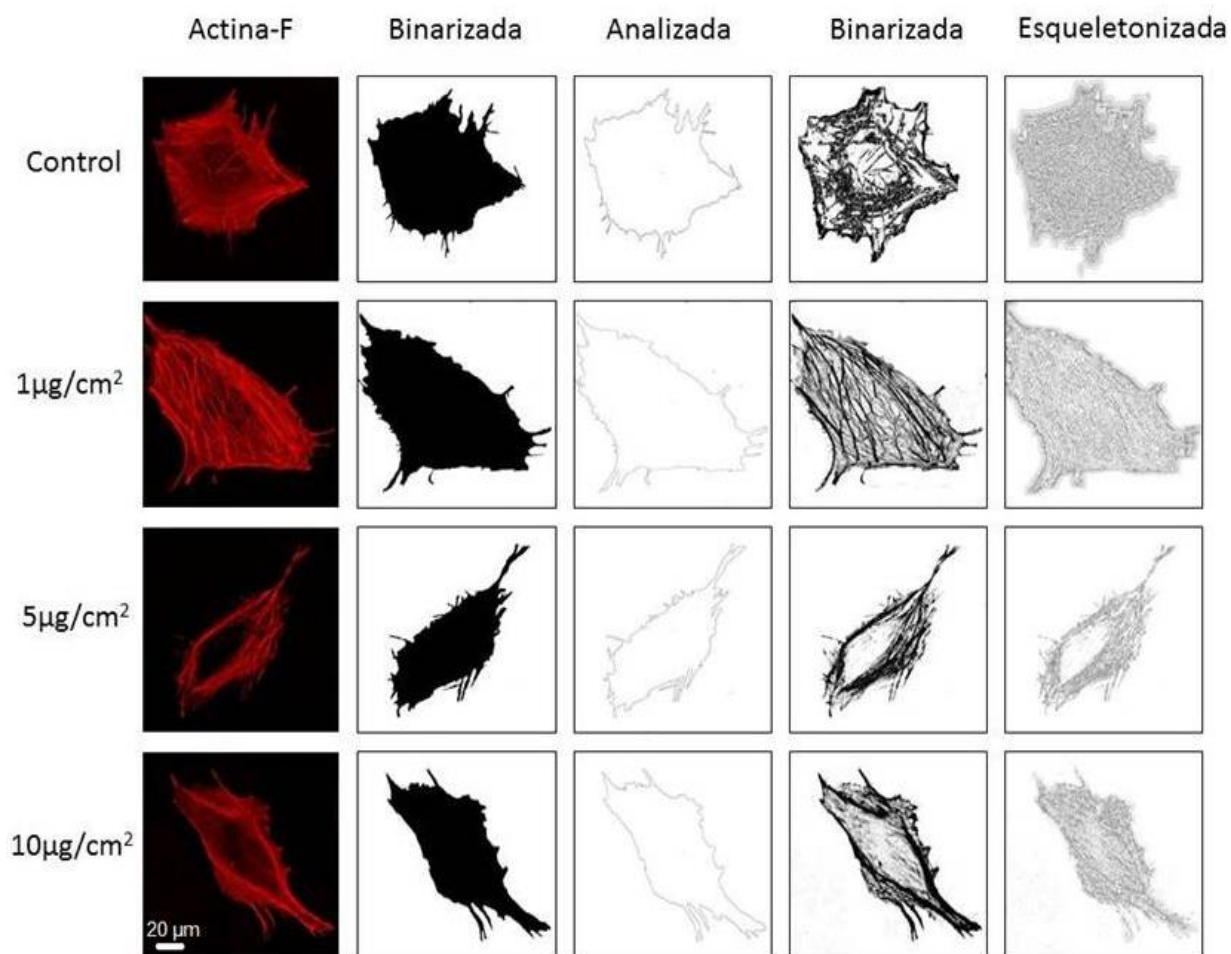


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal láser de actina-F en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub> analizadas mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) para la medición de parámetros de morfología celular y estructura de los filamentos en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>.

### Análisis de la morfología exterior de la célula y de sus filamentos

El área de las células epiteliales de pulmón A549 expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub> aumentó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) los porcentajes fueron 252.73 % (n = 6) a 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 73.92 % (n = 17) a 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 72.92 % (n = 18) a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> (Fig. 14).

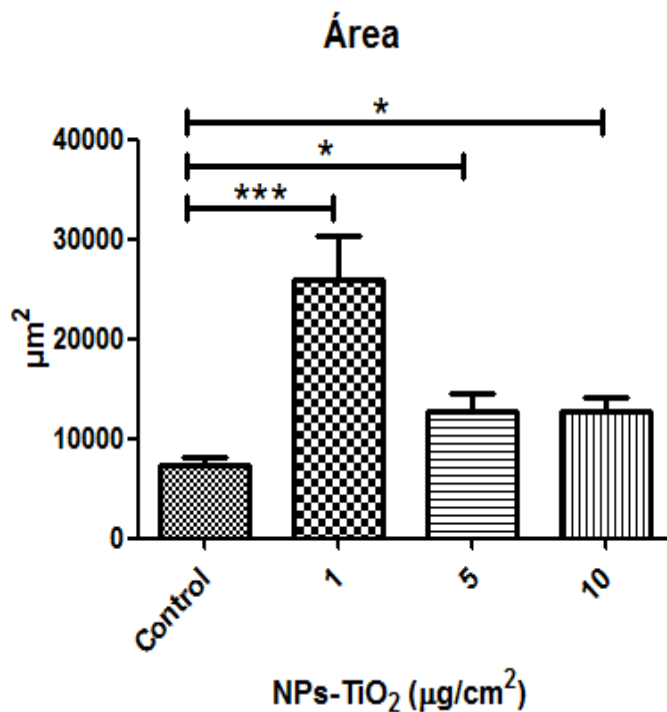


Figura 14. Cuantificación del área mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n = 6-23.

También el perímetro celular aumentó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) los porcentajes fueron 167.06 % (n = 6) a 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 40.84 % (n = 17) a 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 44.46 % (n = 18) a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> (Fig. 15).

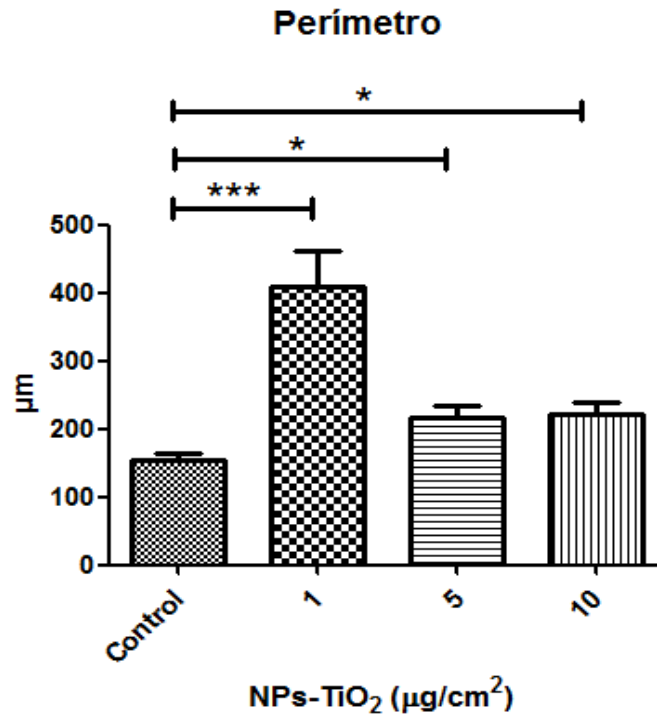


Figura 15. Cuantificación del perímetro mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control;  $n = 18-20$ .

En cuanto a la circularidad de las células epiteliales de pulmón A549 esta disminuyó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) a  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  49.55 % ( $n = 6$ ) (Fig. 16).

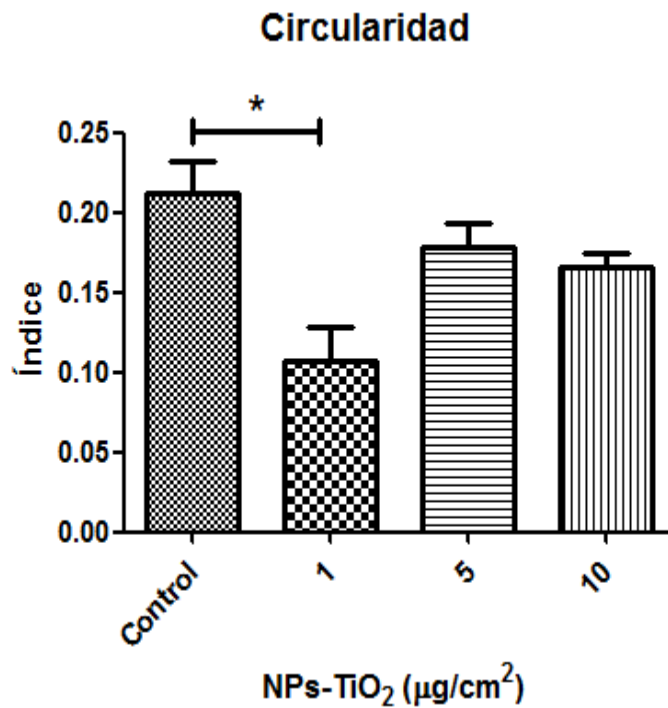


Figura 16. Cuantificación de la circularidad mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) de células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control;  $n = 6-23$ .

El diámetro de Feret aumentó de manera significativa ( $p < 0.05$ ), los porcentajes fueron 97.07 % ( $n = 6$ ) a 1 µg/cm<sup>2</sup>, 41.89 % ( $n = 17$ ) a 5 µg/cm<sup>2</sup> y 43.75 % ( $n = 18$ ) a 10 µg/cm<sup>2</sup> (Fig. 17).

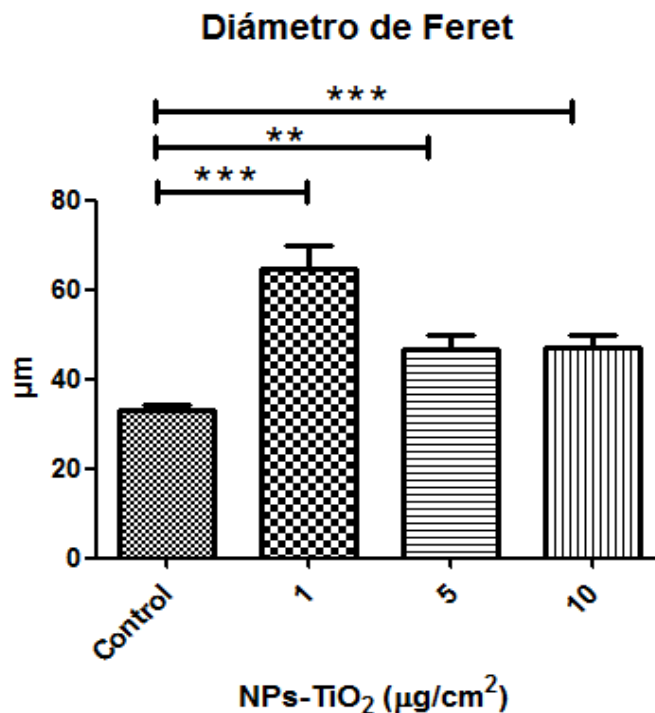


Figura 17. Cuantificación del diámetro de Feret mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) de células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 6-23.

Los cambios en el arreglo del citoesqueleto de actina se cuantificaron mediante el número y longitud de ramificaciones, longitud máxima de filamentos principales, número de uniones y triples uniones de los filamentos.

El número de ramificaciones de actina-F aumentó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) a las tres diferentes concentraciones, los porcentajes fueron 208.7 % (n = 6) a 1 µg/cm<sup>2</sup>, 97.8 % (n = 18) a 5 µg/cm<sup>2</sup>, 109 % (n =17) a 10 µg/cm<sup>2</sup> en las células epiteliales analizadas (Fig. 18).

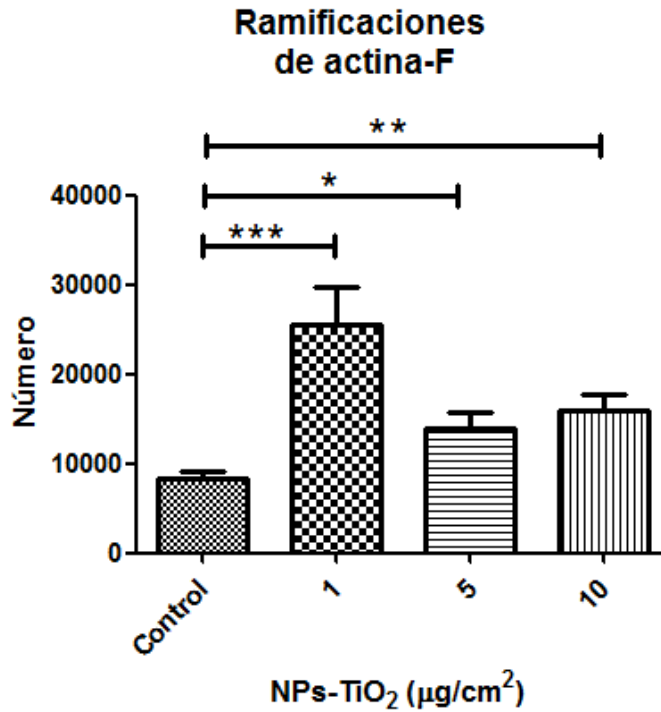


Figura 18. Cuantificación del número de ramificaciones de actina-F mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 6-24.

También la longitud de las ramificaciones de actina-F aumentó en las células epiteliales de pulmón A549 de manera significativa ( $p < 0.05$ ) 28.6 % (n = 6) a 1 µg/cm<sup>2</sup> y 11.9 % (n = 18) a 5 µg/cm<sup>2</sup> después de ser expuestas durante 7 días a las NPs-TiO<sub>2</sub> (Fig. 19).

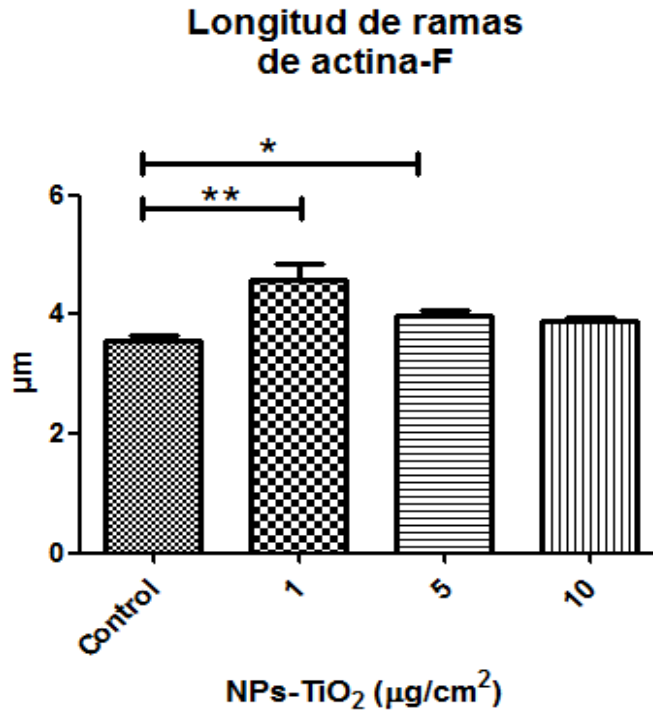


Figura 19. Cuantificación de la longitud de ramas de actina-F mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 6-24.

En cuanto a la longitud máxima de las ramificaciones de actina-F esta disminuyó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) únicamente a 1 µg/cm<sup>2</sup> 51.19 % (n=6) (Fig. 20).



## Longitud máxima de filamentos de actina

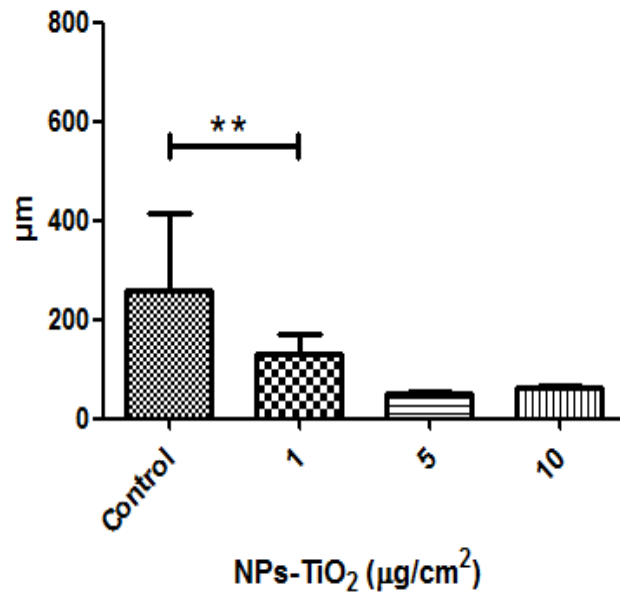


Figura 20. Cuantificación de la longitud máxima de ramas de actina-F mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 6-24.

El número de uniones de las ramificaciones de actina-F aumentó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) 332.1 % (n = 6) a 1 µg/cm<sup>2</sup>, 149.4 % (n = 18) a 5 µg/cm<sup>2</sup> y 154.2 % (n = 18) a 10 µg/cm<sup>2</sup> (Fig. 21).

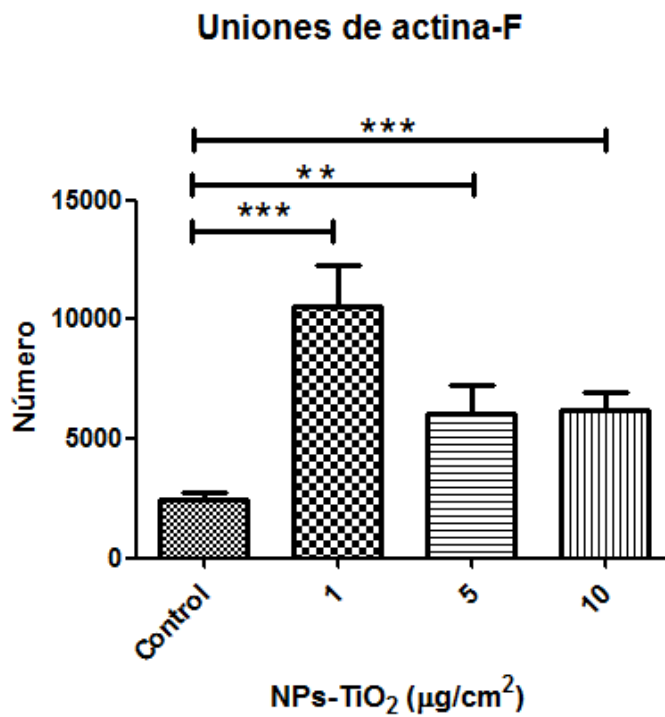


Figura 21. Cuantificación del número de uniones de actina-F mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 6-24.

Asimismo el número de triples uniones de actina-F aumentó de manera significativa ( $p < 0.05$ ), 504.8 % (n = 6) a 1 µg/cm<sup>2</sup>, 251.27 % (n = 18) a 5 µg/cm<sup>2</sup> y 254 % (n =18) a 10 µg/cm<sup>2</sup> (Fig. 22).

### Triples puntos de actina-F

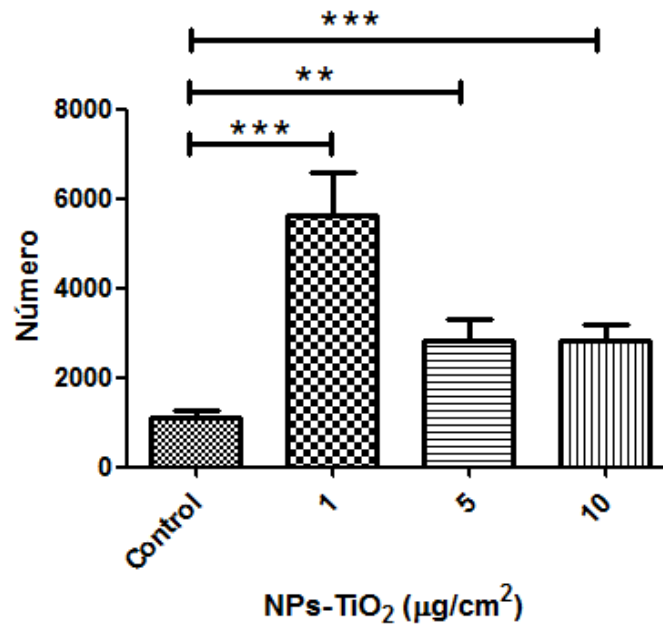


Figura 22. Cuantificación del número de triples uniones de actina-F mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 6-24.

### Localización de vimentina en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub>

Se obtuvo la localización de los filamentos de vimentina en las células epiteliales de pulmón mediante microscopía confocal y para comprobar la internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> se obtuvieron imágenes de contraste de fases. En las imágenes de contraste de fase se muestra la presencia de NPs-TiO<sub>2</sub> en las células tratadas a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>) (Fig. 23 A).

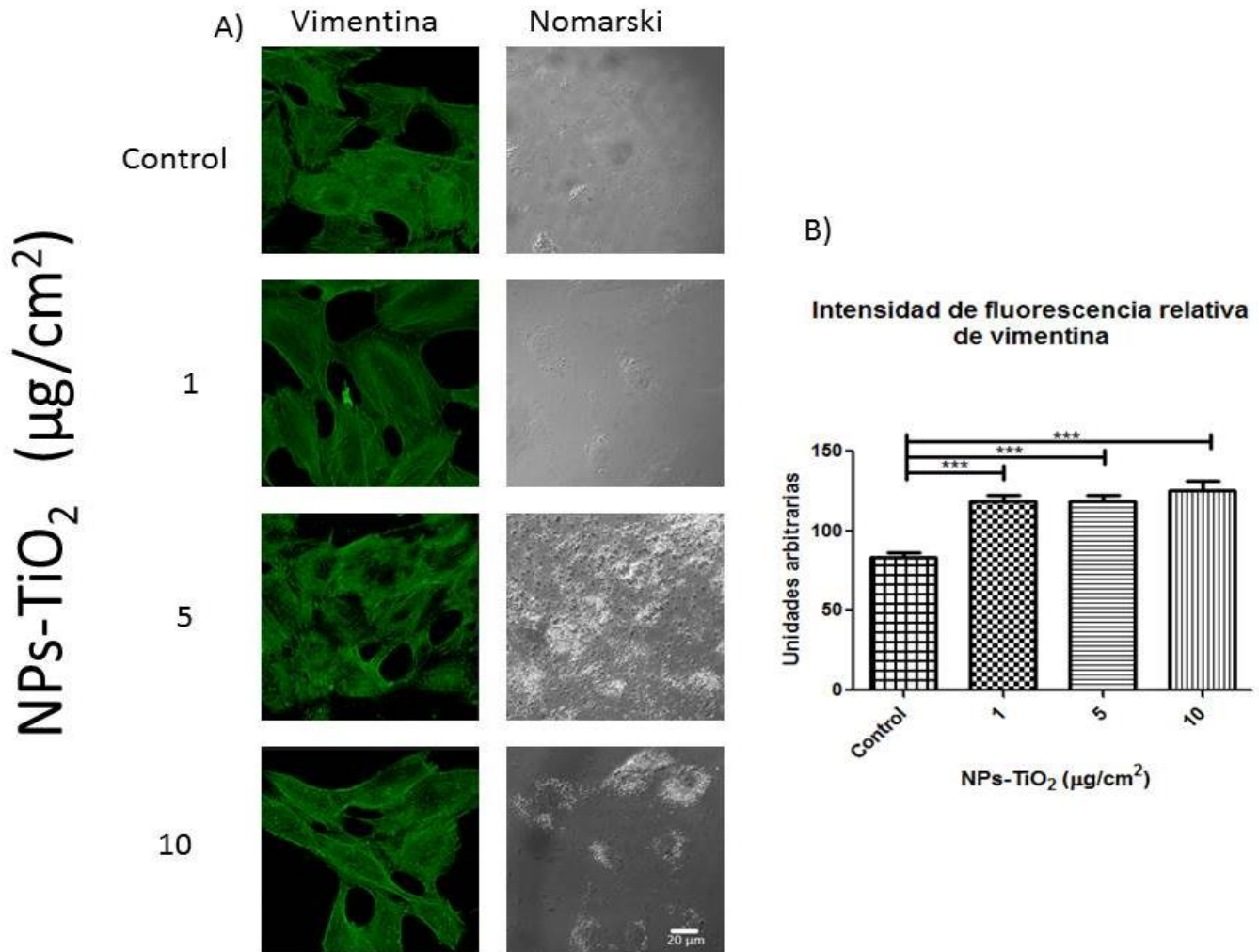


Figura 23. A) Localización de los filamentos de vimentina mediante microscopia confocal láser y contraste de fases (Leica DM IRB TCS SP2) en células de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 31-32.

Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la intensidad de fluorescencia de vimentina, los porcentajes fueron 41.88 % (n = 31) 1 μg/cm<sup>2</sup>, 41.88 % (n = 31) a 5 μg/cm<sup>2</sup> y 49.99 % (n = 31) a 10 μg/cm<sup>2</sup> % (Fig. 12 B).

La longitud de las ramificaciones de vimentina disminuyó en las células epiteliales de pulmón A549 de manera significativa ( $p < 0.05$ ) 10.34 % ( $n = 6$ ) a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Fig. 24).

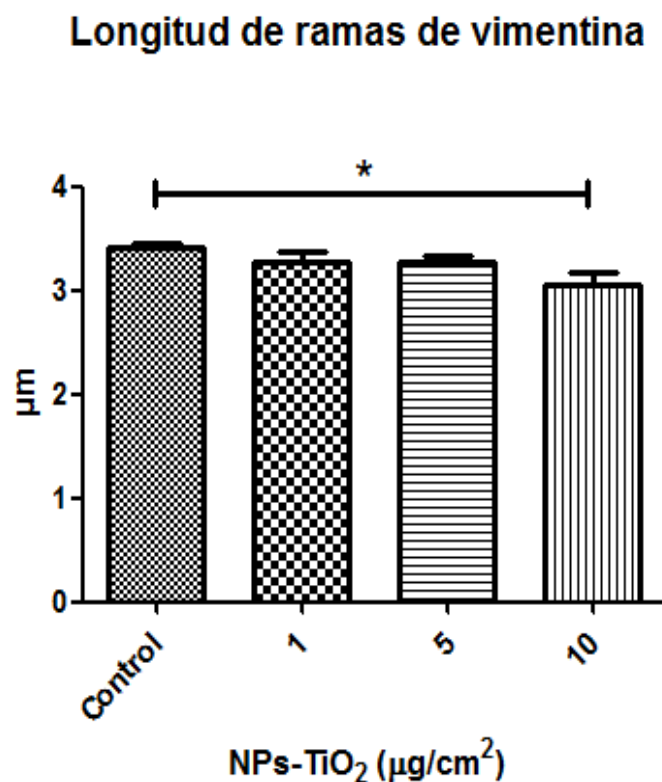


Figura 24. Cuantificación de la longitud máxima de ramas de actina-F mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control;  $n = 6-15$ .

El número de uniones de vimentina disminuyó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) 56.69% ( $n = 6$ ) a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Fig. 25).

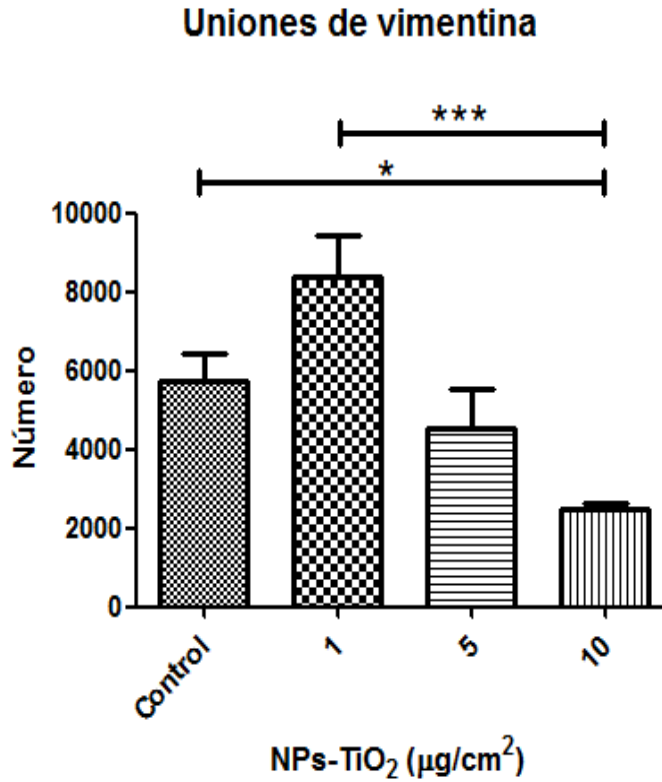


Figura 25. Cuantificación del número de uniones de vimentina mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 6-15.

Finalmente en número de triples uniones de los filamentos de vimentina también disminuyó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) 57.7 % (n = 6) a 10 µg/cm<sup>2</sup> (Fig. 26).

### Triples puntos de vimentina

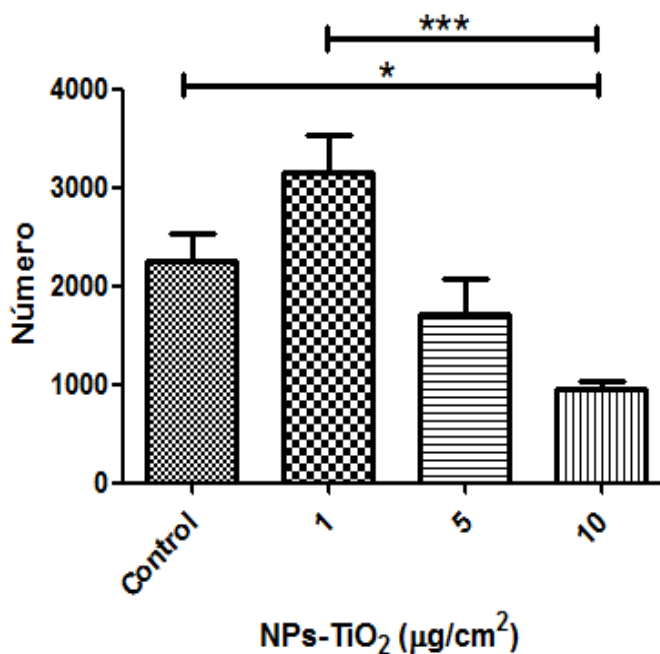


Figura 26. Cuantificación del número de triples uniones de vimentina mediante el software Image J 1.47 m (National Institutes of Health, USA) en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control; n= 6-15.

### Localización de tubulina en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub>

Se obtuvo la localización de los filamentos de tubulina en las células epiteliales de pulmón mediante microscopía confocal y para comprobar la internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> se obtuvieron imágenes de contraste de fases. En las imágenes de contraste de fase se muestra la presencia de NPs-TiO<sub>2</sub> en las células tratadas a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup>) (Fig. 27 A).

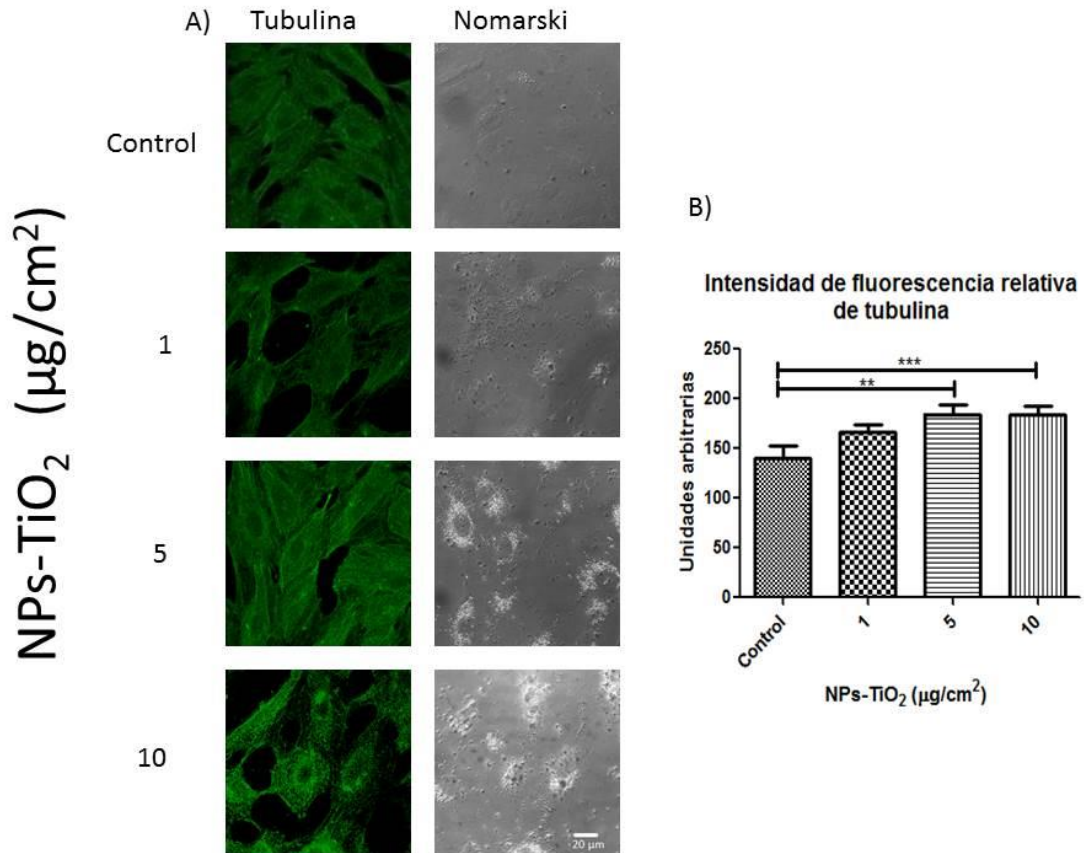


Figura 27. A) Localización de los filamentos de tubulina mediante microscopia confocal láser y contraste de fases (Leica DM IRB TCS SP2) en células de pulmón A549 expuestas a diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Kruskal-Wallis test estadísticamente significativo  $p < 0.05$ , NPs-TiO<sub>2</sub> vs control;  $n = 28-27$ .

Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la intensidad de fluorescencia de tubulina, los porcentajes fueron 31.86 % ( $n = 28$ ) a 5 µg/cm<sup>2</sup> y 31.23 % ( $n = 27$ ) a 10 µg/cm<sup>2</sup> (Fig. 27 B).



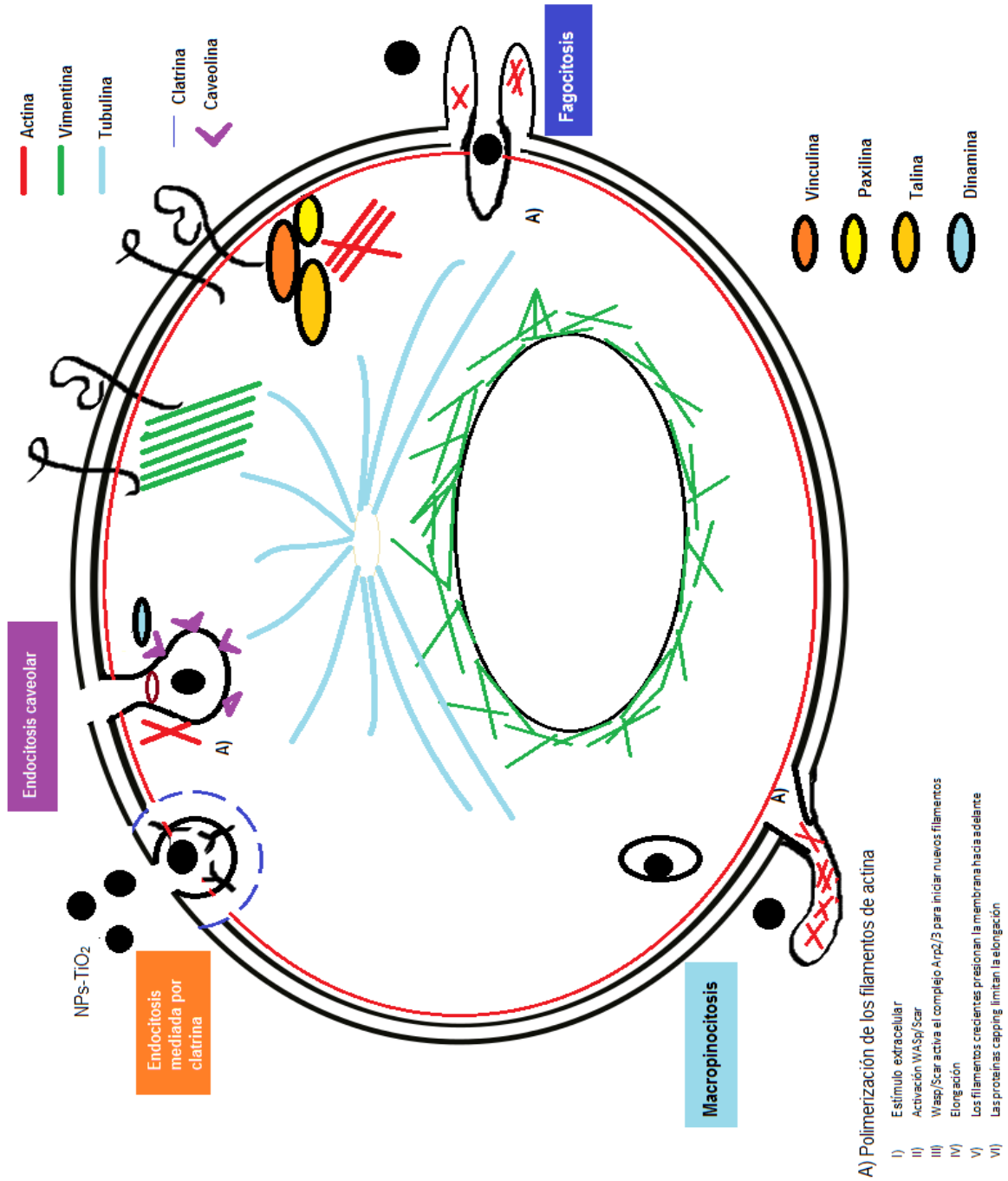


Figura 28. Se esquematiza la localización de los filamentos de actina-F, vimentina y tubulina dentro de la célula.

## 7. Discusión

Actualmente es importante el estudio de los NMs ya que sus aplicaciones crecen de una manera exponencial (Klaine *et al.*, 2012). Según algunas estimaciones, la nanotecnología promete superar ampliamente el impacto de la Revolución Industrial, y se ha proyectado una facturación anual para el año 2015 de más de 1.5 billones de euros (Nel *et al.*, 2006). Sin embargo, aún se desconoce el potencial tóxico de la mayoría de los NMs. Asimismo, muchos de los problemas de salud y seguridad respecto a los NMs se deben a la falta de conocimiento de los niveles de exposición ocupacional durante la producción y uso de los NMs (Elder *et al.*, 2009). Es por ello que diversos estudios sobre la toxicidad de los NMs justifican el criterio de precaución en la evaluación de riesgos de los NMs (Savolainen *et al.*, 2010).

Con el desarrollo de los NMs el dióxido de titanio ha sido ampliamente utilizado en la producción de NPs (NPs-TiO<sub>2</sub>) para diversos productos comerciales (Skocaj *et al.*, 2011). Por ello, los seres humanos están expuestos cada vez más a las NPs-TiO<sub>2</sub> a través de la inhalación, ingestión y contacto dérmico. Debido a su pequeño tamaño, se facilita su captación dentro de la célula (Gheshlaghi *et al.*, 2008) y es posible que las barreras fisiológicas del sistema respiratorio no sean eficaces para proteger el cuerpo de partículas menores a 100 nm de tamaño (Rothen-Rutishauser *et al.*, 2007). La exposición celular a NPs-TiO<sub>2</sub> conduce a su acumulación en forma de vacuolas y fagosomas (Stearns *et al.*, 2001). Dicha acumulación puede llevar a cambios en la forma celular que se asocian al citoesqueleto (Savolainen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013), este último, participa en la regulación de varias funciones a nivel celular por ejemplo: la expresión génica, el transporte proteico, ciclo, movilidad y adhesión celular. Además, es una estructura compleja y dinámica que se reorganiza en respuesta al medio que rodea a la célula (Reyes *et al.*, 2001; Manelli-Oliveira *et al.*, 2001; Akakura y Gelman, 2012).

Investigaciones recientes han mostrado los efectos de las NPs sobre el citoesqueleto: en MTs de cerebro de cabra con NPs de oro (Choudhury *et al.*, 2013), en actina-F y  $\beta$ -tubulina de neuronas de ratón con NPs de plata (Xu *et al.*, 2013), y en actina-F de células A549 por NPs de dióxido de silicio (Okoturo-Evans *et al.*, 2013) entre otros.

En el presente trabajo se amplía la información sobre el efecto de las NPs-TiO<sub>2</sub> en la organización del citoesqueleto en células A549 (neumocitos tipo II). Se pudo observar la internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> principalmente a nivel de citoplasma en las células A549 mediante microscopia de campo claro y microscopia de contraste diferencial Nomarsky

(Fig. 11). Es importante mencionar que la internalización de NPs-TiO<sub>2</sub> puede darse principalmente por endocitosis mediada por clatrina o caveolina (Kuhn *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2011) (Fig. 28). También Panyam *et al.*, en el 2003 sugieren que la internalización de NPs de poli (D, Lactide-co-glicolida) en células vasculares humanas de músculo liso es dependiente de la concentración y tiempo de exposición. Apoyando estos resultados, se sugiere que las NPs-TiO<sub>2</sub> en células A549 provocaron alteraciones en su morfología de una manera dependiente de la concentración después de siete días de exposición.

Cabe mencionar que el mantenimiento de la morfología, migración celular y la interacción con matrices extracelulares está relacionado principalmente con el citoesqueleto de actina ya sea en forma filamentosa (actina-F) o monomérica (actina-G) (Campellone y Welch., 2010; Dominguez y Holmes., 2011; Akakura y Gelman, 2012; Bernier *et al.*, 2012; Head *et al.*, 2013; Rudimov *et al.*, 2015). Por ejemplo, en los espermatozoides de cobayo la concentración relativa de actina-F y actina-G se ve incrementada en los gametos que tuvieron reacción acrosomal para adquirir su habilidad fertilizante (Delgado-Buenrostro *et al.*, 2005). Los resultados en este trabajo mostraron un aumento significativo en la IF de actina-F a las concentraciones de 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> (Fig. 12 B). Se propone que estos cambios pueden deberse a: 1.- cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto por la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> (Ge *et al.*, 2011), 2.- que simultáneamente se están llevando a cabo fenómenos de polimerización y despolimerización. Resaltando técnicamente que la Phalloidina tiene mayor afinidad por la actina-F y menor por la actina-G, por lo tanto, suponemos la valoración de ambas de manera relativa. Con base en las ideas anteriores se puede sugerir que la internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub> a las células A549 está promoviendo cambios en la organización del citoesqueleto.

Para corroborar los cambios dinámicos de ensamble y desensamble en el citoesqueleto de actina que repercuten en la morfología de la célula de una manera cuantitativa, se realizó el análisis digital de imágenes con el que se valoraron parámetros como el área (A), perímetro (P), circularidad (Ci) y diámetro de Feret (Fe) (Fig.13). Nuestros resultados mostraron que el aumento del A, P y Fe, concuerdan con la disminución de la Ci. Esto puede ser debido a las irregularidades de crecimiento de los filamentos de actina en respuesta a las diferentes concentraciones de NPs-TiO<sub>2</sub>. Este efecto también fue observado, así como la formación de agregados anormales en el citoesqueleto de actina de células MC-3T3 (preosteoblastos) tratadas con NPs-TiO<sub>2</sub>, generando alteraciones en la adhesión celular (Bernier *et al.*, 2012).

Sin embargo, aunque se esperaría que hubiese un incremento en la relación de aspecto (AR) de manera inversamente proporcional al aumento de la Ci, los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas (datos no mostrados), esto podría ser un indicativo de que el incremento del P se debe al aumento de la rugosidad del contorno celular. La cual, puede ser cuantificada por la dimensión fractal (Df) del contorno de las células. El valor de la Df ha sido asociado con el incremento de la malignidad de los tejidos como por ejemplo en el cáncer de mama y diferentes tipos de carcinomas (Lee *et al.*, 2014; Jitaree *et al.*, 2015).

Una vez observados los cambios en el contorno celular y el aumento en la IF de las células A549 por efecto de las NPs-TiO<sub>2</sub> se procedió a analizar la estructura del citoesqueleto de actina ya que es muy dinámico y se puede polimerizar o despolimerizar de manera paralela, dependiendo de las necesidades así como de su estado vital de la célula. Un estado alterado en la célula puede promover desarreglos, afectar la adhesión, la morfología, la citocinesis, y la migración de la célula (Akakura y Gelman., 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un incremento en el número y longitud de ramificaciones de actina-F así como el aumento en el número de dobles y triples uniones de las ramificaciones indicando claramente fenómenos de polimerización ocurridos en las células A549. Lo que apoya a explicar el incremento del A, P y Fe.

Por otra parte, el complejo Arp  $\frac{2}{3}$  se ha encontrado en todas las células eucariotas y ha sido localizado en sitios dinámicos de ensamble y desensamble de actina (Weaver *et al.*, 2003; Campellone y Welch., 2010) asimismo promueve la nucleación y organización de redes ramificadas de actina (Campellone y Welch., 2010), el incremento de uniones de actina obtenidas en este trabajo podría estar relacionado con el complejo Arp  $\frac{2}{3}$  lo que se esperaría un incremento de este y otras proteínas relacionadas a actina (profilina, WASP, Scar, JMY, etc.), por lo que es necesaria la valoración de este complejo y otras proteínas en estudios posteriores.

En células BEAS-2B mediante estudios de proteómica se encontraron cambios en la expresión de las proteínas que conforman el citoesqueleto (MF, FIs y MT), proponen que la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> origina la reorganización del citoesqueleto y cambios en la morfología celular (Ge *et al.*, 2011). Además, en células epiteliales de pulmón A549 identificaron cambios en la expresión de 15 proteínas relacionadas en la regulación y la reorganización estructural del citoesqueleto de actina (Okoturo-Evans *et al.*, 2013). También, mediante estudios de microscopia confocal Chan *et al.*, 2011 analizaron células

inmortalizadas de queratinocitos utilizando NPs-TiO<sub>2</sub> de anatasa 25 nm, encontrando modificaciones en el citoesqueleto de actina-F por medio de la retracción celular y reducción en el número de las fibras de estrés cerca de las NPs-TiO<sub>2</sub> internalizadas. En el presente trabajo la longitud máxima de los filamentos (filamento principal) disminuyó de manera significativa a 1 µg/cm<sup>2</sup> lo cual podría deberse a fenómenos de despolimerización ocasionados por: a) La disminución de la cantidad de ATP debido a que las mitocondrias se ven alteradas al hacer contacto con NPs-TiO<sub>2</sub> (Freyre-Fonseca *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2013). b) la acción del complejo despolimerizador ADF/cofilina que tiene una gran afinidad por los nucleótidos ADP que se encuentran en actina-F (Domínguez y Holmes., 2011). Con base en los resultados obtenidos se sugiere valorar de manera cuantitativa la expresión de ADF/Cofilina como un marcador para fenómenos de despolimerización.

Cabe mencionar que aunque la producción de ATP podría estar limitada por daños en la mitocondria, los análisis mostraron aumento en el número de ramificaciones sobre el tronco principal. Por consiguiente, estos resultados permiten dilucidar que la célula utiliza medios alternativos para producir energía, por ejemplo: el efecto Warburg describe un fenómeno en el cual las células cancerosas metabolizan la glucosa mediante la glucólisis aeróbica, a pesar de la presencia de oxígeno generando lactato como producto final (Courtney *et al.*, 2015).

Con base en lo mencionado anteriormente se puede sugerir que la respuesta de actina-F a la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> podría estarse dando por alguno de los siguientes eventos (Fig. 29):

- 1.- Las ramificaciones de actina generadas y la despolimerización del filamento principal dentro de la célula podrían ser eventos independientes.
- 2.- El filamento principal de actina-F se despolimeriza y de manera simultánea se promueven sitios de nucleación con el complejo Arp 2/3 para la generación de nuevas ramificaciones en el filamento principal.

Este último es el que mejor explicaría los resultados obtenidos ya que el filamento principal de actina-F en las células A549 tratadas con NPs-TiO<sub>2</sub> disminuye su longitud por despolimerización. Además, cuando la actina-G es liberada, las proteínas secuestradoras como la profilina y la β timosina promueven un cambio conformacional en la actina-G formando un complejo transportador (Profilina/actina-G; β timosina-actina-G) hacia sitios

de nucleación, generando así nuevas ramificaciones en el tronco principal, esto se corrobora con el aumento en el número de uniones y triples uniones de actina.

En resumen se observó que a la concentración de  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  existe una mayor respuesta celular en cuanto a los descriptores de la morfología celular de las células epiteliales A549 (A, P, Fe y Ci) así como cambios en los parámetros evaluados del citoesqueleto de actina (número y longitud de las ramificaciones, longitud del filamento principal, número de uniones y triples uniones) debido a que la entrada de NPs-TiO<sub>2</sub> es muy poca comparada con las concentraciones de 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y esto permite que la célula luche para buscar su estabilidad homeostática. Sin embargo las concentraciones de 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  aportan otras sugerencias (Cuadro 1).

En las concentraciones de 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NPs-TiO<sub>2</sub> en células A549 que son altas comparadas con la de  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , podría generarse una respuesta de tipo adaptativa para tratar de prevenir el daño por la exposición a los 7 días. Como lo sugiere Medina-Reyes *et al.*, 2015 una respuesta inflamatoria de tipo adaptativa en células epiteliales A549 por efecto de las NPs-TiO<sub>2</sub>. Cabe mencionar, que en un estudio realizado por Xu *et al.*, 2013 encontraron que la exposición de NPs de plata a la concentración de  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  en células neuronales generó una disminución en el número de ramificaciones neuronales. Sin embargo, a la concentración de 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  con NPs de plata se generó la agregación de cuerpos celulares. Así mismo, otras investigaciones han mostrado que diversos tipos de NPs como las A-PS y UP-S tienden a interactuar con especies circundantes como las proteínas que componen la sustancia surfactante secretada por las células A549, pudiendo alterar su conformación, agregación o generar la pérdida de su función (Zhang *et al.*, 2008; Choudhury *et al.*, 2013; McKenzie *et al.*, 2015). En este estudio las células A549 mostraron disminución en el número de las ramificaciones, así como en la longitud de sus ramas y la longitud del filamento principal a las concentraciones de 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  comparados con el de  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , estos resultados permiten sugerir la formación de agregados de actina-G con NPs-TiO<sub>2</sub> los cuales podrían ser evaluados por espectroscopía, Raman o TEM (Márquez-Ramírez *et al.*, 2012; Choudhury *et al.*, 2013; Bogliolo *et al.*, 2014), para futuras investigaciones.

Cabe mencionar, que en las concentraciones de 5 y  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  la internalización y acumulación de NPs-TiO<sub>2</sub> es mayor dentro de la célula (Fig. 11), no obstante en un sistema in vivo se están llevando procesos de exocitosis continuamente (Panyam *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2013; Oh y Park., 2014). Por añadidura, el proceso de exocitosis

requiere la participación de actina, cuanto mayor sea la cantidad de NPs-TiO<sub>2</sub> que se tenga que expulsar, mayor será la actividad dinámica (polimerización y despolimerización) de actina en tal proceso (Oh y Park., 2014). Dicha información apoya los resultados obtenidos para las concentraciones de 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> en el presente trabajo.

Otra sugerencia, es que la mayor acumulación de NPs-TiO<sub>2</sub> a las concentraciones 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> podría generar que la célula no lleve a cabo de manera normal su proceso de división y esto conlleve un incremento en la expresión de diversas proteínas como por ejemplo la actina-G. Dicha propuesta apoya el incremento en la IF relativa de actina obtenida en nuestros resultados.

Investigaciones recientes con NPs de silicio en células A549 en períodos cortos de exposición 5h han encontrado cambios evidentes sobre la estructura del citoesqueleto. (Nowak *et al.*, 2014), Sin embargo, es importante mencionar que en la actividad laboral cotidiana de producción de NPs, los trabajadores se encuentran expuestos a las NPs-TiO<sub>2</sub> por tiempos prolongados. Dicha información, justifica la exposición de NPs-TiO<sub>2</sub> en células A549 durante 7 días, ya que supone un tiempo prolongado de exposición. Sin embargo, los cambios a nivel de citoesqueleto no son tan evidentes como se menciona en las referencias anteriores, ya que la célula tiene mecanismos para conservar su funcionalidad y equilibrio interno homeostático por un período de tiempo determinado. Desafortunadamente si la célula está en constante estrés por el mismo factor no puede sostener este equilibrio y tenderá a perder poco a poco su funcionalidad, generando cambios en la morfología, aumento o disminución en la expresión de proteínas, alteración en señales de transducción, etc. que la caracterizan como célula especializada (Alberts *et al.*, 2010). Los resultados mostrados en esta investigación, donde hay cambios evidentes cuantificables sobre la estructura del citoesqueleto de actina ayudan a corroborar que la célula posee mecanismos para conservar su funcionalidad y equilibrio interno homeostático por un período determinado.

Por otro lado, otro de los elementos importantes en el estudio del citoesqueleto son los FIs que son clasificados en seis grupos dependiendo del tipo de proteína que los conforme (I, II, III, IV, V y VI). Le brindan a la célula un soporte estructural y resistencia al estrés mecánico. En este estudio se utilizó la vimentina que pertenece al grupo III. Se observó un aumento significativo en la IF relativa de vimentina en las células A549 de manera dependiente de la concentración de NPs-TiO<sub>2</sub> (Fig. 23). Cabe mencionar, que diversos estudios han mostrado diferentes patrones de expresión de la vimentina en

forma dinámica durante las etapas de desarrollo en los vertebrados, así como una gran homología en su secuencia (Ivaska *et al.*, 2007). Se expresa predominantemente en el citoplasma en células de origen mesenquimal. Además, otras investigaciones han mostrado que en algunos cánceres epiteliales durante la transición epitelio-mesenquimal (EMT) se ve incrementada la expresión de vimentina (Kokkinos *et al.*, 2007; Kalluri y Weinberg *et al.*, 2009; Lahat *et al.*, 2010). También es considerada como una molécula pro-migratoria muy expresada durante la transformación celular, asimismo es usada como un marcador en el desarrollo de las células y tejidos que se relaciona con un potencial metastásico (Manelli-Oliveira *et al.*, 2001; Ivaska *et al.*, 2007). Dicha información apoya los resultados. Sin embargo, los parámetros cuantificados para vimentina (longitud de ramificaciones, número de uniones y triples uniones) mostraron una disminución significativa únicamente a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  lo cual sugiere que dentro de la célula están ocurriendo fenómenos de desensamble de los filamentos de vimentina cuya dinámica es regulada mediante procesos de fosforilación, promoviendo la organización y distribución subcelular de las redes (Ivaska *et al.*, 2007). Los cambios en la organización de estos filamentos pueden afectar la adhesión celular, la interacción célula-célula, la motilidad, la contracción, la migración, la proliferación, la expresión génica, la apoptosis, el transporte endolisosomal de vesículas y la transducción de señales (Goldman *et al.*, 1996; Hall., 1997; Styers *et al.*, 2005; Ivaska *et al.*, 2007; Steinmetz *et al.*, 2011). Así mismo, se sabe que durante la mitosis los FIs se desensamblan de manera completa o parcial para después volverse a ensamblar en las células hijas (Yoon *et al.*, 1998).

Es conocido que los elementos del citoesqueleto (microfilamentos, microtúbulos y FIs) pueden interactuar entre sí de distintas maneras, modificando la organización del mismo (Ivaska *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2014). Se ha observado que la red de vimentina tiene una organización radial, se extiende desde el centro de la célula hacia afuera la cual se sobrepone parcialmente a la red de microtúbulos (Clarke y Allan., 2002). Se han encontrado diversas estructuras de vimentina moviéndose a lo largo de los microtúbulos a través de la acción de las cinecinas (Clarke y Allan., 2002; Robert *et al.*, 2014). Los microtúbulos y los microfilamentos afectan la distribución de los filamentos de vimentina. Por ejemplo la despolimerización de los MTs ocasiona la reorganización de la red de filamentos de vimentina pasando de una manera extendida a una comprimida en la región perinuclear. Además, el citoesqueleto de actina es necesario para la reorganización de los filamentos de vimentina después de la despolimerización de los MTs (Robert *et al.*, 2014).



Finalmente, otro de los filamentos evaluados en este estudio fueron los MTs mostrando un incremento significativo en la IF relativa a las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Los resultados proponen cambios en la dinámica de los MTs ya que diversas investigaciones muestran que las NPs tienden a interactuar con las especies circundantes para reducir su energía y si se encuentran proteínas cercanas la interacción con las NPs puede alterar su conformación, agregación o perderse su función (Choudhury *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2008 ). Las NPs de oro forman agregados con dímeros de tubulina (Choudhury *et al.*, 2013). Las NPs-TiO<sub>2</sub>, inhiben la polimerización mediante la alteración de la posición de los residuos de triptófano en los microtúbulos (Gheshlaghi *et al.*, 2008). De igual forma las NPs-TiO<sub>2</sub> promovieron un desarreglo de los MTs dispersándose en regiones indefinidas de la célula (Chan *et al.*, 2011). En conclusión el deterioro de los elementos que componen el citoesqueleto conduce a una morfología anormal de las células y pueden suponer un reto para su supervivencia (Singh *et al.*, 2008).

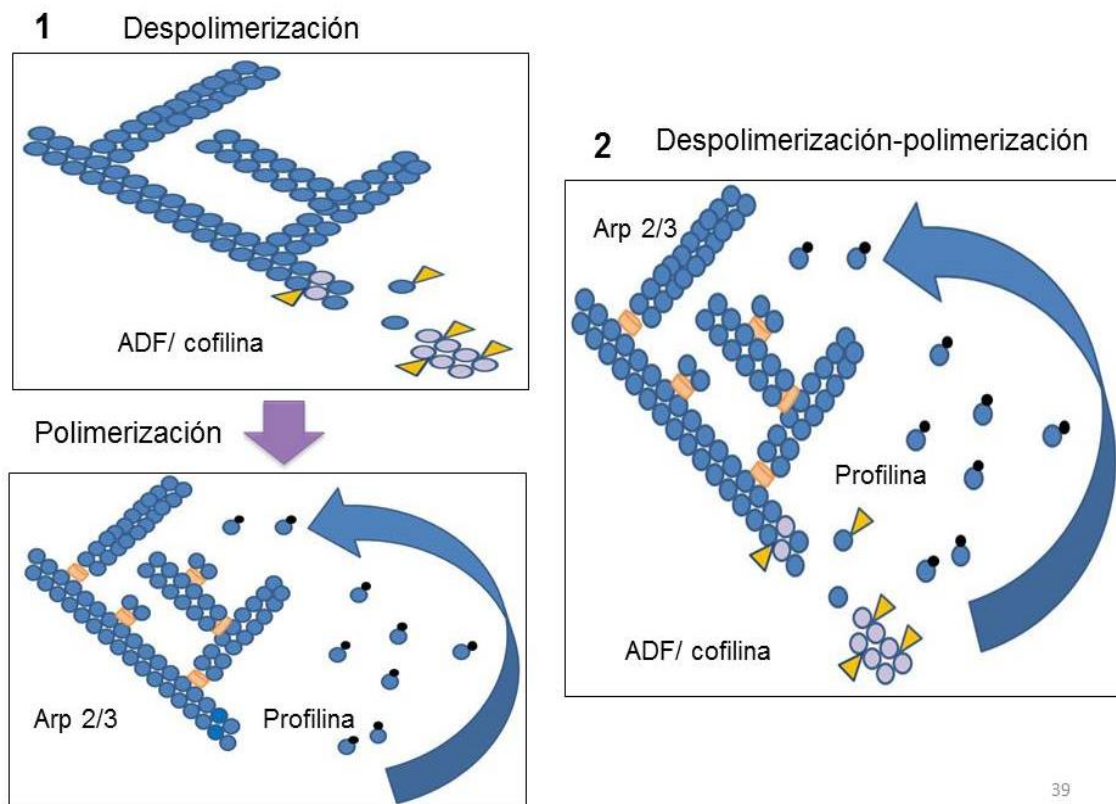


Figura 29. Se esquematiza los modelos de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina-F expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub>.

Parámetros	Actina			Vimentina		
	1	5	10	1	5	10
Área	+	+	+			
Perímetro	+	+	+			
Circularidad	-	0	0			
Diámetro de Feret	+	+	+			
Relación de Aspecto	0	0	0			
Número de ramificaciones	+	+	+	+	0	-
Longitud de ramificaciones	+	+	0	0	0	-
Longitud máxima de ramificaciones	+	0	0	0	0	0
Número de uniones	+	+	+	+	0	-
Número de triples uniones	+	+	+	+	0	-
Número de puntas finales	0	0	0	0	0	0

Cuadro 1. Se muestran los cambios observados en los parámetros evaluados de los filamentos del citoesqueleto. El incremento está representado por el símbolo + y la disminución por el símbolo - .

## 8. Conclusiones

- La exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> indujo incremento en la IF de actina-F, tubulina a las concentraciones de 5 y 10 µg/cm<sup>2</sup> y para vimentina de una manera dependiente de la concentración.
- Las mayores diferencias en los parámetros de morfología celular por efecto de las NPs-TiO<sub>2</sub> se observaron con 1 µg/cm<sup>2</sup>, incrementando el A 252.73% el P 167.06 % y el Fe 97.07 %; y disminuyendo la Ci 49.55 %.
- La exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> incrementó el número y longitud de las ramificaciones, el número de uniones y las triples uniones de la actina, lo cual indica fenómenos de polimerización. Mientras que la disminución de la longitud de los filamentos principales es indicativo de fenómenos de despolimerización.
- La disminución de la longitud de las ramificaciones, del número de uniones y de triples uniones de vimentina indica fenómenos de despolimerización. Además, existe una posible relación entre estos cambios y los existentes en la dinámica de los microtúbulos tras la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub>.

## 9. Perspectivas

- Medir la expresión de las proteínas asociadas al citoesqueleto de actina (Arp 2/3, profilina, ADF/cofilina).
- Medir la formación de agregados de las NPs-TiO<sub>2</sub> con los filamentos de actina.

## 10. Importancia de este trabajo

Con este trabajo se aporta información para entender cómo es que la internalización de las NPs-TiO<sub>2</sub> modifica la forma exterior y la organización interior de las células, generando cambios en el funcionamiento de las proteínas asociadas al citoesqueleto, lo cual puede ocasionar alteraciones en el funcionamiento de los órganos en los cuales se acumulen las NPs-TiO<sub>2</sub>, asimismo dicha acumulación puede exacerbar los efectos de las enfermedades ya existentes.

## 11. Anexo

- a) Proceso para la obtención del número y tamaño de ramificaciones de actina-F y vimentina

Las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal se abrieron en formato JPG y se convirtieron a RGB Stack mediante el software Image J 1.47 m.

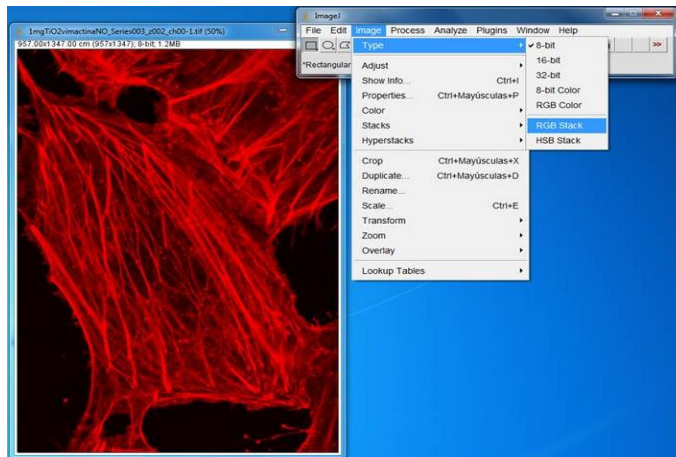


Figura 8. Selección del tipo de imagen en el menú del software Image J 1.47 m.

Posteriormente se seleccionó “Process” y se utilizó el comando “Subtract Background”, con 50.0% de saturación de píxeles, para separar los filamentos del resto de la imagen.

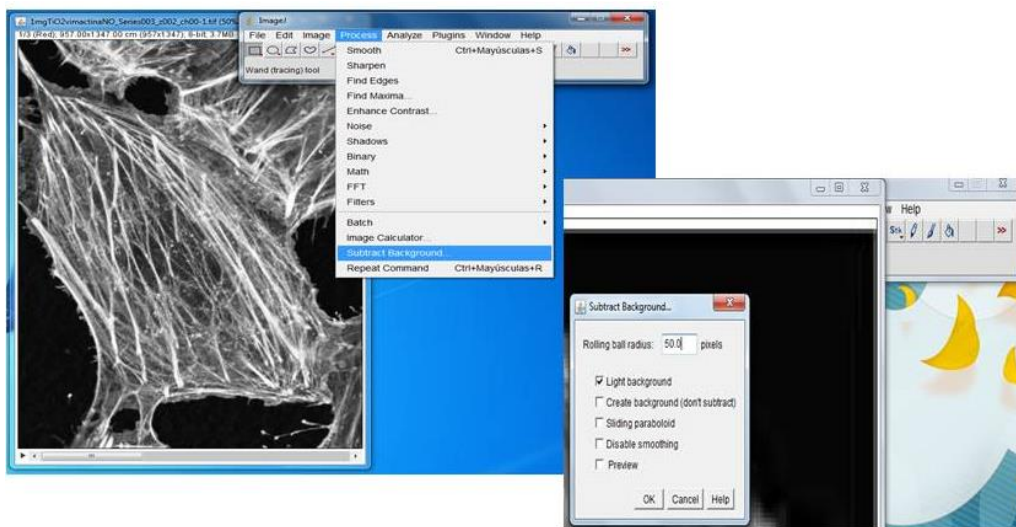


Figura 9. Separación de los filamentos del resto de la imagen mediante el comando “Subtract Background”.

A continuación se utiliza el comando “Enhance contrast” al 0.4% normalizado con el cual se ajusta el brillo y se aumenta el contraste de los filamentos.

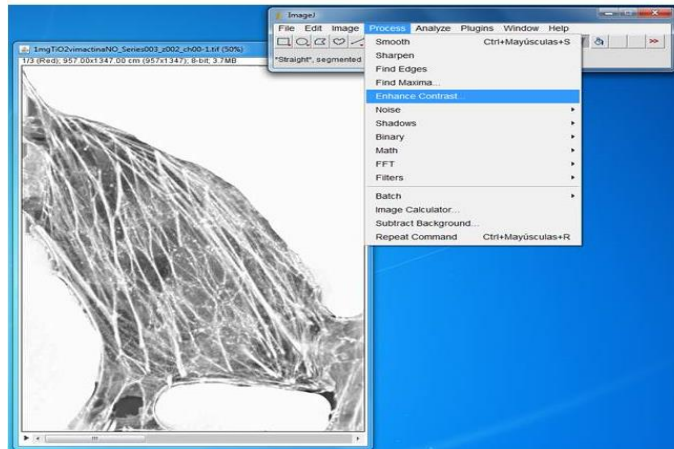


Figura 10. Aumento del contraste de la imagen mediante el comando “Enhance contrast”.

También se utilizó el comando “Filters” y se seleccionó el filtro “convolve” para filtrar los píxeles en la imagen que no pertenecían a los filamentos.

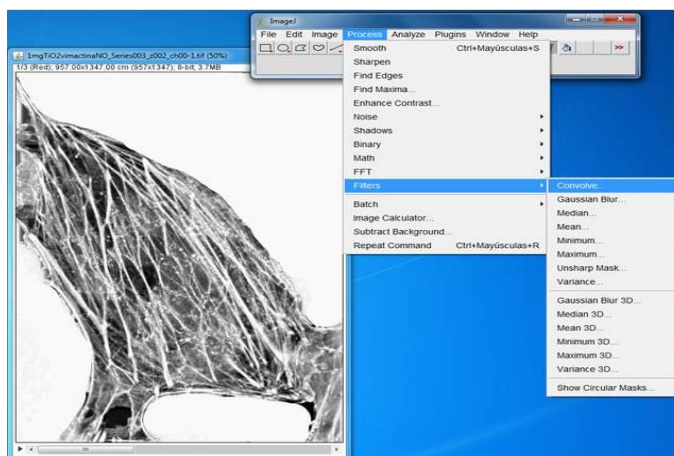


Figura 11. Se muestra la selección del comando para filtrar los píxeles de la imagen.

Dentro de la lista de comandos de "Plugins" se seleccionó el comando "Skeleton" y el sub-comando "Skeletonize", para obtener una imagen eskeletonizada.

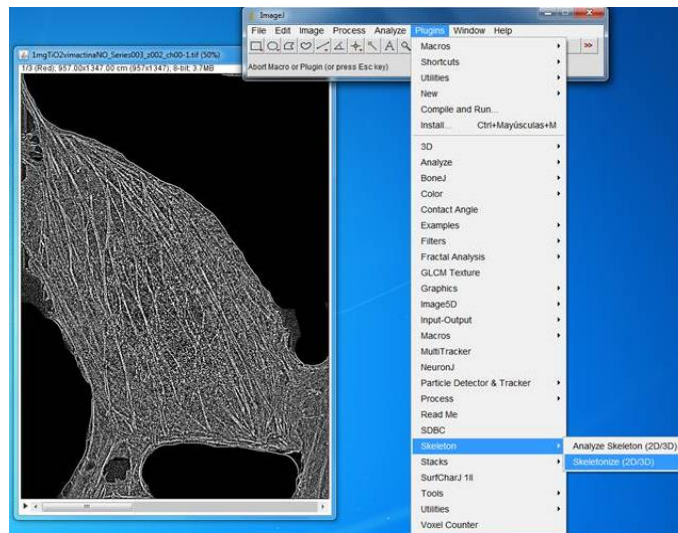


Figura 12. Se muestra la selección del comando para eskeletonizar una imagen.

Finalmente se seleccionó el comando "Skeleton" y el sub-comando "Analyze Skeleton" para la cuantificación del número y longitud de las ramificaciones.

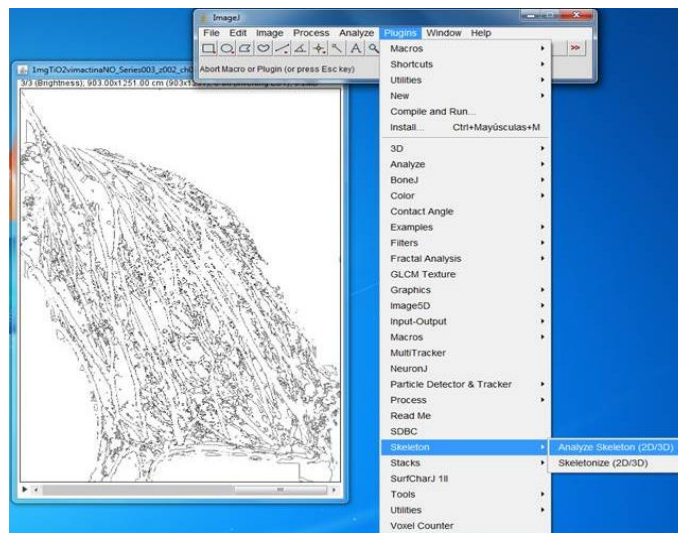


Figura 13. Cuantificación del número y longitud de las ramificaciones mediante el comando "Analyze Skeleton".



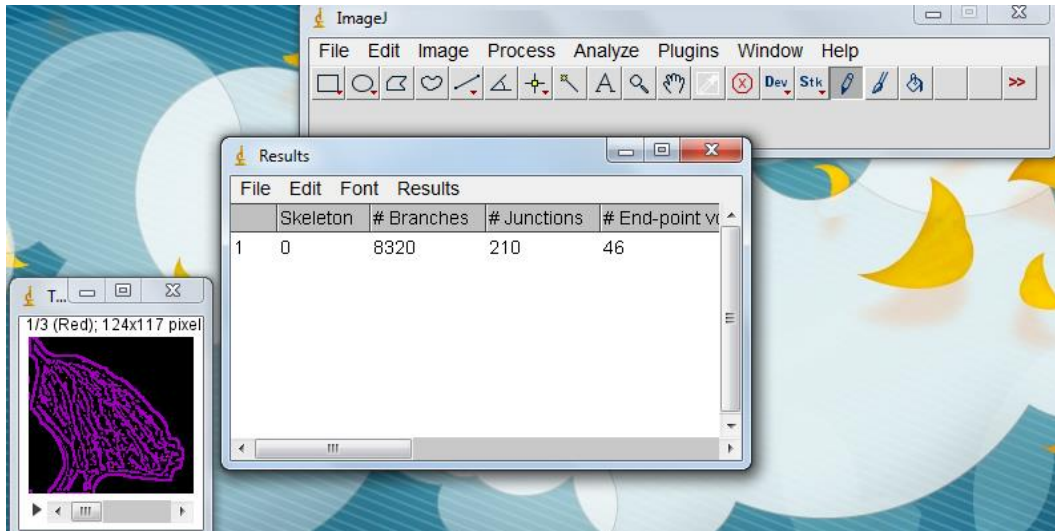


Figura 14. Se muestra la ventana de resultados generada por el software image J 1.47 m.

- b) Proceso para obtener las mediciones de circularidad, área y AR para actina-F, vimentina y tubulina.

Primero se reguló el brillo y el contraste de la imagen obtenida por microscopia confocal mediante la lista de comandos de “Image” se utilizó el comando “Brightness/Contrast” en modo “Auto”.

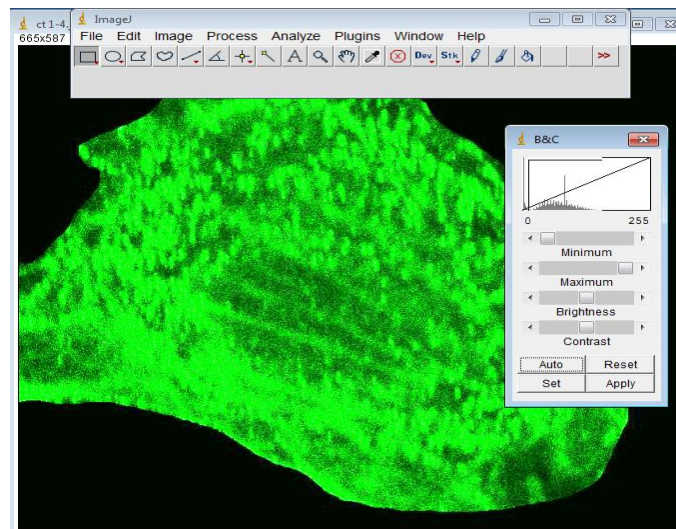


Figura 15. Se muestra la imagen modificada por el comando “Brightness/Contrast”

Dentro de la lista de comandos de “Image” se seleccionó el comando “Adjust” y el subcomando “Treshold” para seleccionar el umbral de color de la imagen.

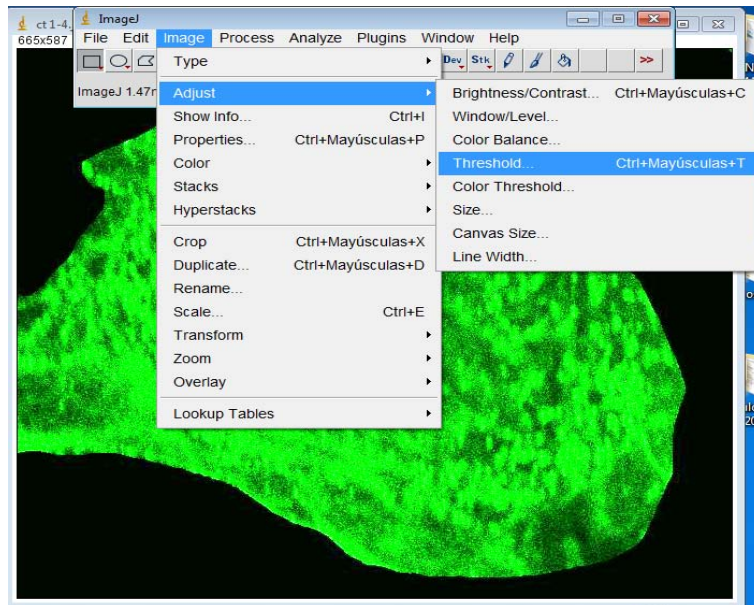


Figura 16. Selección del área de la célula mediante el comando “Treshold”.

A continuación se utilizó el subcomando “Treshold Color” para modificar el umbral de colores utilizado y así seleccionar las características de interés separándolas del fondo.

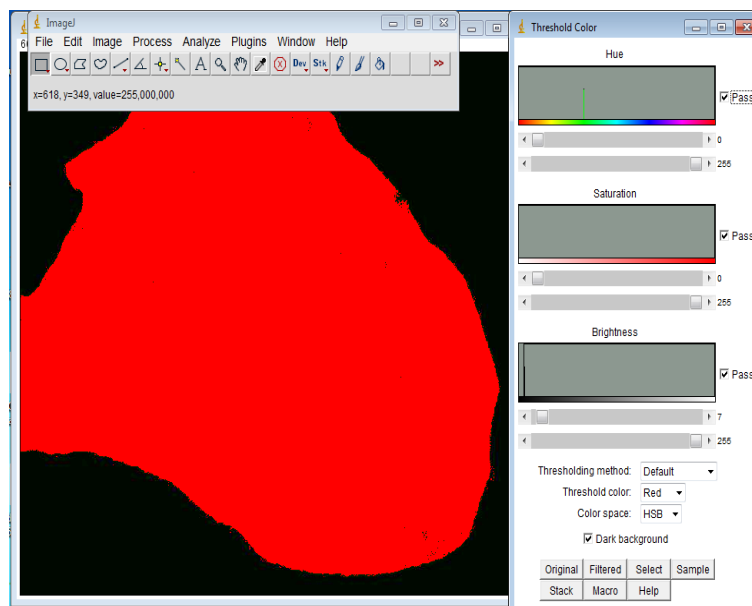


Figura 17. Modificación del umbral de colores



Después mediante la lista de comandos de “Process”, se seleccionó “Binary” y el sub comando “Make Binary” para transformar la imagen a blanco y negro de 8-bits.

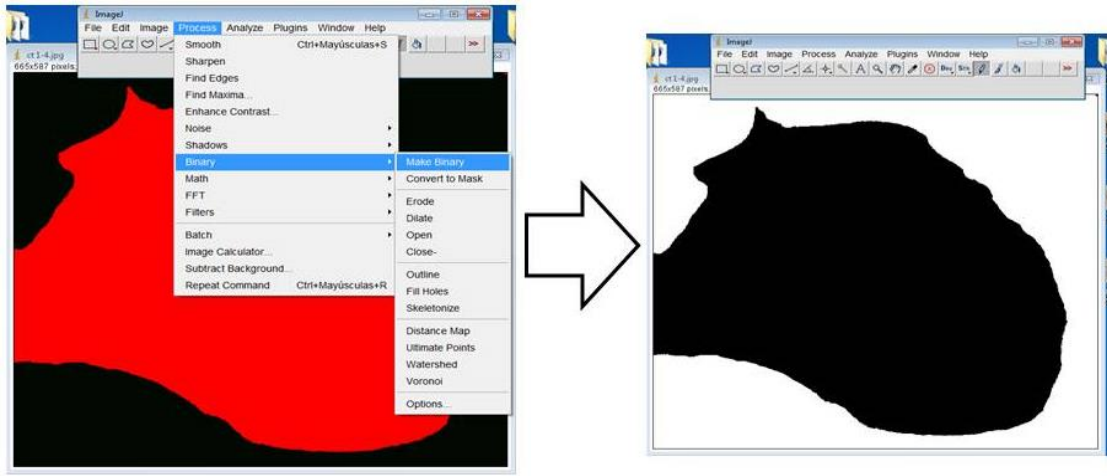


Figura 18. Transformación de la imagen seleccionada con treshold a una imagen binaria.

Para la medición de los parámetros de análisis de imágenes se consideró una escala de 20  $\mu\text{m}$  la cual se seleccionó mediante la lista de comandos de “Analyze” se utilizó el subcomando “Set Scale” y se seleccionó “Global”.

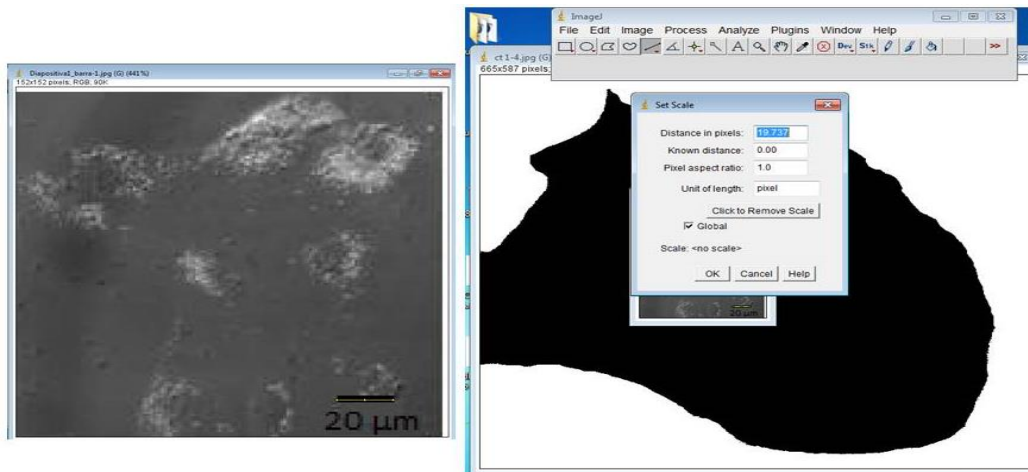


Figura 19. Selección de la escala para la medición de circularidad, área y AR

Se seleccionaron los parámetros “Área, Min & max gray value, Shape descriptors, Mean gray value y Perimeter” utilizando el subcomando “Set measurements” dentro de la lista de comandos de “Analyze”.

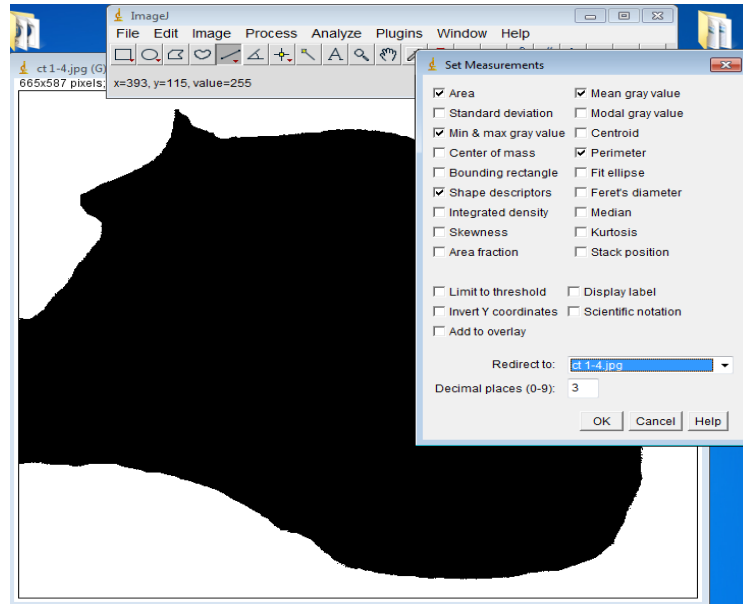


Figura 20. Lista de parámetros utilizados.

Análisis de Partículas: Este comando realiza conteo y medidas en imágenes binarias o threshold.

Finalmente dentro de la lista de comandos de “Analyze” se utilizó el sub comando “Analyze Particles” se seleccionó mostrar “Outlines”, “Display results”, “Summarize” e “In situ Show”

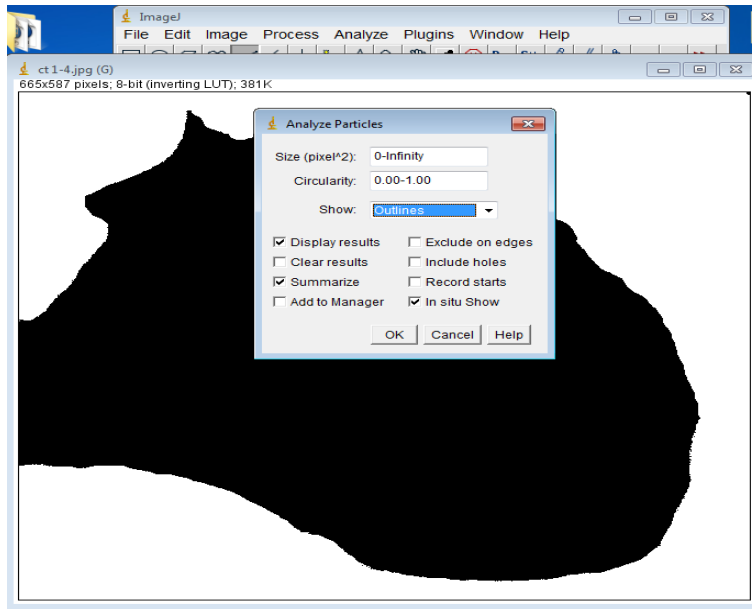


Figura 21. Análisis de las células mediante el comando “Analyze Particles”.

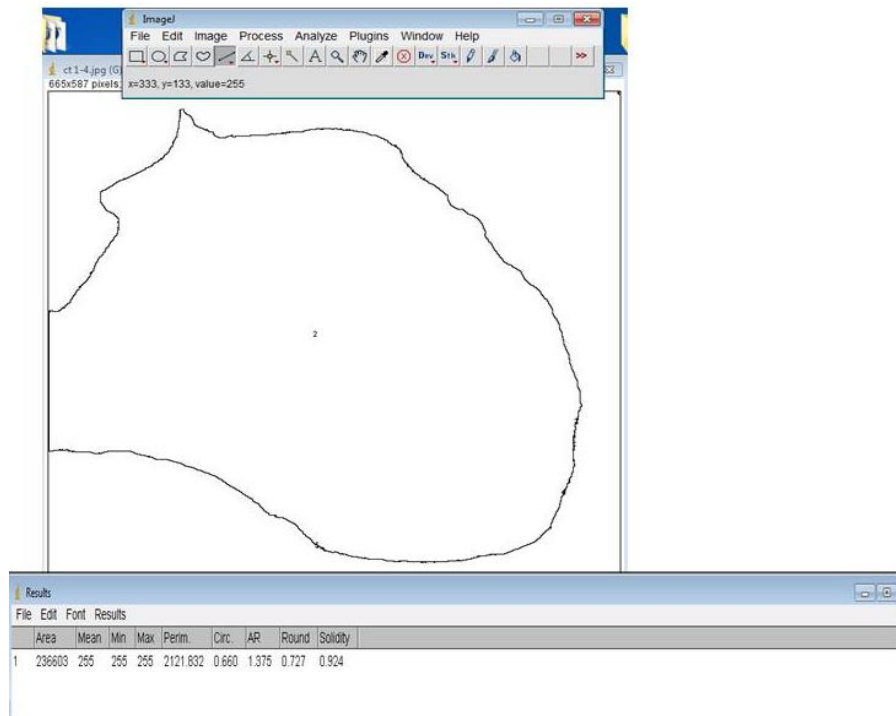


Figura 22. Se muestra el contorno de la célula analizada y los resultados obtenidos.

## 12. Referencias

- Abdelhalim M. 2011 Exposure to gold nanoparticles produces cardiac tissue damage that depends on the size and duration of exposure. *Lipids Health Dis.* 10:205.
- Ahmad J, Dwivedi S, Alarifi S, Al-Khedhairi A, Musarrat J. 2012. Use of  $\beta$ -galactosidase (lacZ) gene  $\alpha$ -complementation as a novel approach for assessment of titanium oxide nanoparticles induced mutagenesis. *Mutat Res.* 747(2):246-252.
- Akakura S, Gelman I. 2012. Pivotal Role of AKAP12 in the Regulation of Cellular Adhesion Dynamics: Control of Cytoskeletal Architecture, Cell Migration, and Mitogenic Signaling. *J Signal Transduct.* 529179.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J. 2002. Biología molecular de la célula; La estructura de auto-ensamblaje y dinámico Citoesqueleto Filamentos. Nueva York. *Garland Science.* 4<sup>a</sup> edición. 1345 pp.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J Raff M, Roberts K. 2010. Biología molecular de la célula. Omega. 5<sup>a</sup> edición. 1711pp.
- Baan R: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2010. 93:193-214.
- Baisch BL, Corson NM, Wade-Mercer P, Gelein R, Kennell AJ, Oberdörster G, Elder A. 2014. Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. *Part Fibre Toxicol.* 11:5.
- Bernier M, Besse M, Vayssade M, Morandat S, El Kirat K. 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles Disturb the Fibronectin-Mediated Adhesion and Spreading of Pre-osteoblastic Cells. *Langmuir.* 28 (38):13660-13667.
- Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins RP, Hoffmann E, Dopp E. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol.* 6:17.
- Bogliolo L, Murrone O, Piccinini M, Ariu F, Ledda S, Tilocca S, Albertini DF. 2014. Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine

oocytes by means of Raman microspectroscopy. *J Assist Reprod Genet.* DOI 10.1007/s10815-014-0389-7.

Bowne-Anderson H, Zanic M, Kauer M, Howard J. 2013. Microtubule dynamic instability: a new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *Bioessays.* 35(5):452-461.

Campellone K, Welch M. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(4):237-251.

Caudron N, Valiron O, Usson Y, Valiron P, Job D. 2000. A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in vitro. *J Mol Biol.* 17;297(1):211-220.

Chan J, Ying T, Guang YF, Lin LX, Kai T, Fang ZY, Ting YX, Xing LF, Ji YY. 2011. *In vitro* toxicity evaluation of 25-nm anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles in immortalized keratinocyte cells. *Biol Trace Elem Res.* 144(1-3):183-196.

Chi X, Wang S, Huang Y, Stamnes M, Chen JL. 2013. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int J Mol Sci.* 14(4):7089-70108.

Choudhury D, Xavier PL, Chaudhari K, John R, Dasgupta AK, Pradeep T, Chakrabarti G. 2013. Unprecedented inhibition of tubulin polymerization directed by gold nanoparticles inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Nanoscale.* 21;5(10):4476-4489.

Clarke E, Allan V. 2002. Intermediate filaments: vimentin moves in. *Curr Biol.* 12(17):R596-8.

Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. 2015. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep.* DOI 10.1007/s11033-015-3858-x.

Cui Y, Liu H, Ze Y, Zengli Z, Hu Y, Cheng Z, Cheng J, Hu R, Gao G, Wang L, Tang M, Hong F. 2012 . Gene Expression in Liver Injury Caused by Long-term Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles in Mice. *Toxicol Sci.* 128(1):171-185.

Delgado-Buenrostro NL, Hernández-González EO, Segura-Nieto M, Mújica A. 2005. Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol Reprod Dev.* 70(2):198-210.

Dominguez R, Holmes K. 2011. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.* 40:169-186.

dos Santos T, Varela J, Lynch I, Salvati A, Dawson KA. 2011. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PLoS One.* 6(9):e24438.

Elder A, Lynch I, Grieger K, Chan-Remillard S, Gatti A, Gnewuch H. 2009. Human health risks of engineered nanomaterials: critical knowledge gaps in nanomaterials risk assessment. In: Linkov, I., Steevens, J. (Eds.), *Nanomaterials: Risks and Benefits.* Springer, Dordrecht, pp. 3–29.

Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Härmälä-Braskén AS, Hellman J, Chou YH, Goldman RD. 2004. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci.* 117(Pt 6):919-932.

EU - European Commission Recommendation on the definition of nanomaterial. <http://osha.europa.eu/en/news/eu-european-commissionrecommendation-on-the-definition-of-nanomaterial>.

Foster KA, Yazdanian M, Audus KL. 2001. Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium. *J Pharm Pharmacol.* 53(1):57-66.

Freshney, R. I. 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6<sup>th</sup> ed. *Wiley-Blackwell.* EUA. 718p.

Ge Y, Bruno M, Wallace K, Winnik W, Prasad RY. 2011. Proteome profiling reveals potential toxicity and detoxification pathways following exposure of BEAS-2B cells to engineered nanoparticle titanium dioxide. *Proteomics.* (12):2406-2422.

Gheshlaghi Z, Riazi G, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R. 2008. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 40(9):777-782.

Goldman R, Khuon S, Chou Y, Opal P, Steinert PM. 1996. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol.* 134(4):971-983.

- Gomaa I, Kader M, Salah T, Heikal O. 2013. Evaluation of in vitro mutagenicity and genotoxicity of magnetite nanoparticles. *Drug Discov Ther.* 7(3):116-123.
- Hall P. 1997. The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells. *Steroids.*62(1):185-189.
- Head BP, Patel HH, Insel PA. 2013. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function: Membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1838(2):532-545.
- Helfand B, Chang L, Goldman R. 2004. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci.* 117(Pt 2):133-141.
- Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res.* 313(10):2050-2062.
- Jaeger A, Weiss DG, Jonas L, Kriehuber R. 2012. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology.* 296(1-3):27-36.
- Jitaree S, Phinyomark A, Boonyaphiphat P, Phukpattaranont P. 2015. Cell type classifiers for breast cancer microscopic images based on fractal dimension texture analysis of image color layers. *Scanning.* 9999:1-7.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119(6):1420-1428.
- Klaine S, Koelmans A, Horne N, Carley S, Handy R, Kapustka L, Nowack B, von der Kammer F. 2012. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environ Toxicol Chem.* 31(1):3-14.
- Kokkinos M, Wafai R, Wong M, Newgreen D, Thompson E, Waltham M. 2007. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs.* 185(1-3):191-203.
- Kuhn D, Vanhecke D, Michen B, Blank F, Gehr P, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. 2014. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein J Nanotechnol.* 24; 5:1625-1636.

- Lagopati N, Tsilibary EP, Falaras P, Papazafiri P, Pavlatou EA, Kotsopoulou E, Kitsiou P. 2014. Effect of nanostructured TiO<sub>2</sub> crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *Int J Nanomedicine*. 9:3219-3230.
- Lahat G, Zhu Q, Huang K, Wang S, Bolshakov S, Liu J, Torres K, Langley R, Lazar A, Hung M, Lev D. 2010. Vimentin is a novel anti-cancer therapeutic target; insights from in vitro and in vivo mice xenograft studies. *PLoS One*. 16;5(4):e10105.
- Lee L, Tambasco M, Otsuka S, Wright A, Klimowicz A, Petrillo S, Morris D, Magliocco A, Bebb DG. 2014. Digital differentiation of non-small cell carcinomas of the lung by the fractal dimension of their epithelial architecture. *Micron*. 67:125-131.
- Li B, Ze Y, Sun Q, Zhang T, Sang X, Cui Y, Wang X, Gui S, Tan D, Zhu M, Zhao X, Sheng L, Wang L, Hong F, Tang M. 2013. Molecular mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced pulmonary injury in mice. *PLoS One*. 8(2):e55563.
- Márquez-Ramírez SG, Delgado-Buenrostro NL, Chirino YI, Iglesias GG, López-Marure R. 2012. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology*. 302(2-3):146-156.
- Manelli-Oliveira R, Machado-Santelli GM. 2001. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. *Histochem Cell Biol*. 115(5):403-411.
- McKenzie Z, Kendall M, Mackay R, Tetley T, Morgan C, Griffiths M, Clark H, Madsen J. 2015. Nanoparticles modulate surfactant protein A and D mediated protection against influenza A infection in vitro. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 370(1661):20140049.
- Medina-Reyes EI, Déciga-Alcaraz A, Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro NL, Flores-Flores JO, Gutiérrez-López GF, Sánchez-Pérez Y, García-Cuéllar CM, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. 2015. Titanium dioxide nanoparticles induce an adaptive inflammatory response and invasion and proliferation of lung epithelial cells in chorioallantoic membrane. *Environ Res*. 136:424-434.
- Millard T, Sharp S, Machesky L. 2004. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J*. 15;380(Pt 1):1-17.



Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K. 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med.* 64(9):609-615.

Moon C, Park H, Choi Y, Park E, Castranova V, Kang J. 2010. Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide. *J Toxicol Environ Health A.* 73(5): 396-409.

Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 311(5761):622-627.

Niska K, Pyszka K, Tukaj C, Wozniak M, Radomski M, Inkielewicz-Stepniak I. 2015. Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter the antioxidant system in human osteoblast cells. *Int J Nanomedicine.* 4; 10: 1095-107.

NSTC. In: Council NSaT, editor. National nanotechnology initiative: the initiative and its implementation plan; 2000.

Nowak J, Mehn D, Nativo P, García C, Gioria S, Ojea-Jiménez I, Gilliland D, Rossi F. 2014. Silica nanoparticle uptake induces survival mechanism in A549 cells by the activation of autophagy but not apoptosis. *Toxicol Lett.* 224(1):84-92.

Nurkiewicz T, Porter D, Hubbs A, Stone S, Chen B, Frazer D, Boegehold M, Castranova V. 2009. Pulmonary nanoparticle exposure disrupts systemic microvascular nitric oxide signaling. *Toxicol Sci.*10(1):191-203.

Oh N, Park JH. 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine.*6;9 Suppl 1:51-63.

Okoturo-Evans O, Dybowska A, Valsami-Jones E, Cupitt J, Gierula M, Boobis AR, Edwards RJ. 2013. Elucidation of toxicity pathways in lung epithelial cells induced by silicon dioxide nanoparticles. *PLoS One.* 8(9):e72363.

Panyam J, Labhasetwar V. 2003. Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res.* 20(2):212-220.

Pollard D, Beltzener C. 2002. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Current Opinion in Structural Biology.* 12 (6):768–774.

Pringle J, Muthukumar A, Tan A, Crankshaw L, Conway L, Ross JL. 2013. Microtubule organization by kinesin motors and microtubule crosslinking protein MAP65. *J Phys Condens Matter*. 25(37):374103.

Robert A, Herrmann H, Davidson M, Gelfand V. 2014. Microtubule-dependent transport of vimentin filament precursors is regulated by actin and by the concerted action of Rho- and p21-activated kinases. *FASEB J*. 28(7):2879-2890.

Rossi E, Pylkkänen L, Koivisto A, Vippola M, Jensen K, Pasanen Miettinen M, Sirola K, Nykäsenoja H, Karisola P, Stjernvall T, Vanhala E, Kiilunen M, P, Mäkinen M, Hämeri K, Joutsensaari J, Tuomi T, Jokiniemi J, Wolff H, Savolainen K, Matikainen S, Alenius H. 2010. Airway exposure to silica-coated TiO<sub>2</sub> nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci*. 113(2):422-433.

Rothen-Rutishauser B, Mühlfeld C, Blank F, Musso C, Gehr P. 2007. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Part Fibre Toxicol*. 25;4:9.

Rudimov E, Buravkov S, Andreeva E, Buravkova L. 2015. Effect of Proinflammatory Activation on F-Actin Distribution in Cultured Human Endothelial Cells under Conditions of Experimental Microgravity. *Bull Exp Biol Med*. 158(4):573-580.

Savolainen K, Alenius H, Norppa H, Pylkkänen L, Tuomi T, Kasper G. 2010. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies--a review. *Toxicology*. 10; 269(2-3):92-104.

Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*. 15; 10:15.

Satelli A, Li S. 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 68(18):3033-3046.

Singh P, Rathinasamy K, Mohan R, Panda D. 2008. Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life*. 60(6):368-375.

Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. 2011. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol*. 45(4):227-247.

Stearns R, Paulauskis J, Godleski J. 2001. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 24(2):108-115.

Stebounova L, Adamcakova-Dodd A, Kim J, Park H, O'Shaughnessy P, Grassian V, Thorne PS. 2011. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. *Part Fibre Toxicol.* 8(1):5.

Steinmetz N, Cho C, Ablack A, Lewis J, Manchester M. 2011. Cowpea mosaic virus nanoparticles target surface vimentin on cancer cells. *Nanomedicine (Lond).* 6(2):351-364.

Spiering D, Hodgson L. 2011. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr.* 5(2):170-180.

Styers M, Kowalczyk A, Faundez V. 2005. Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance? *Traffic.* 6(5):359-365.

The Project of Emerging Nanotechnologies, visto en : <http://www.nanotechproject.org/inventories>.

Thiery J, Sleeman J. 2006. Complex networks orchestrate epithelial- mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(2):131-142.

Thurn K, Arora H, Paunesku T, Wu A, Brown E, Doty C, Kremer J, Woloschak G. 2011. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine.* 7(2):123-130.

Wang J, Gerlach J, Savage N, Cobb G. 2013. Necessity and approach to integrated nanomaterial legislation and governance. *Sci Total Environ.* 1; 442:56-62.

Wang Y, Wu Q, Sui K, Chen X, Fang J, Hu X, Wu M, Liu Y. 2013 . A quantitative study of exocytosis of titanium dioxide nanoparticles from neural stem cells. *Nanoscale.* 7;5(11):4737-4743.

Weaver A, Young M, Lee W, Cooper J. 2003. Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol.* 15(1):23-30.

- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol.* 21;46(4):2242-2250.
- Xu F, Pielt C, Farkas S, Qazzaz M, Syed NI. 2013. Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. *Mol Brain.* 6:29.
- Yin J, Liu J, Ehrenshaft M, Roberts J, Fu P, Mason R, Zhao B. 2012. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-Generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 263(1):81-88.
- Yokel R, Macphail R. 2011 Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *J Occup Med Toxicol.* 21; 6:7.
- Yoon M, Moir R, Prahlad V, Goldman R. 1998. Motile properties of vimentina intermediate filament networks in living cells. *J Cell Biol.* 143(1):147-157.
- Zhang Y, Yang M, Portney N, Cui D, Budak G, Ozbay E, Ozkan M, Ozkan CS. 2008. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomed Microdevices.* 10(2):321-328.