



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO SOBRE EL
ESTRÉS OXIDATIVO Y EL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL EN
CÉLULAS GLIALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO PÉREZ ARIZTI

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

DR. ALI HALHALI BAGHDAG.
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de agosto de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **PÉREZ ARIZTI JOSÉ ANTONIO** con número de cuenta **514012513**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS GLIALES"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. REBECA LÓPEZ MARURE**:

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DR. ÓSCAR FLORES HERRERA
Secretario: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
Suplente: DR. ALI HALHALI BAGHDAD

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.



ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de septiembre de 2015

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de realizar mis estudios y por todo el apoyo recibido durante mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la realización de mis estudios.

A los miembros del Comité Tutor por su paciencia, su valioso tiempo, consejos e ideas que aportaron en este proyecto.

Dra. Rebeca Lopez Marure

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Ali Halhali Baghdad

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A mi madre en primer lugar, por todo el amor y el cariño que me ha brindado durante toda mi existencia, y por inculcarme valores que han forjado mi carácter y me han permitido desarrollarme a nivel personal, emocional y académico. Gracias por amarme sin reservas y por siempre estar para mí. Eres el mayor tesoro de mi vida.

- A mi padre, así como a su hermosa esposa Angélica Trejo Hurtado. Mi padre que siempre supo inculcar en mí el deseo de estudiar y concluir una carrera, y siempre tener la mira fija en la importancia de crecer a nivel académico, así como al cariño y apoyo en todo sentido que siempre me han dado ambos dentro de sus posibilidades para llegar al nivel en el que estoy.

- A Socorro González Figueroa y Jesús Fernando Flores Orozco (Q.E.P.D.), quienes por muchos años me permitieron laborar con ellos y siempre me apoyaron de todas las formas en que una persona puede ser apoyada para no estancarme y seguir estudiando y siendo cada vez una mejor persona. Esta tesis lleva una dedicatoria especial para usted, Don Fer.

- A Angélica Michelle Velázquez Ayala, mi pareja, mi todo, y quien estuvo a mi lado incondicionalmente y amándome desde antes de mi proceso de admisión para la maestría, y sigue estando aquí de la misma manera para mí ahora que este proceso ha concluido. Te amo tanto.

- Al M. en C. Ubaldo Quiroz López, por inculcarme a través de sus clases la fascinación por la fisiología y el entender cómo funciona la vida a nivel macro y micro y el gusto por la biología experimental, así como por su desinteresada recomendación que me permitió llegar al instituto en el que realicé todo este trabajo.

- A la Dra. Rebeca López Marure, por ser una tutora excepcional y siempre dispuesta a ayudarme y orientarme, así como por su paciencia y su siempre respetuoso y cordial trato y por todo lo que he aprendido de ella. De igual manera, a todos mis compañeros del laboratorio, por el apoyo y guía que en algún momento he recibido de su parte en el desarrollo de mis proyectos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Nanopartículas (NPs)	3
1.1.2. Nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO ₂)	4
1.2. Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno (ERO)	5
1.2.1. Anión superóxido (O ₂ ⁻)	6
1.2.2. Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂)	6
1.3. Enzimas Antioxidantes	7
1.3.1. Superóxido dismutasas (SOD)	7
1.3.2. Catalasa	8
1.3.3. Glutación peroxidasa (GPx)	9
1.4. Membrana mitocondrial	10
1.5. Peroxidación de lípidos	12
1.6. Justificación	14
1.7 Hipótesis	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. General	16
2.2. Particulares	16
3. ANTECEDENTES	17
4. METODOLOGÍA	19
4.1. Cultivo celular	19
4.2. Nanopartículas de dióxido de titanio	19
4.3. Estrés oxidativo y estado redox de las células	20
4.4. Proliferación y viabilidad celular	21
4.5. Extracción del ARN	23
4.6. PCR en tiempo real	23

4.7. Peroxidación de lípidos	25
4.8. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	26
4.9. Análisis estadístico	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Las NPs-TiO ₂ inducen estrés oxidativo	27
5.2. Las NPs-TiO ₂ despolarizan la membrana mitocondrial	36
6. DISCUSIÓN	38
7. CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	49
APÉNDICE: ARTÍCULO PUBLICADO	60

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados

-CH₂: Grupo metileno

·OH: Radical hidroxilo

¹O₂: Oxígeno singulete

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Trifosfato de adenosina

atm: Atmósfera

C₆H₁₂O₆: Glucosa

cADN: Ácido desoxiribonucleico complementario

CH₃NaO₂: Hidroximetalonato de sodio

cm²: Centímetro cuadrado

CO₂: Dióxido de carbono

DMEM: Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco

DCF: Diclorodihidrofluoresceina

DEPC: Dietilpirocarbonato

ERO: Especies reactivas de oxígeno

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

h: Hora

H₂DCFDA: Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceina

H₂O: Agua

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HCl: Ácido clorhídrico

HPBS: Solución salina amortiguadora de fosfatos y Hepes
IL: Interleucina
IMAC: Canal aniónico de la membrana interna
KCl: Cloruro de potasio
KDa: KiloDalton
LPS: Lipopolisacárido
M: Molar
mARN: Ácido ribonucleico mensajero
min: Minuto
mg: Miligramo
ml: Mililitro
mM: Milimolar
Mn⁺³: Manganeso asociado como enzima
MOPS: Ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfónico
MPT: Permeabilidad de transición mitocondrial
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaCl: Cloruro de sodio
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NF-κB: Factor nuclear de transcripción kappa B
NPs: Nanopartículas
NPs-TiO₂: Nanopartículas de dióxido de titanio
O₂: Oxígeno
O₂⁻: Anión superóxido
PCR: Reacción de la polimerasa en cadena

pH: Potencial de hidrógeno

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Rh123: Rodamina 123

RIRR: Liberación de especies reactivas de oxígeno inducida por especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real

SD: Desviación Estándar

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SOD: Superóxido dismutasa

TiO₂: Dióxido de titanio

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UVA y UVB: Ultravioleta A y B

ZnO: Óxido de zinc

μ g: Microgramo

μ l: Microlitro

μ M: Micromolar

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

Las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO₂) son usadas comúnmente en la industria química, eléctrica, electrónica y alimentaria. Las NPs-TiO₂ pueden entrar directamente al cerebro a través del bulbo olfatorio y depositarse en el hipocampo; por ello, se determinaron los efectos tóxicos de las NPs-TiO₂ en células gliales de rata y de humano, C6 y U373, respectivamente. Se evaluaron los siguientes eventos relacionados con el estrés oxidativo: 1.- los mecanismos de señalización redox por oxidación del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DFC-DA); 2.- la liberación del anión superóxido (O₂^{•-}) por medio de la reducción del MTT; 3.- la peroxidación de lípidos usando el ácido cis-parinámico; 4.- la expresión de enzimas antioxidantes mediante PCR en tiempo real; y 5.- el daño mitocondrial por medio de la tinción con rodamina 123 (Rh123). Las NPs-TiO₂ indujeron un fuerte estrés oxidativo en ambas líneas celulares observándose cambios en el estado redox de las células y la peroxidación lipídica asociada a un incremento en la expresión de la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa y la superóxido dismutasa 2 (SOD2). Las NPs-TiO₂ también produjeron cambios morfológicos y daño en la mitocondria, y un incremento en el potencial de membrana de la misma, indicativo de toxicidad. En conclusión, las NPs-TiO₂ tuvieron un efecto tóxico en las células gliales.

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs) are widely used in the chemical, electrical, electronic and food industries. TiO₂-NPs can enter directly into the brain through the olfactory bulb and be deposited in the hippocampus; therefore, we determined the toxic effect of TiO₂-NPs on rat and human glial cells, C6 and U373, respectively. We evaluated some events related to oxidative stress: 1.- redox-signaling mechanisms by oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA); 2.- the release of superoxide anion (O₂^{•-}) by MTT reduction; 3.- peroxidation of lipids by cis-parinaric acid; 4.- antioxidant enzyme expression by PCR in real time; and 5.- mitochondrial damage by rhodamine 123 (Rh123) staining. TiO₂-NPs induced a strong oxidative stress in both cell lines by mediating changes in the cellular redox state and lipid peroxidation associated with a rise in the expression of glutathione peroxidase (GPx), catalase, and superoxide dismutase 2 (SOD2). TiO₂-NPs also produced morphological changes, damage of mitochondria, and an increase in mitochondrial membrane potential. In conclusion, TiO₂-NPs had a toxic effect in glial cells.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Nanopartículas (NPs)

Se definen como nanopartículas (NPs) a aquellas partículas cuyo tamaño está por debajo de los 100 nanómetros, aunque pueden formar agregados que sobrepasan dicha medida (Borm *et al.*, 2006). Estos compuestos son utilizados en muchas ramas industriales como son la elaboración de alimentos (Peters *et al.*, 2014), pinturas, y la industria cosmética. Las NPs de óxido de zinc (ZnO) y de dióxido de titanio (TiO₂), son unos de los principales componentes de los bloqueadores solares. En otras disciplinas como la medicina, se utilizan las NPs de plata en la elaboración de diversos biomateriales por su gran capacidad antimicrobiana (Corrêa *et al.*, 2015).

Todo esto debido a las características que les confiere este tamaño en comparación al mismo compuesto en tamaños por encima de esta medida, ya que al ser tan diminutas pueden llegar con más facilidad a los distintos blancos para los que son sintetizadas pero lo más importante, es el hecho de que al disminuir tanto su tamaño en comparación con la misma partícula de mayor tamaño, las NPs se rigen por leyes físicas y de interacción con otros compuestos distintas generando reacciones diferentes y pudiendo funcionar como catalizadores de dichas reacciones. Las NPs también pueden ser recubiertas con otros materiales distintos y se pueden modificar variando su forma y dimensiones; además de poseer un área de superficie mayor a la de

la partícula. Por todas estas características, las NPs son muy utilizadas en la biotecnología y la biomedicina.

1.1.2.- Nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO₂)

Las NPs-TiO₂ son de las NPs más utilizadas en la industria. La formación del TiO₂ es un proceso de oxidación del elemento titanio, también conocido como titania, que se da de manera natural en 3 formas minerales denominadas como anatasa, rutilo y broquita (Peters *et al.*, 2014) (Fig. 1). A las NPs-TiO₂ se le han dado distintas aplicaciones industriales debido a sus altas propiedades de refracción.

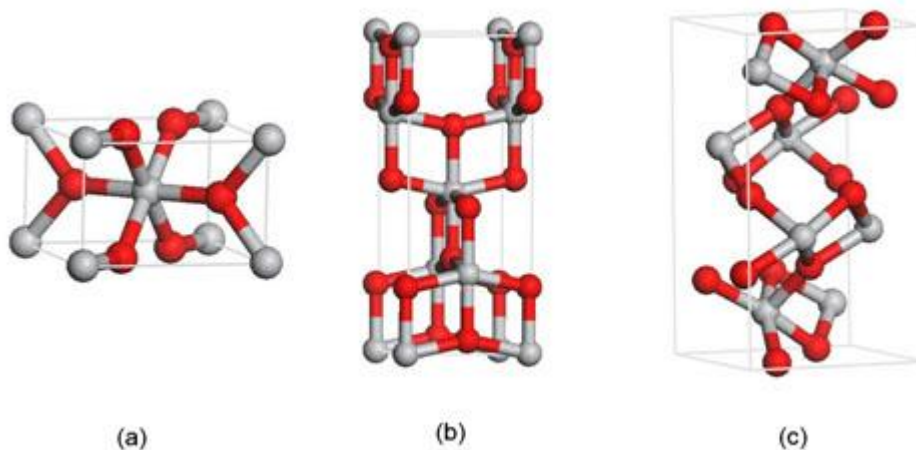


Figura 1. Representación gráfica tridimensional de las distintas estructuras cristalinas del TiO₂. (a) Anatasa, (b) Rutilo, (c) Broquita. En color rojo los átomos de oxígeno y en plateado los átomos de titanio. Tomada de <http://www.gassensorlab.com/research-page-2.html>

En la fabricación de protectores solares. las NPs-TiO₂ son utilizadas comúnmente debido a que forman una barrera sobre la piel que refleja los rayos solares UVA y UVB, impidiendo que penetren en capas más profundas de la piel y reduciendo la irritación por exposición (Threes *et al.*, 2011).

Las NPs-TiO₂ también se han implementado como un agente blanqueador de alimentos (Kisinger *et al.*, 2011), gomas de mascar y pastas dentales (Peters *et al.*, 2014), y son usadas como un aditivo para resaltar el sabor de muchos otros alimentos sin color blanco como son nueces, sopas, mostaza, vegetales secos; así como también en algunos vinos y cervezas (Weir *et al.*, 2012).

Debido a sus múltiples usos, cada vez más fabricas trabajan con este compuesto muchas veces sin las condiciones de seguridad necesarias poniendo en un estado de constante exposición a los trabajadores de la industria. A pesar de que el uso de las NPs-TiO₂ ha sido autorizado en la industria por la unión europea desde 1994 (European Commission, 1994), numerosos estudios han demostrado diferentes signos de daño en distintos tipos celulares, los cuales son descritos más a detalle en la sección de antecedentes.

1.2.- Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno (ERO).

Uno de los indicadores de toxicidad o daño a nivel celular más estudiados es el estrés oxidativo, el cual podemos definir como un desbalance entre radicales libres como las ERO y los antioxidantes. Las ERO son un tipo de especie reactiva (molécula con electrones desapareados) derivada del oxígeno (Gupta *et al.*, 2014), que es generado de manera natural o inducida en distintos procesos celulares.

1.2.1.- Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

Entre algunas de estas ERO se encuentra el radical libre $O_2^{\cdot-}$, el cual se forma cuando una molécula de O_2 capta un electrón, y éste se aparea con uno de los dos electrones libres de los orbitales π (Hansberg, 2008).

De manera natural el $O_2^{\cdot-}$ es producido principalmente en la cadena respiratoria mitocondrial, particularmente a nivel de la ubiquinona (co-enzima Q). La semiquinona y el ubiquinol, que se originan al aceptar uno y dos electrones respectivamente pueden ceder con facilidad un electrón al O_2 . Otro sitio desde el cual los electrones se fugan de la cadena respiratoria es el complejo 1 o NADH coenzima Q óxido-reductasa (Hansberg, 2008). Este radical libre tiene una función bactericida pero su exceso conlleva a daño a nivel celular (Chirino *et al.*, 2006).

1.2.2.- Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2).

El H_2O_2 por otro lado, a pesar de no ser un radical libre, es considerado una ERO, y se forma cuando cada uno de los electrones libres del O_2 se ha apareado con un electrón de giro contrario. Es producido principalmente por la reacción de las enzimas superóxido dismutasas (SOD) que dismutan al $O_2^{\cdot-}$ en oxígeno molecular y H_2O_2 , aunque también puede provenir de la actividad de algunas otras oxidasas como las de la xantina, de los aminoácidos, de las hexosas y de los fenoles, entre otras. El H_2O_2 puede

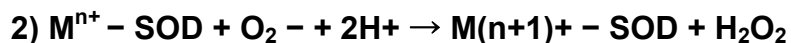
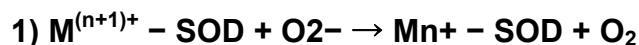
difundir a través de los compartimentos celulares, aunque también puede formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas, y es tóxico a concentraciones intracelulares por arriba de 1 mM, debido en gran parte a que puede formar oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), una de las especies más reactivas que se conocen (Hansberg, 2008).

Los efectos tóxicos inducidos por esta acumulación de las ERO son muy variados y afectan a muchos tipos celulares. Por ello, existen enzimas con acción antioxidante que buscan mantener el balance entre la producción y la degradación de especies reactivas.

1.3.- Enzimas antioxidantes.

1.3.1.- Superóxido dismutasas (SOD).

Las SOD son las enzimas encargadas de transformar al radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , el cual tiene una menor toxicidad, y que es posteriormente transformado en agua por otras enzimas, como se puede observar en la siguiente reacción de 2 pasos:



Donde M = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2)

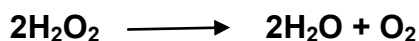
En la revisión de Gómez y colaboradores del año 2008, se menciona que la función de las SOD fue descrita por primera vez en 1969 por McCord y Fridovich, aunque la proteína ya había sido descubierta por Mann y Keilin desde 1939. En los mamíferos, esta familia está formada por tres miembros, los cuales se ubican en lugares claramente específicos, dos dentro de la célula (La SOD1 y la SOD2), y una extracelular (La SOD3) (Gómez *et al.*, 2008).

La SOD2 o MnSOD (ya que une manganeso (Mn^{+3}) en su centro catalítico) es una enzima homotetramérica con un peso de 22 KDa por subunidad, posee un Mn^{+3} por cada monómero; y se encuentra ubicada cerca de la membrana interna mitocondrial. Su expresión puede ser inducida por diversas citocinas y factores de crecimiento proinflamatorios como el TNF- α y las interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6), así como por inductores del estrés como el lipopolisacárido (LPS) o los metales pesados (Gómez *et al.*, 2008).

1.3.2.- Catalasa

Las catalasas son las enzimas que transforman al H_2O_2 directamente en H_2O y O_2 ; para ello emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como oxidante, a diferencia de otras peroxidasas que utilizan una molécula distinta al H_2O_2 como agente reductor (Peraza, 2008). La reacción de descomposición del H_2O_2 por acción de la catalasa es la siguiente:

CATALASA



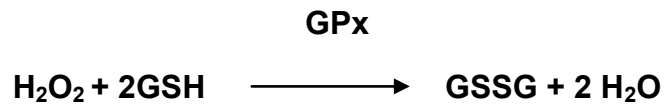
En la revisión de Peraza y colaboradores del 2008, se menciona que fue en 1819 cuando Louis Jacques Thénard describió por primera vez lo que hoy se conoce como la reacción de la catalasa. La catalasa fue la primera enzima con hierro que se purificó y en 1936 se demostró que su sitio activo tenía asociada a la protoporfirina IX (Peraza, 2008).

Existen 3 tipos de catalasas en distintos organismos que llevan a cabo la reacción de manera eficaz: las catalasas típicas; las catalasas-peroxidasas, las cuales exhiben una alta actividad de peroxidasa; y las catalasas de manganeso, las cuales poseen átomos de manganeso en su centro catalítico. En términos generales, la expresión de la catalasa en los mamíferos es muy elevada en hígado y eritrocitos, alta en el tejido adiposo y riñón, moderada en el páncreas y pulmones, y baja en el suero, corazón y cerebro (Peraza, 2008).

1.3.3.- Glutación peroxidasa (GPx).

La enzima GPx es una selenoproteína antioxidante la cual reduce al H_2O_2 a agua, requiriendo para ello la presencia de un tripéptido de bajo peso molecular llamado glutati6n reducido (GSH), el cual es el donador de equivalentes reductores durante la reacción, dando como resultado la reducci6n del H_2O_2 a agua, así como la oxidaci6n del GSH a su forma GSSG de manera simultánea (el cual es posteriormente reducido por la enzima

glutati3n reductasa usando el NADPH originado en la ruta de las pentosas fosfato), como se muestra en la siguiente reacci3n (C3rdenas-Rodr3guez *et al.*, 2008):



La GPx fue descubierta en tejidos animales en el a3o de 1957. Presenta cuatro tipos distintos de isoenzima de las cuales las 3 primeras son homotetr3meros, mientras que la GPx-4 es un mon3mero. Cada una de ellas contiene un 3tomo de selenio (Se) en su sitio activo en forma de selenociste3na, un amino3cido raro an3logo de la ciste3na pero en lugar del grupo tiol que contiene azufre, la selenociste3na posee al grupo selenol, que contiene Se (C3rdenas-Rodr3guez *et al.*, 2008).

1.4.- Membrana mitocondrial.

La mitocondria es uno de los principales generadores de las y es tambi3n el sitio donde se genera la mayor parte de la energ3a de las c3lulas animales, principalmente durante la fosforilaci3n oxidativa, un proceso en el cual los electrones pasan a trav3s de una serie de mol3culas transportadoras de electrones dispuestas en complejos enzim3ticos multiprote3nicos llamados

cadena de transporte de electrones, que se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial (Fig. 2).

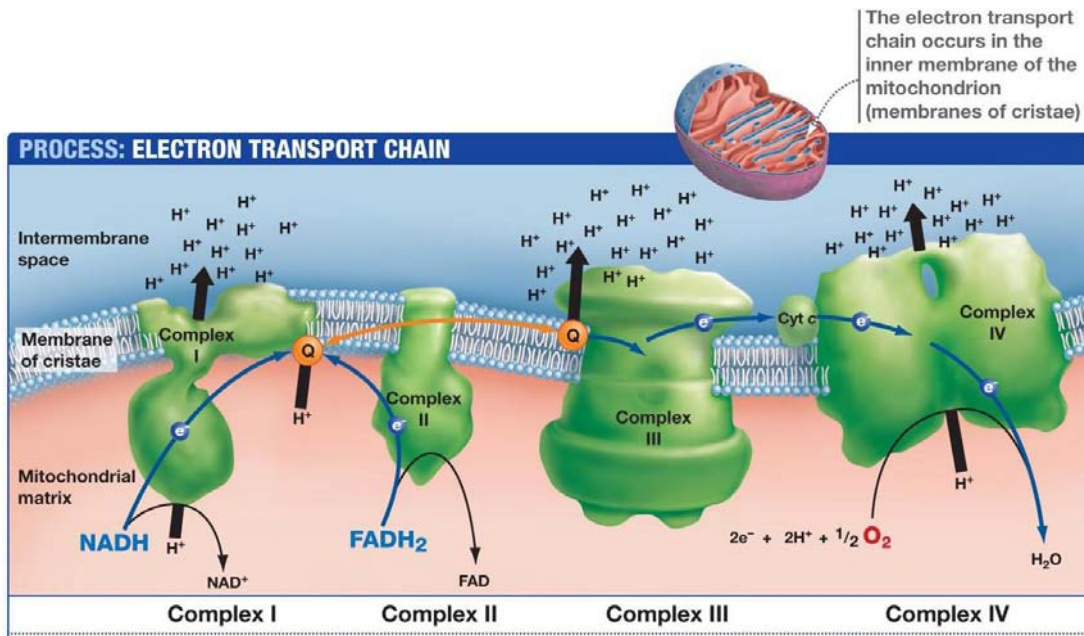
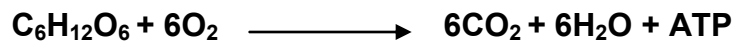


Figura 2. Cadena respiratoria mitocondrial. Se observan los 4 complejos proteínicos embebidos en la membrana interna mitocondrial, así como los transportadores móviles de electrones y la generación del potencial electroquímico del protón. Tomada de http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/09_21_electron_transport-L.jpg

Los electrones provienen del NADH que es producido en el ciclo de Krebs durante la oxidación de nutrientes como la glucosa cuando esta se oxida totalmente en la mitocondria, y su aceptor final es el oxígeno, como se muestra en la siguiente reacción:



Las principales fuentes de producción del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ en la cadena respiratoria son el complejo NADH coenzima Q óxidoreductasa o complejo 1, así como en el complejo citocromo c óxido-reductasa o complejo 3, donde el

$O_2^{\cdot-}$ se produce como resultado de la autooxidación de la semiquinona, un intermediario que se forma en dicho complejo durante el ciclo Q para la translocación de protones (Konigsberg, 2008).

Los radicales libres buscan resolver el problema de un electrón libre buscando arrancar otro de algún otro sitio, por lo cual buscara interactuar con moléculas que tengan un exceso de electrones, el cual en las principales biomoléculas se expresa con la presencia de un doble enlace. La producción en exceso de radicales libres provoca por lo tanto daños en los lípidos y proteínas de membrana, afectando aspectos como la fluidez y la permeabilidad. La alteración en la permeabilidad de la membrana implica que ésta permita la entrada de diversos solutos a la célula sin ningún control, llevándola a eventos que culminan en la muerte celular (Zenteno *et al.*, 2008).

1.5.- Peroxidación de lípidos.

La interacción de radicales libres y otras ERO con los lípidos de las membranas biológicas, ocasiona la producción de diversos compuestos tóxicos, altera su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las proteínas, las enzimas y los receptores o canales iónicos asociados a ellas; situación que compromete la estructura y función celular (Zenteno *et al.*, 2008).

La peroxidación lipídica puede dividirse en 3 fases:

- Iniciación: Cuando el residuo de un ácido graso poliinsaturado dentro de los lípidos de la membrana es atacado por una ERO que es capaz de retirar un átomo de hidrógeno entero de un grupo metileno (-CH₂) dejando al residuo del ácido graso como radical libre.

- Propagación: La nueva molécula a la que se le ha retirado el hidrógeno, hará lo mismo a lo que fue sujeta a ella, en este caso, le quita un hidrógeno a la molécula de ácido graso poliinsaturado adyacente dejando a esta segunda sin él, lo que ocasiona que la peroxidación se propague a través de la membrana.

- Terminación: La lipoperoxidación puede finalizar cuando el radical lipídico reacciona con otra molécula, la cual puede ser un segundo radical lipídico para formar un agregado que queda dentro de la membrana y altera sus funciones (Zenteno *et al.*, 2008).

1.6- Justificación

La exposición a los contaminantes ambientales se ha asociado a un aumento de enfermedades inflamatorias como el cáncer y la aterosclerosis. Aunado a esto, la producción de las NPs por medio de la nanotecnología para su uso industrial es preocupante puesto que no se conoce su efecto en la salud. La exposición a las NPs-TiO₂ ha ido en aumento de manera proporcional al uso de estas partículas en la industria. Por ello, y habiéndose demostrado que pueden depositarse en el tejido cerebral, es importante determinar si existen daños asociados con la liberación de radicales libres en las células cerebrales teniendo efectos adversos para la salud.

1.7- Hipótesis

Se espera que exista una relación entre la presencia de las NPs-TiO₂ y la inducción de un estrés oxidativo con las manifestaciones de daño características del mismo, en líneas celulares derivadas de astrocitomas de humano (U373) y de rata (C6).

2.- OBJETIVOS

2.1.- General

- Determinar si las NPs-TiO₂ inducen daño a nivel mitocondrial y estrés oxidativo en las líneas celulares de astrocitomas de humano U373 y de ratón C6.

2.2.- Particulares

- Determinar la presencia del estrés oxidativo utilizando como marcador el DCF-DA, por medio de citometría de flujo.
- Determinar el número de células, así como la actividad metabólica de las mismas, por medio de la técnica de cristal violeta y la reducción del MTT respectivamente, por medio de espectrofotometría.
- Evaluar la síntesis del mRNA de los genes de las enzimas GPx, catalasa y SOD2, mediante la técnica de PCR en tiempo real.
- Determinar el daño por estrés oxidativo determinando la lipoperoxidación utilizando el ácido cis-parinámico como marcador, por medio de citometría de flujo.
- Determinar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial utilizando la rodamina 123 (Rh123) como indicador mediante citometría de flujo
- Realizar el análisis estadístico.

3.- ANTECEDENTES

Durante su producción, distribución y uso, las NPs-TiO₂ pueden liberarse al medio ambiente y quedar suspendidas en el aire, convirtiéndose en un riesgo potencial para la salud de la población en general, ya que si bien se ha considerado que las NPs-TiO₂ no tiene efectos dañinos, lo cierto es que el rango de tamaño en el que se encuentran permite un depósito de las mismas dentro del organismo; con un probable efecto tóxico como el de otras partículas con características similares como son los nanotubos de carbono y las partículas de acero carbónico (Shedova *et al.*, 2010; Warheit *et al.*, 2007). Las principales vías de entrada de las NPs al organismo son la respiratoria, digestiva y dérmica, y por su tamaño, pueden ingresar fácilmente y depositarse en diferentes órganos, pudiendo tener efectos dañinos en la salud (Hoet *et al.*, 2004).

Numerosos trabajos han demostrado la translocación y depósito de las NPs-TiO₂ a través de las vías respiratorias, exponiendo tanto a los trabajadores de la industria de la fabricación de estas NPs, así como a los consumidores que pueden inhalarlas al ser liberadas en forma de aerosol en productos como los desodorantes y los perfumes. Se ha demostrado que las NPs por ejemplo, pueden pasar a través de las células endoteliales y epiteliales y llegar a depositarse en sitios específicos como corazón, médula ósea y nodos linfáticos (Oberdoster *et al.*, 2005); o bien, traspasar la barrera hemato-encefálica y llegar al cerebro pudiéndose depositar en él por meses (Lee *et al.*, 2013). Hablando de manera particular de las NPs-TiO₂, se ha

demostrado que pueden depositarse en el cerebro e inducir la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α (Liu *et al.*, 2013); así como alterar genes involucrados en la memoria y el aprendizaje (Ze *et al.*, 2014). También se ha reportado que estas NPs-TiO₂ ingresan directamente al cerebro a través del bulbo olfatorio y se depositan en el hipocampo causando alteraciones patológicas (Wang *et al.*, 2008), y la liberación de neurotransmisores monoaminérgicos (Wang *et al.*, 2007). Así mismo, un estudio mostró que las NPs-TiO₂ inyectadas en la cavidad abdominal se translocaron al cerebro causando daño (Ma *et al.*, 2010). Otro estudio demostró que la exposición de ratonas gestantes a estas partículas, afectó la expresión de genes relacionados con la función y el desarrollo del sistema nervioso central de las crías (Shimizu *et al.*, 2009).

En lo que al estrés oxidativo se refiere, su efecto ha sido ampliamente demostrado en los distintos linajes del sistema nervioso central, como por ejemplo daños a nivel del ADN (Smith *et al.*, 2013), alteraciones en el proceso de lipoperoxidación (Zmijewski *et al.*, 2005). De igual manera, el aumento en la producción de agentes antioxidantes se presenta con el fin de contrarrestar el incremento de las ERO, como las enzimas SOD, que oxidan al superóxido y la catalasa y la GPx, que convierten al H₂O₂ en agua (Alfadda *et al.*, 2012).

4.- METODOLOGÍA

4.1.- Cultivo celular

Las células de astrocitomas de humano U373 y de ratón C6 fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con 4500 mg/L de glucosa, 10% de suero de ternera recién nacido, glutamina (2 mM), piruvato (1mM), antibiótico-antimicótico (1%) y aminoácidos no esenciales MEM (1%) (Gibco/BRL, Gran Island, NY, EU). Las células se incubaron a 37 °C con una mezcla de gas de CO₂ al 5% y 95% de aire, en una atmósfera de humedad saturante, permitiendo una confluencia del 80% aproximadamente.

4.2.- Nanopartículas de dióxido de titanio

Las NPs-TiO₂ han sido ya caracterizadas por nuestro grupo de trabajo (Montiel-Dávalos *et al.*, 2012). Las NPs-TiO₂ fueron esterilizadas por autoclave a 1.5 atm por 20 min. Posteriormente se hizo una solución stock agregando 1 mg de las NPs en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos y hepes [HPBS: NaCl (150 mM), KCl (4.4 mM) (Sigma, St Louis MO, EU), HEPES (10.9 mM) (Amresco, Solon, OH, EU), glucosa 12.2 (mM), pH 7.4] y se mezcló en un vortex (Genie 2, Scientific Industries, EU) por 5 min.

Los cultivos celulares fueron expuestos a una concentración de 20 µg/cm², que es la concentración que ha demostrado tener mayores efectos en distintas líneas celulares reportadas en trabajos de nuestro grupo de trabajo (Montiel-Dávalos *et al.*, 2012; Márquez-Ramírez *et al.*, 2012), por tiempos determinados dependiendo del experimento en cuestión. A pesar de que

esta concentración es alta al compararla con la concentración de NPs-TiO₂ en los productos comerciales, el hecho de que su ingreso es acumulativo y no se conoce aún una vía por la cual estas NPs-TiO₂ son secretadas, puede ocasionar la exposición a estas concentraciones en los individuos a través de los años.

4.3.- Estrés oxidativo y estado redox de las células

Para determinar el estrés oxidativo, se evaluó el estado redox de las células. La oxidación del H₂DCFDA en 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCF) se usó como una prueba indicadora del estado redox de las células, considerando que a mayor fluorescencia de las células tratadas con respecto al control, mayor será la cantidad de DCF que ha sido oxidado por las ERO, incluyendo peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos, óxido nítrico y otros peroxinitritos. Las células fueron cultivadas con o sin NPs-TiO₂ por 2, 4, 6 y 24 h. El H₂O₂ (Jaloma, Guadalajara, JAL, MEX) (500 µM) fue usado por 2 h como control positivo para inducir estrés oxidativo.

Después del tratamiento, las células fueron incubadas con el H₂DCFDA (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EU) (10 µM) por 30 min a 37°C aisladas de la luz, y lavadas y centrifugadas posteriormente con HPBS. Después del lavado, la fluorescencia se evaluó por medio de citometría de flujo en un citómetro FACS Calibur (Becton–Dickinson, San José, CA, EU). La intensidad de la fluorescencia se calculó multiplicando el número de eventos por el promedio de la intensidad de la fluorescencia obtenida por el

software CellQuest usado para el análisis. Los resultados se exponen en términos de porcentaje de fluorescencia con respecto a las células sin tratamiento (100%).

4.4.- Proliferación y viabilidad celular

Las ERO, además de tener un efecto tóxico en las células, tienen también un impacto en la división celular, así como en la viabilidad y actividad metabólica de las mismas. Para evaluar estos parámetros se realizaron de manera simultánea pruebas de tinción de cristal violeta y ensayos de reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El cristal violeta tiñe a las células y permite observar la cantidad de proteína pegada al plato, lo cual es un indicador indirecto del número de células en el pozo. El ensayo del MTT por su parte, determina la reducción de este compuesto a formazán dando una coloración purpura; lo cual es un indicador de la actividad respiratoria de las células y es usado de manera común como un indicador de viabilidad celular. Sin embargo, se ha comprobado que el $O_2^{\cdot-}$ liberado por las células en presencia de las NPs-TiO₂ también puede reducir a las sales de tetrazolio a formazán (Wang *et al.*, 2011) en una reacción de 2 pasos (Fig.3). Las células se sembraron en placas de 96 pozos al 80% de confluencia y se trataron con las NPs-TiO₂ por 2, 4, 24 y 48 h.

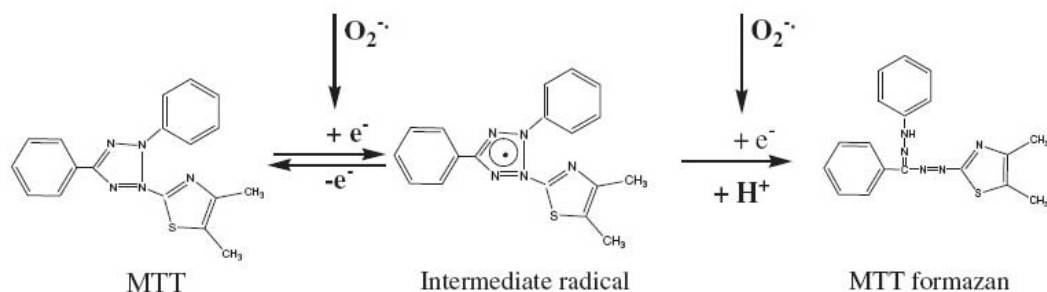


Figura 3. Reducción del MTT a Formazán inducida por el radical libre $O_2^{\cdot-}$, a través de una interacción de 2 pasos con 2 moléculas de $O_2^{\cdot-}$ (Wang et al., 2011).

Para la tinción con el cristal violeta, después de concluido el tiempo del tratamiento, se adicionó glutaraldehído (Sigma St. Louis MO, EU) (1.1 %, 50 μ l) a cada uno de los pozos y se incubaron por 10 min. Posteriormente, esta solución se retiró y las células se tiñeron con 50 μ l de una solución de cristal violeta al 0.1% (en solución amortiguadora de ácido fórmico (Sigma St. Louis MO, EU) (200 mM), pH 6.0) por 20 min. Después, las células se lavaron exhaustivamente con agua para eliminar el exceso de colorante no incorporado. Por último, el colorante incorporado fue disuelto con ácido acético (Productos químicos MTY, MEX) (10%, 100 μ l), y las placas se leyeron en un espectrofotómetro de placas (Biotek Instruments EL311, VT, EU) a una absorbancia de 595 nm.

Para el ensayo del MTT, se les agregó a las células 20 μ l/pozo del MTT (Sigma, St Louis MO, USA (5 mg/ml)) y se incubaron a 37°C por 3 h. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se agregó isopropanol (Mallinckrodt, MEX) acidificado (HCl (Fermont, NL, MEX) al 0.04 N, 100 μ l)

para disolver la sal de formazán formada. Inmediatamente, las placas se leyeron en un espectrofotómetro de placas a una absorbancia de 570 nm.

4.5.- Extracción del ARN

El ARN total de las células tratadas y no tratadas se extrajo usando el kit Perfect RNATM (Eppendorf, Hamburg, GER). A su vez, el ARN aislado fue cuantificado usando Genesys 10 series (ThermoSpectronic, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EU) y separado (5 µg) en un gel de agarosa al 1.0% con bromuro de etidio en solución amortiguadora de ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfónico 10X [MOPS: MOPS (2 mM), CH₃NaO₂ (100 mM), EDTA (10 nM), DEPC (0.5 M), pH 8.0] para confirmar la presencia de bandas y observar su integridad. Tanto la solución de corrida como el gel contenían 0.2 M de formaldehído para las condiciones desnaturalizantes. Para evitar la contaminación con el ADN, las muestras de ARN se trataron con la ADNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EU) antes de realizar la transcripción reversa. Todas las muestras del ARN fueron almacenadas a -70°C antes de su uso.

4.6.- PCR en tiempo real

El ARN fue empleado para la transcripción reversa con hexámeros al azar en una solución de reacción de volumen de 20 µl, y las reacciones fueron realizadas en un termociclador Masetrcycle (Roche). El cADN amplificado se cuantificó en un espectrofotómetro a 260 nm de absorbancia. Los PCRs en tiempo real fueron realizados usando el ProbeLibrary humano universal. Las pruebas de TaqMan y los *primers* de oligonucleótidos específicos fueron

originalmente generados usando un ensayo software (ProbeFinder; <http://www.universal-probelibrary.com>). Los *primers* utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 1. (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, ALE).

Las muestras se normalizaron usando el gen constitutivo 18S. La reacción de amplificación (20 µl) contenía 500 ng de cADN sintetizado previamente, 1X de mezcla de reacción Light Cycler TaqMan Master, 200 nM de cada iniciador, y 100 nM de prueba universal ProbeLibrary (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, ALE). El PCR en tiempo real fue hecho en capilares de vidrio de borosilicato para la reacción de amplificación en un LightCycle versión 1.5 (Roche) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, ALE).

Tabla 1. Iniciadores usados en este estudio.

Molécula	Secuencia del iniciador	Temperatura de alineamiento(° C)
F-Catalasa-r	TGTTCTCACACAGGCGTTTC	50
R-Catalasa-r	GCTAATGAAGACAACGTCACTCA	50
F-SOD2-r	GACCCAAAGTCACGCTTGATA	60
R-SOD2-r	CTGGACAAACCTGAGCCCTA	60
F-GPx-r	ATGCCTTAGGGGTTGCTAGG	55
R-GPx-r	CGACATCGAACCCGATATAGA	55
F-18S	GGGACTTAATCAACGCAAGC	50
R-18S	GCAATTATTCCCATGAACG	50

F-GPx-h	G TTCACCTCGCACTTCTCG	60
R-GPx-h	CAACCAGTTTGGGCATCAG	60
F-SOD2-h	TGATGGCTTCCAGCAACTC	55
R-SOD2-h	CTGGACAAACCTCAGCCCTA	55
F-Catalasa-h	GGGTCCCGAACTGTGTCA	60
R-Catalasa-h	CCATCGCAGTTCGGTTCT	60

F: sentido; R: antisentido; r: rata; h: humano

4.7.- Peroxidación de lípidos

Para determinar la presencia de la lipoperoxidación se usó ácido cis-parinámico (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA), el cual es análogo a las lipoproteínas endógenas de la membrana. Su actividad fluorescente se pierde cuando el cromóforo es cortado durante la oxidación, por lo que la lipoperoxidación puede estimarse determinando la pérdida de la fluorescencia del ácido cis-parinámico. Las células con tratamiento fueron expuestas a las NPs-TiO₂ por 1, 2, 4, 6 y 24 h. Posterior al tratamiento, las células se despegaron con tripsina al 0.025% e incubadas con 5 µM de ácido cis-parinámico a 37°C por 1 h en la oscuridad. Pasado este lapso de tiempo, las células fueron lavadas con HPBS y analizadas inmediatamente en el citómetro de flujo, calculando la intensidad de la fluorescencia multiplicando el número de eventos por el promedio de la intensidad de la fluorescencia presentado por el programa CellQuest usado para el análisis.

4.8.- Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Los cambios en el $\Delta\Psi_m$ se examinaron monitoreando la fluorescencia de la Rh123, un catión lipofílico el cual es tomado selectivamente por la mitocondria, y su absorción es directamente proporcional al $\Delta\Psi_m$. Después de 2, 4, 6 y 24 h de tratamiento con las NPs-TiO₂, las células fueron incubadas con la Rh123 (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, JAP) en dimetil-sulfóxido (0.2 µg/ml) a 37°C por 30 min y lavadas con HPBS. Las células se colectaron y la intensidad de su fluorescencia fue analizada por citometría de flujo a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm, usando el programa CellQuest.

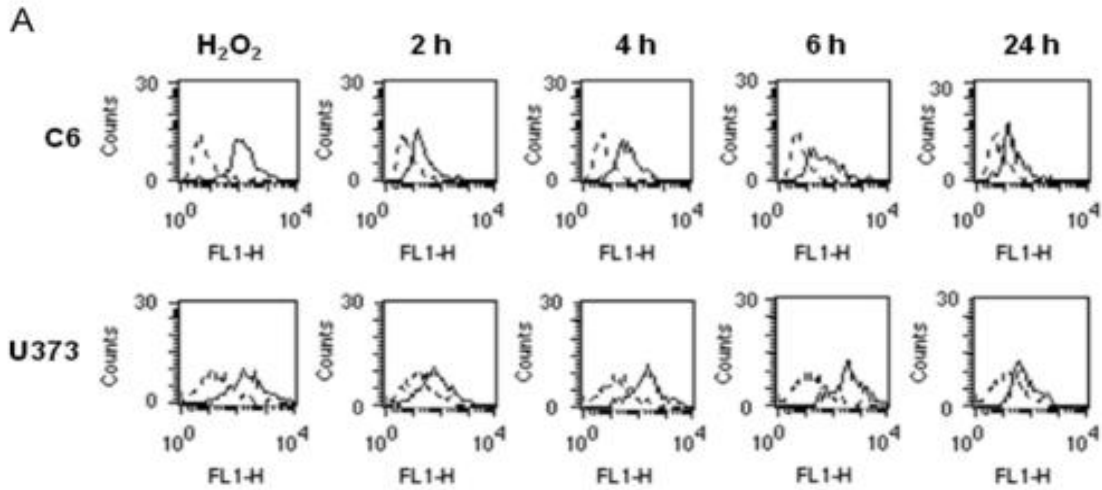
4.9.- Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados en 3 repeticiones independientes. Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado con una prueba de varianza de una vía (ANOVA) y las comparaciones múltiples por par con una prueba post hoc de Tukey usando el programa SPSS versión 21.A. Un valor de $P < 0.01$ se consideró como estadísticamente significativo.

5.- RESULTADOS

5.1.- Las NPs-TiO₂ inducen estrés oxidativo.

Para determinar si las NPs-TiO₂ podían inducir daño en las células gliales, se determinaron los cambios en el estado redox de la célula causado por estrés oxidativo mediante la oxidación del H₂DCFDA, encontrando un incremento notorio en la oxidación del mismo tanto en las células C6 como en las U373. Este incremento fue observado desde las 2 h de tratamiento, con un pico máximo a las 6 h y un decremento a las 24 h en ambas líneas celulares (Fig. 4).



B

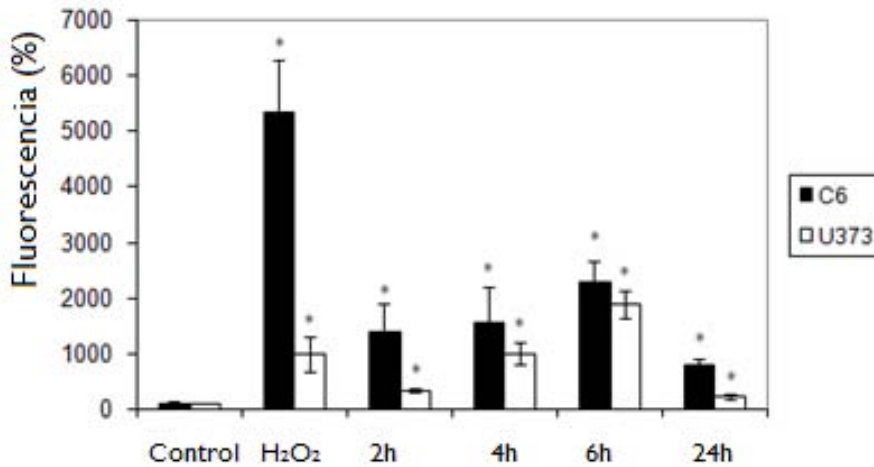
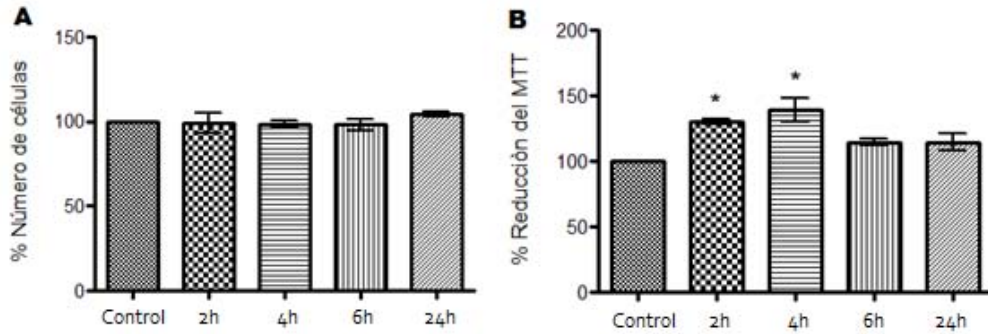


Figura 4. Efecto de las NPs-TiO₂ en el estado redox de la célula. Las células C6 y U373 fueron tratadas con 20 µg/cm² de NPS-TiO₂ por tiempos de 2, 4, 6 y 24 h, y el estado redox de la célula se evaluó usando el H₂DCFDA por citometría de flujo. Células tratadas con H₂O₂ (500 µM) por 2 h fueron usadas como control positivo. (A) Se muestra un histograma correspondiente a un experimento representativo. Las líneas punteadas corresponden a las células control y las líneas continuas a las células tratadas. (B) La intensidad de la fluorescencia, representada como porcentaje de fluorescencia donde las células control son el 100%, se calculó multiplicando el número de eventos por la media del valor de la intensidad de la fluorescencia. Se muestra la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes con una P < 0.01 de significancia estadística, comparada con las células sin tratamiento.

Teniendo en cuenta que la reducción de MTT a formazán es un indicador de la viabilidad celular, pero también puede ser generada por la presencia de O_2^- , se midió la cantidad de formazán por medio de un ensayo colorimétrico. De manera simultánea se realizó un ensayo de cristal violeta que permite conocer de manera indirecta el número de células por cultivo. Tanto en las células C6 como en las U373 no se encontró diferencia en el número celular sin embargo, pudo observarse un incremento en la reducción del MTT a las 2 y 4 h en las células C6, y a las 4 h en las células U373, con un decremento a tiempos más prolongados. Esto es un indicador de que a pesar de que tanto los cultivos tratados como el control tenían un número de células similar, la formación de O_2^- pudo aumentar al ser tratados con las NPs-TiO₂ (Fig. 5). Por otro lado, se calculó el índice de actividad mitocondrial generado por célula, dividiendo la media de la reducción del MTT entre la media del cristal violeta en términos de porcentaje. Se observó que en las células C6 el mayor índice de estrés oxidativo se vio a las 4 h, mientras que en las células U373 se vio hasta las 24 h de tratamiento (Fig. 6).



U373

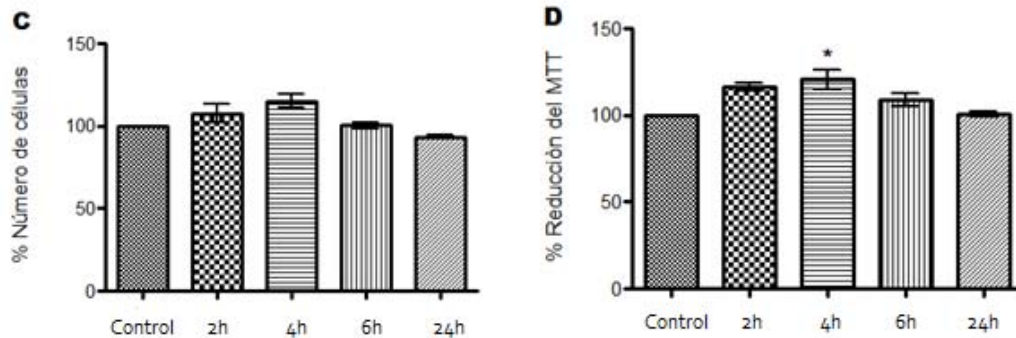


Figura 5. Efecto de las NPs-TiO₂ en la reducción del MTT y el número celular. Las células C6 y U373 fueron tratadas con 20 µg/cm² de NPs-TiO₂ por tiempos de 2, 4, 6 y 24 h; y tanto la reducción del MTT como la cantidad de células en términos de porcentaje se evaluaron usando MTT y cristal violeta respectivamente; por espectrofotometría. (A y C) Se muestran las gráficas de número celular de las células C6 y U373, respectivamente. (B y D) Se muestran también las gráficas de la reducción del MTT. El número de células y el MTT reducido se representan como porcentaje con respecto al control, donde las células control son el 100%. Se muestra la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes con una P < 0.01 de significancia estadística, comparada con las células sin tratamiento.

C6

U373

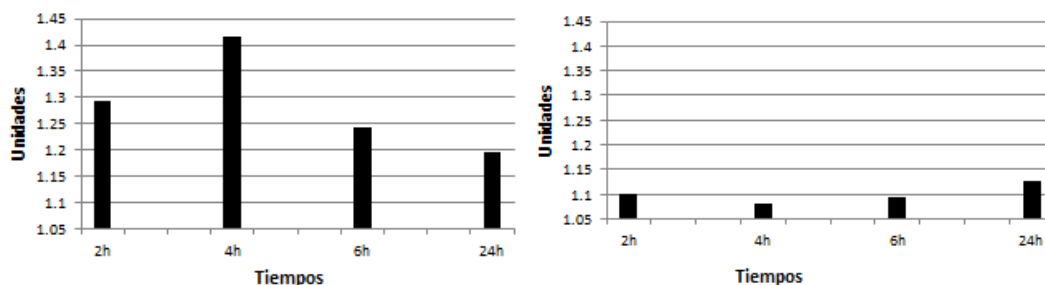
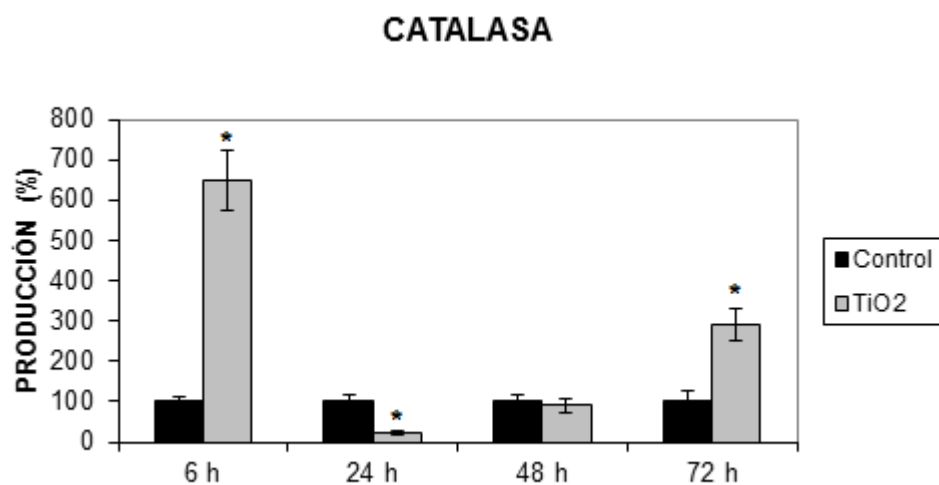
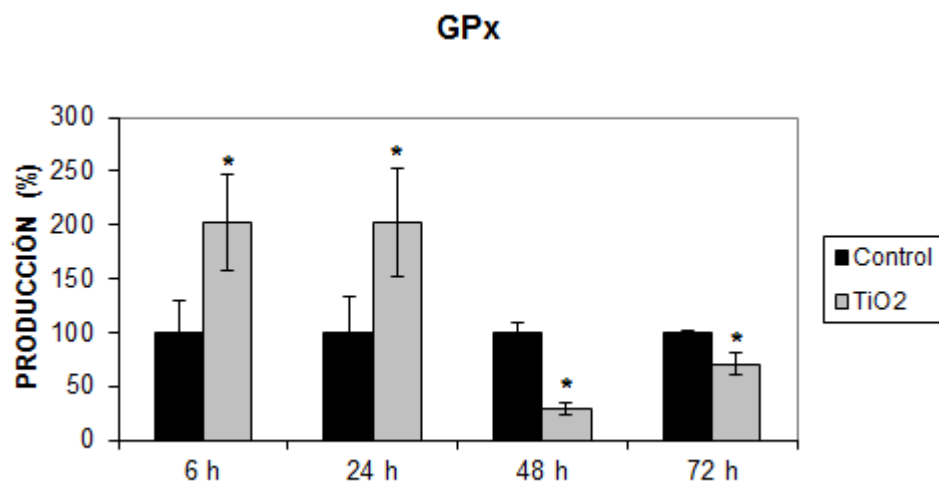


Figura 6. Índice de actividad mitocondrial. Las células C6 y U373 fueron tratadas con $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs-TiO₂ por tiempos de 2, 4, 6 y 24 h; y tanto la reducción del MTT como el porcentaje celular se evaluaron por espectrofotometría usando MTT y cristal violeta, respectivamente. El dato obtenido en el ensayo de MTT se dividió entre el porcentaje de células obtenido del cristal violeta para obtener la cantidad de MTT reducido por célula en unidades.

Considerando que las NPs-TiO₂ inducen estrés oxidativo, la síntesis del mRNA de algunos genes de enzimas antioxidantes se evaluó por medio de un RT-PCR. En las células C6, las NPs-TiO₂ incrementaron la expresión de la GPx después de 6 y 24 h de exposición e indujeron un decremento en tiempos más largos; la expresión de la catalasa incrementó cinco veces a 6 h y al doble a 72 h, pero decreció a 24 y 48 h; por último, la expresión de la SOD2 incrementó a 24 h y decreció a 48 y 72 h (Fig. 7). Por otro lado, en las células U373, las NPs-TiO₂ incrementaron la expresión de la GPx, la catalasa y la SOD2 a 24 h de exposición, con un decremento a tiempos más prolongados (48 h para la GPx y la catalasa, y 72 h para la SOD2; Fig. 8). Estos resultados indican que existe un desbalance en la producción de

especies reactivas y sus moléculas aceptoras, la cual incrementa la expresión de enzimas antioxidantes inducido por las NPs-TiO₂.

C6



SOD2

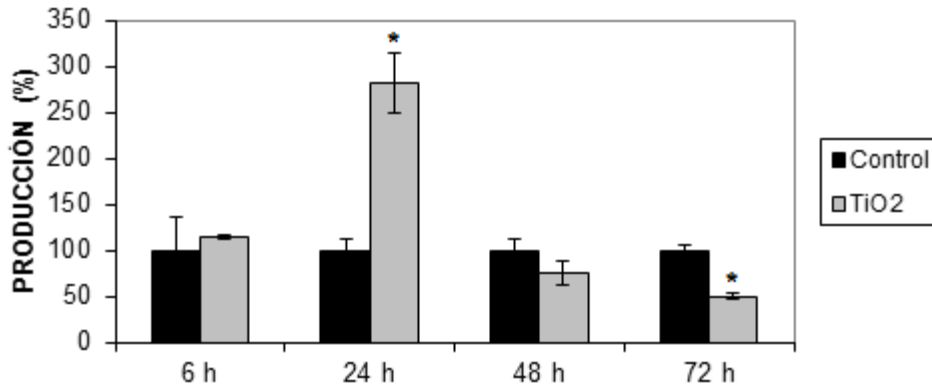
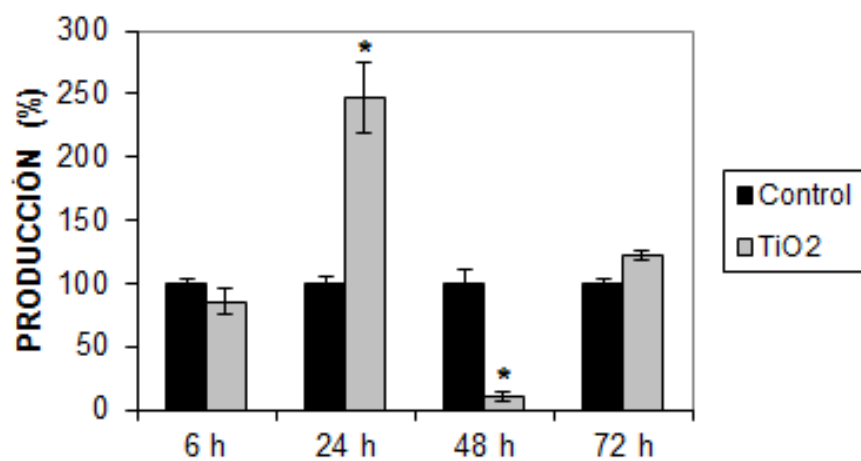
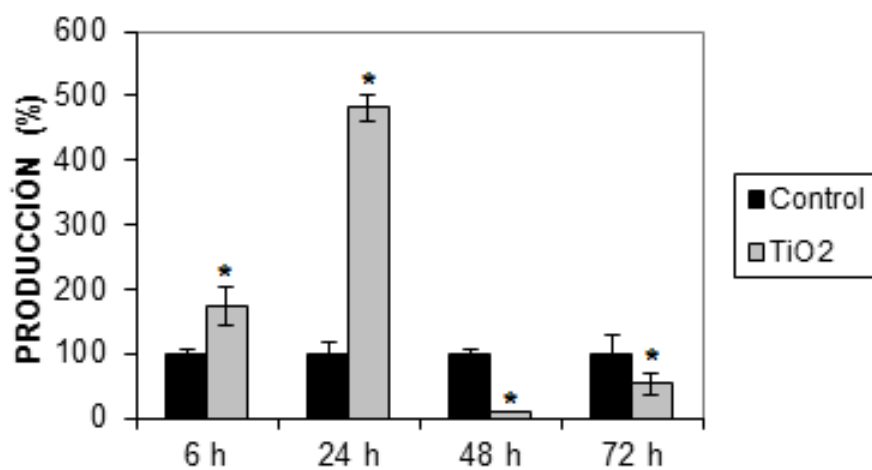


Figura 7. Efecto de las NPS-TiO₂ en la expresión del mRNA de enzimas antioxidantes. Las células C6 fueron tratadas con 20 µg/cm² de NPS-TiO₂ por tiempos de 6, 24, 48 y 72 h. La producción del mRNA que codifica para la GPx, la catalasa y la SOD2 se determinó por un ensayo de RT-PCR en tiempo real. La expresión relativa fue calculada usando el gen constitutivo 18s. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión comparado con muestras sin tratamiento, las cuales son igual al 100%. Se muestra la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes con una P < 0.01 de significancia estadística, comparada con las células sin tratamiento.

GPx



CATALASA



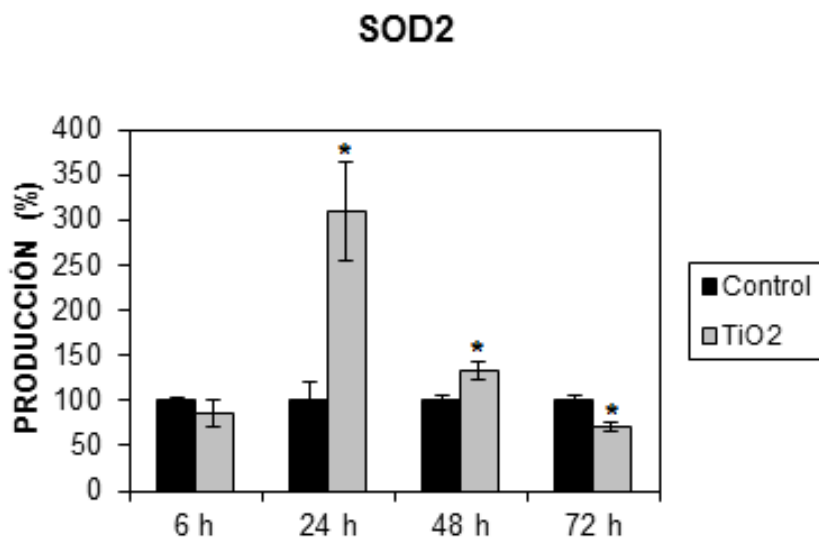


Figura 8. Efecto de las NPs-TiO₂ en la expresión de mRNA de enzimas antioxidantes. Las células U373 se trataron con 20 µg/cm³ de NPs-TiO₂ por tiempos de 6, 24, 48 y 72 h. La producción de la GPx, la catalasa y la SOD2 se determinó por un ensayo de RT-PCR en tiempo real. La expresión relativa fue calculada usando el gen constitutivo 18s. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión comparado con muestras sin tratamiento, las cuales son igual al 100%. Se muestra la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes con una P < 0.01 de significancia estadística, comparada con las células sin tratamiento.

Para evaluar si el estrés oxidativo inducido por las NPs-TiO₂ puede dañar otras moléculas biológicas, la lipoperoxidación se evaluó cuantificando la oxidación del ácido cis-parinámico. Las NPs-TiO₂ disminuyeron la fluorescencia del ácido cis-parinámico después de 2 h de exposición, encontrando el máximo efecto a 24 h en ambas líneas celulares (Fig. 9), indicando oxidación y daño de lípidos de membrana.

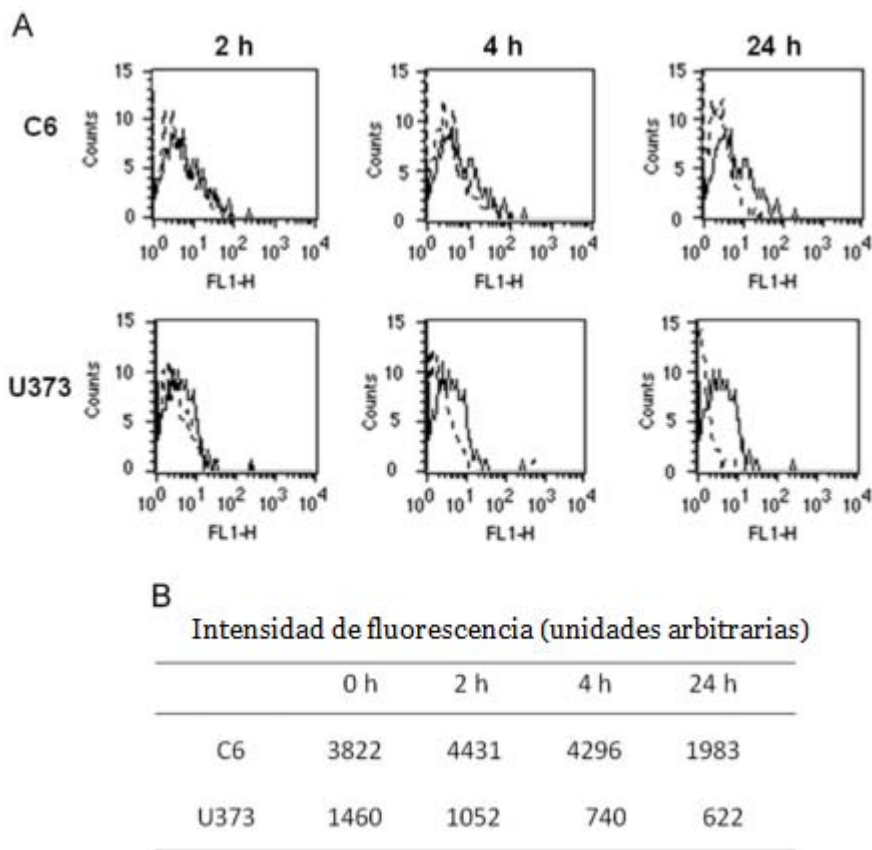


Figura 9. Efecto de las NPs-TiO₂ en la peroxidación de lípidos. (A) Las células C6 y U373 fueron tratadas con 20 µg/cm² de NPs-TiO₂ por tiempos de 2, 4 y 24 h, y la peroxidación lipídica se evaluó usando ácido cis-parinarico por medio de citometría de flujo. Las líneas continuas corresponden a las células control sin tratamiento, y las líneas punteadas corresponden a las células tratadas. (B) La intensidad de la fluorescencia, representada como unidades arbitrarias, se calculó multiplicando el número de eventos por la media del valor de la intensidad de la fluorescencia. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

5.2.- Las NPs-TiO₂ despolarizan la membrana mitocondrial.

La función mitocondrial contribuye a la producción esencial de las ERO necesaria para los procesos celulares redox-dependientes. Para determinar si las NPs-TiO₂ pueden inducir despolarización de la mitocondria en células

gliales, nosotros usamos una prueba fluorescente (Rh123) para evaluar el daño en la mitocondria y su función. Las NPs-TiO₂ indujeron un decremento en la fluorescencia desde las 2 h de tratamiento en las células U373, así como en las células C6 a las 6 h (Fig. 10). Esta reducción en la fluorescencia es un indicador de pérdida de la función mitocondrial.

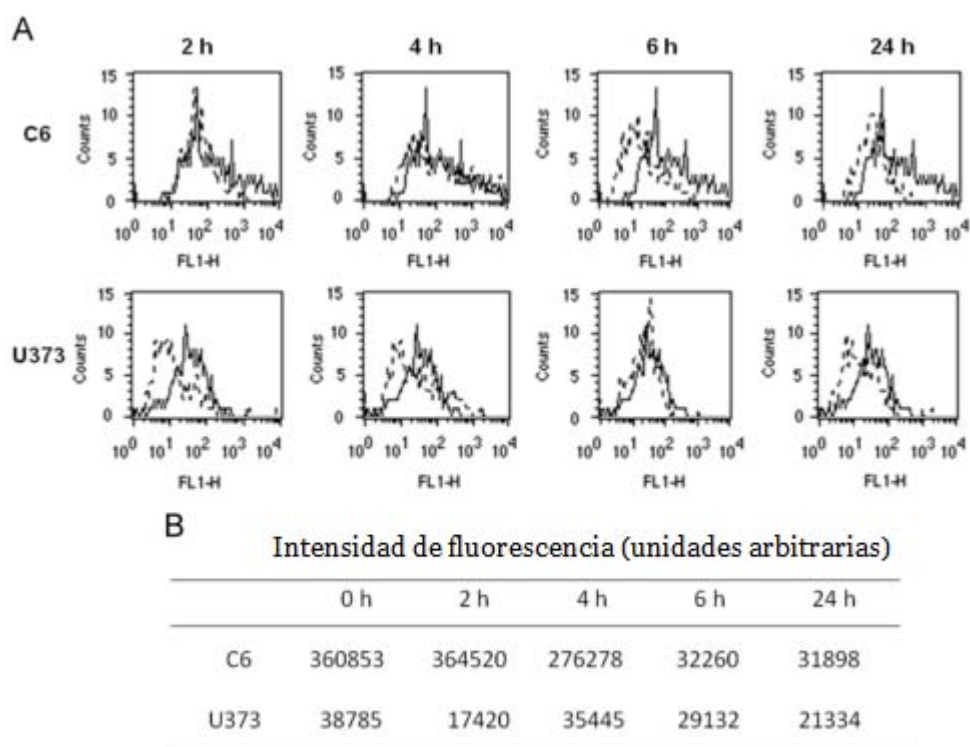


Figura 10. Efecto de las NPs-TiO₂ en el potencial de membrana mitocondrial. (A) Las células C6 y U373 se cultivaron con 20 µg/cm² por tiempos de 2, 4, 6 y 24 h. Después del tratamiento, las células se tiñeron con la Rh123 y el incremento se determinó por citometría de flujo como se describió en la metodología. Los resultados se muestran como histogramas, en los cuales las líneas punteadas representan a las células tratadas y las líneas continuas a las células sin tratamiento (Control). (B) La intensidad de la fluorescencia, representada como unidades arbitrarias, se calculó multiplicando el número de eventos por la media del valor de intensidad de fluorescencia. Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

6.- DISCUSIÓN

Debido a que las NPs-TiO₂ pueden translocarse hacia el sistema nervioso central, se consideró importante evaluar su posible efecto citotóxico en las células gliales, las cuales son el principal componente en el sistema antes mencionado, y que son las que proveen soporte y protección a las neuronas. Muchos estudios de toxicidad en astrocitos usando cultivos celulares primarios, o bien en líneas celulares permanentes (astrocitomas), han sido ampliamente reportados en la evaluación de la toxicidad, así como para entender los mecanismos de acción de numerosas sustancias neurotóxicas (Pentreath *et al.*, 2000). En este trabajo se utilizaron líneas celulares de astrocitomas, una de humano (U373) y otra de ratón (C6).

Se encontró que las NPs-TiO₂ indujeron un estrés oxidativo en ambas líneas celulares mediante cambios en el estado redox de las células, el cual se correlaciona con un incremento en la síntesis del mARN de las enzimas antioxidantes y la lipoperoxidación. El estrés oxidativo inducido por las NPs-TiO₂ en las células gliales es consistente con otros estudios, donde las NPs-TiO₂ causaron la formación intracelular de las ERO en células neuronales y gliales derivadas de un cultivo celular de corteza frontal primaria después de 24 h de exposición (Gramowski *et al.*, 2010). Otros autores han mostrado la inducción de estrés oxidativo mediado por las ERO por exposición a las NPs-TiO₂ en otros tipos celulares como son las células embrionarias de riñón humano (Meena *et al.* 2012), macrófagos de ratón (Zhang *et al.* 2013), queratinocitos humanos HaCat (Jaeger *et al.*, 2012), células de hepatoma

humano HepG2 (Petróvic *et al.*, 2010), células PC12 (Liu *et al.*, 2012), fibroblastos de pulmón humano (Bhattacharya *et al.*, 2009) y células endoteliales humanas (Montiel-Dávalos *et al.*, 2012). El estrés oxidativo inducido por las NPs-TiO₂ se ha correlacionado también con la peroxidación de lípidos la cual incrementa las concentraciones del malondialdehído, con un daño oxidativo del ADN mitocondrial, con alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, y con un aumento en la síntesis de mRNA que codifica para enzimas antioxidantes como la SOD2 (Jaeger *et al.* 2012, Liu *et al.*, 2010, Gurr *et al.*, 2005, Xue *et al.*, 2013).

El incremento en la expresión del mRNA de los genes de enzimas antioxidantes tales como la GPx, la catalasa y la SOD2 después de 24 h de exposición a las NPs-TiO₂, y el regreso a los niveles basales a tiempos tardíos en células gliales, sugiere que existe una respuesta antioxidante primaria contra las NPs-TiO₂, seguida de una respuesta adaptativa de las mismas (Figs. 6 y 7). Estas observaciones se basan en reportes previos que han mostrado una respuesta adaptativa en tejido pulmonar después de una prolongada exposición a las NPs-TiO₂ (Sun *et al.*, 2012). Por otro lado, el incremento en los niveles de mRNA de genes antioxidantes no necesariamente indica un incremento en la síntesis o actividad de las enzimas que traduce; no obstante, los resultados obtenidos muestran que las NPs-TiO₂ inducen una regulación a la alza de la actividad de los genes involucrados en la respuesta contra el estrés oxidativo, lo cual puede ser inducido por cambios en el estado redox de la célula y por un incremento de

las ERO. Por ejemplo, el H_2O_2 , considerado como una ERO, es un sustrato de la GPx y la catalasa; mientras que el $\text{O}_2^{\cdot-}$, considerado también como una ERO, es el sustrato de la SOD. Por lo tanto, se sugiere que estas enzimas se incrementan a la par de la generación de las ERO. El H_2DCFDA puede ser oxidado por el H_2O_2 , hidroperóxidos orgánicos, óxido nítrico, peroxinitritos, iones metálicos y $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por lo tanto, la medición de la oxidación del H_2DCFDA es solo una aproximación de la tasa de producción de las ERO dentro de las células; y el cambio en el estado redox inducido por las NPs- TiO_2 en las células gliales, indica un alto índice de estrés oxidativo, el cual puede ser causado por el incremento en la formación de las ERO (Rastogi *et al.*, 2010).

En cuanto al $\text{O}_2^{\cdot-}$, este radical libre es el sustrato de las SOD. Además del aumento en la producción de la SOD2 observado en este trabajo, el ensayo de la reducción del MTT inducida probablemente por el aumento en la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ da también sustento a la idea del aumento de este radical libre. Este ensayo se usa comúnmente como una prueba de viabilidad celular, sin embargo, se ha comprobado que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ liberado por las células en presencia de las NPs- TiO_2 también puede reducir a las sales de tetrazolio como el MTT a formazán (Wang *et al.*, 2011). Por lo tanto, al realizar este ensayo a la par de un ensayo que mide la proliferación celular de manera directa o indirecta (como la tinción con cristal violeta en este último caso),

puede indicar generación de $O_2^{\cdot-}$ y por lo tanto, de estrés oxidativo. (Gomez *et al.*, 1996).

Un posible mecanismo involucrado en el estrés oxidativo inducido por las NPs-TiO₂, puede ser un proceso descrito recientemente denominado como “liberación de las ERO inducida por las ERO” (RIRR), proceso implica la apertura del transición canal aniónico de la membrana interna (IMAC), un canal sensible a las ERO del cual se tiene noción es un mediador del flujo de $O_2^{\cdot-}$ (Moltoch *et al.*, 2015), o bien de la apertura del poro de transición de la permeabilidad (MPT) cuya función es desahogar protones para acelerar el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria despolarizando la membrana . El estrés oxidativo excesivo resulta entonces, en un aumento de las ERO (Zorov *et al.*, 2006). Este proceso constituye una retroalimentación positiva para potenciar la producción de las ERO, llevando a un daño de la mitocondria y de la célula, el cual se correlaciona con el fuerte daño mitocondrial inducido por las NPs-TiO₂ en las células gliales, ya que por su pequeño tamaño y sus características particulares se cree pueden catalizar reacciones dentro de la célula que inducen la liberación inicial de las ERO. Una molécula responsable del incremento de las ERO es el factor nuclear de transcripción kappa B (NF-κB). El principal mecanismo por el cual la actividad del NF-κB puede tener impacto en los niveles de las ERO, es a través del incremento en la expresión de enzimas antioxidantes (Siomek, 2012), el cual se observa en los resultados aquí presentados. Esto concuerda con un trabajo previo de nuestro equipo de trabajo, en el cual se

muestra que las NPs-TiO₂ inducen la translocación nuclear del NF-κB, así como un decremento de la expresión de su inhibidor (IκB-α) en células endoteliales (Montiel-Dávalos *et al.*, 2012).

Las ERO generadas durante el estrés oxidativo son importantes mediadores de la expresión de genes de enzimas antioxidantes; por lo tanto, el incremento en la expresión de los genes de la GPx, la catalasa y la SOD2 después de la exposición a las NPs-TiO₂ a tiempos cortos, puede ser consecuencia de un incremento de las ERO, porque a tiempos de exposición prolongados (después de 24 h), el estrés oxidativo así como la expresión de mRNA codificante para enzimas antioxidantes decrece (Fig. 6 y 7). Sumado a esto, un patrón similar se observa en la peroxidación de lípidos, la cual se incrementa al inicio de la exposición a las NPs-TiO₂, y decrece hacia el final de las 24 h (Fig. 8).

Otros estudios han mostrado un incremento del estrés oxidativo inducido por las NPs-TiO₂ asociado con el decremento del glutatión (GSH) y la expresión de la SOD en células de fibroblasto de ratón L929 (Jin *et al.*, 2008), y con la reducción de la SOD y el incremento del malondialdehído en queratinocitos de humano HaCat (Gurr *et al.*, 2005). Otros eventos, tales como la activación de los *check-points* de daño al ADN y la regulación positiva de proteínas como p53, Mdm2, gadd45α y p21, se han observado a la par de la generación de las ERO por estas NPs en linfocitos de sangre periférica (Kang *et al.*, 2008), así como el incremento en la transcripción de mediadores proinflamatorios de señalización celular en otras células (Stone

et al., 2007); por lo tanto, sería muy interesante evaluar si algunas de las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular se alteran en las células gliales.

Si la exposición a las NPs-TiO₂ induce estrés oxidativo y por otro lado, es bien conocido que la mitocondria es una de las principales fuentes de las ERO bajo condiciones de dicho estrés, era importante investigar también si las NPs-TiO₂ podían también inducir alteraciones mitocondriales en las células gliales. Las NPs-TiO₂ causaron la despolarización mitocondrial después de 24 h de exposición. Teniendo en cuenta que la liberación del citocromo C es seguida por una despolarización mitocondrial, se sugiere que la liberación del citocromo C pudiera estar asociada con esta alteración mitocondrial. Sumado a esto, la despolarización mitocondrial observada en las células gliales puede llevar a un decremento en el consumo de oxígeno y los niveles de NADH en la mitocondria, por lo que las NPs-TiO₂ pueden causar estas alteraciones en mitocondrias aisladas (Freyre-Fonseca *et al.*, 2011). Además, la despolarización mitocondrial en células C6 y U373 lleva a la activación de la caspasa-3, la condensación de la cromatina y la apoptosis (Zanotto-Filho *et al.*, 2012). En este punto, es importante destacar que todas las alteraciones celulares inducidas por las NPs-TiO₂ observadas en este trabajo, incluidas un cambio en el estado redox, un decremento de las defensas antioxidantes y la despolarización mitocondrial, pueden activar vías apoptóticas (Freyre-Fonseca *et al.*, 2011). Un reporte previo realizado por nuestro grupo de trabajo usando células gliales expuestas a las NPs-TiO₂

mostró inhibición de la proliferación, cambios morfológicos y muerte por apoptosis (Marquez-Ramirez *et al.*, 2012). Un proceso de autofagia ha sido también inducido por NPs en células endoteliales derivadas del cerebro humano (Halamoda *et al.*, 2012).

Los efectos tóxicos inducidos por las NPs-TiO₂ se han relacionado con su concentración y con su tamaño pequeño. Muchos estudios han demostrado que células diferentes pueden estar sujetas a un mismo efecto a muy diferentes concentraciones de las NPs-TiO₂ en el intervalo de 5 a 1000 µg/ml (Valant *et al.*, 2012). Esta discrepancia puede atribuirse a diferencias en la sensibilidad secundaria de cada línea celular a las NPs-TiO₂ o a la interacción de las NPs con los diferentes compuestos del medio de cultivo. Con respecto al tamaño, estudios toxicológicos *in vivo* e *in vitro* han confirmado que las partículas ultrafinas son más tóxicas y proinflamatorias que las partículas finas (Stone *et al.*, 2007). El tamaño de las NPs-TiO₂ usadas en este trabajo es alrededor de 50 nm, lo cual permite que dichas NPs puedan ser internalizadas fácilmente por las células e inducir toxicidad.

Por otro lado, la concentración usada de las NPs-TiO₂ se basó en concentraciones evaluadas previamente en modelos *in vitro*, en los cuales se investigó sus efectos en el cerebro (Liu *et al.*, 2010, Xue *et al.*, 2012, Xia *et al.*, 2013). Aunque esta concentración es alta y difícil de encontrar en la exposición ocupacional, se considera que las NPs-TiO₂ ejercen efectos tóxicos a exposiciones continuas, debido a que muchos estudios han mostrado que estas NPs se acumulan dentro de las células como agregados

en vesículas citosólicas, vacuolas y cuerpos lamelares y que el número de agregados incrementa con el tiempo o con la dosis (Halamoda *et al.*, 2012; Belade *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2007). Además, no se conoce ningún mecanismo celular para metabolizar o eliminar las NPs-TiO₂.

7.- CONCLUSIONES

Las NPs-TiO₂ inducen un fuerte estrés oxidativo mediante la alteración del estado redox de las células, al inducir la producción de radicales libres y las ERO en las mismas. Esto conlleva un aumento en la producción del mRNA de las enzimas antioxidantes como la SOD, la catalasa y la GPx, así como también daño a nivel de lípidos así como alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial tanto en las células C6 como en las U373 (Fig. 10).

Todos los cambios observados fueron notorios a tiempos de exposición cortos y van aminorando al transcurrir el tiempo, indicando una probable respuesta hormética de las células al daño oxidante inducido por las NPs-TiO₂. Así mismo, las células C6, presentaron en general la sobreexpresión de genes de enzimas antioxidantes a tiempos más cortos, así como daños al potencial de membrana mitocondrial a periodos más largos que las células U373, no obstante la inducción del estrés oxidativo y la lipoperoxidación se observaron a intervalos de tiempo de exposición similares en ambas líneas celulares (Fig. 11).

Sin duda, uno de los aportes más importantes de este trabajo es dar más evidencia del daño que el manejo y uso de las NP-TiO₂ puede desatar a nivel celular en aquellos individuos expuestos a este material a intervalos de tiempo prolongados, y buscar con ello la regulación y un mayor control en la fabricación de artículos que conlleven el contacto con las NP-TiO₂. Aun hay mucho que investigar sobre todos los mecanismos celulares que las NP-TiO₂

podiesen estar afectando, por lo que es necesario continuar los diferentes eventos ligados al daño celular que las NP-TiO₂ podiesen inducir.

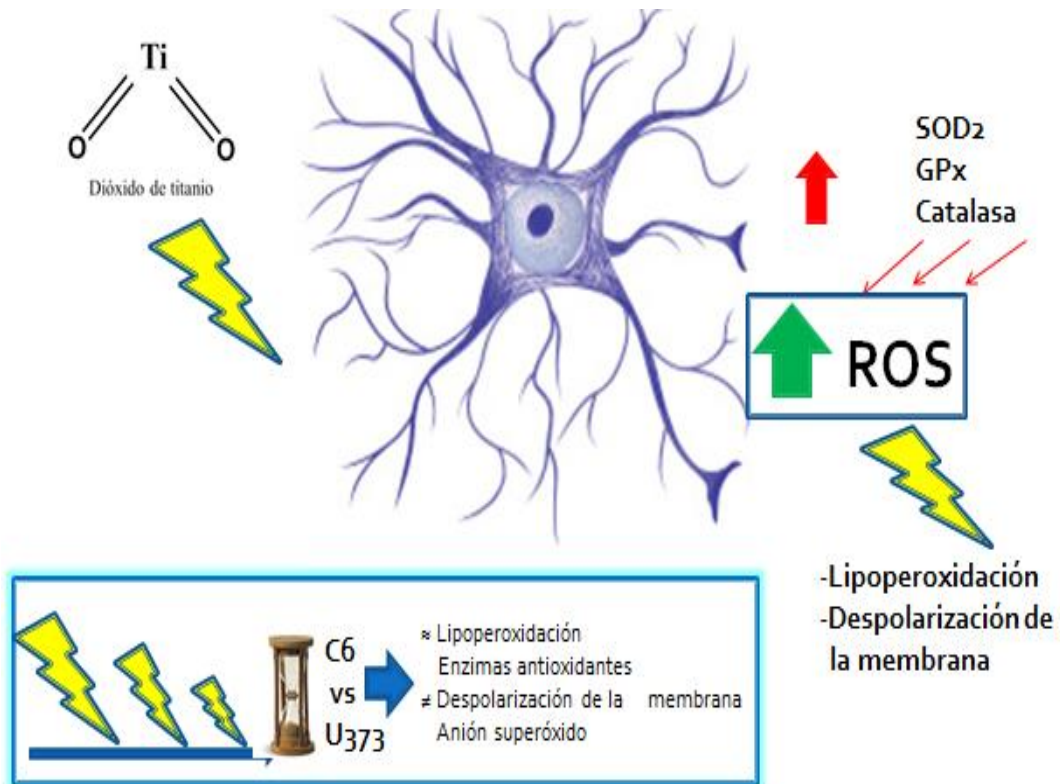


Figura 11. Inducción de estrés oxidativo y daño mitocondrial inducido por las NPs-TiO₂ en células gliales. Se puede observar al centro la reproducción gráfica de una célula de glía a la cual se le trata con NPs-TiO₂. Esto aumenta la producción de ERO que a su vez incrementa la expresión de genes de enzimas antioxidantes y conlleva además a daños en los lípidos y alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial. En la parte inferior, se muestra gráficamente la tendencia de la disminución de estas manifestaciones de daño al pasar el tiempo, así como los eventos que ocurren ya sea casi al mismo tiempo o bien en tiempos diferentes, en las células C6 y U373.

LITERATURA CITADA

- Alfadda, A.A.; Sallam, R.M. Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:1–14; 2012.
- Belade, E.; Armand, L.; Martinon, L.; Kheuang, L.; Fleury-Feith, J.; Baeza-Squiban, A.; Lanone, S.; Billon-Galland, M.A.; Pairon, J.C.; Boczkowski, J. A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicol. In Vitro.* 26:57-66; 2102.
- Bhattacharya, K.; Davoren, M.; Boertz, J.; Schins, R.P.; Hoffmann, E.; Dopp, E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part. Fibre Toxicol.* 21:6-17; 2009.
- Borm, P.J.; Robbins, D.; Haubold, S.; Kuhlbusch, T.; Fissan, H.; Donaldson, K.; Schins, R.; Stone, V.; Kreyling, W.; Lademann, J.; Krutmann, J.; Warheit, D.; Oberdorster, E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part. Fibre Toxicol.* 14:3–11; 2006.
- Cárdenas-Rodríguez, N.; Medina-Campos, O.N.; Pedraza-Chaverri, J. Glutación peroxisomas: Una familia de enzimas; en Koninsberg, M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno, primera edición. 201-215; 2008.

- Chirino, Y.; Orozco-Ibarra, M.; Pedraza-Chaverri, J. Role of peroxy nitrite anion in different diseases. *Rev. invest. clín.* 58(4): 350-358; 2006.
- Corrêa, J.M.; Mori, M.; Sanches, H.L.; da Cruz, A.D.; Poiate, E.; Poiate; Venturini, A. Silver Nanoparticles in Dental Biomaterials. *International Journal of Biomaterials.* 485275. doi:10.1155/2015/485275; 2015.
- European Commission. European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours in foodstuffs. *Off. J. Eur. Communities.* L237:13-29; 1994.
- Freyre-Fonseca, V.; Delgado-Buenrostro, N.L.; Gutiérrez-Cirlos, E.B.; Calderón-Torres, C.M.; Cabellos-Avelar, T.; Sánchez-Pérez, Y.; Pinzón, E.; Torres, I.; Molina-Jijón, E.; Zazueta, C.; Pedraza-Chaverri, J.; García-Cuéllar, C.M.; Chirino, Y.I. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol. Lett.* 25:111-119; 2011.
- Gomez, E.O.; Mendoza-Milla, C.; Ibarra-Sanchez, M; Ventura-Gallegos J.L.; Zentella, A. Ceramide reproduces late appearance of oxidative stress during TNF-mediated cell death in L929 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228: 505-509.
- Gómez, L.E.; Cuevas, D.B. Superóxido Dismutasa; en Koninsberg, M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno, primera edición. 169-182; 2008.

- Gramowski, A.; Flossdorf, J.; Bhattacharya, K.; Jonas, L.; Lantow, M.; Rahman, Q.; Schiffmann, D.; Weiss D.G.; Dopp, E. Nanoparticles induce changes of the electrical activity of neuronal networks on microelectrode array neurochips. *Environ. Health Perspect* .118:1363-1369. 2010.

- Gupta, R. K.; Patel, A. K.; Shah, N.; Chaudhary, A. K.; Jha, U. K.; Yadav, U. C. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15:4405–4409; 2014.

- Gurr, J.R.; Wang, A.S.; Chen, C.H.; Jan, K.Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology.* 213:66-73; 2005.

- Halamoda Kenzaoui, B.; Chapuis Bernasconi, C.; Guney-Ayra, S.; Juillerat-Jeanneret, L. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *Biochem. J.* 441:813-21; 2012.

- Hansberg,W. El oxígeno y sus especies reactivas; en Koninsberg, M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno, primera edición. 25-46; 2008.

- Hoet, P.H.; Brüske-Hohlfeld, I.; Salata, O.V. Nanoparticles - known and unknown health risks. *J. Nanobiotechnology.* 2:12; 2004.

- Jaeger, A.; Weiss, D.G.; Jonas, L.; Kriehuber, R. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology*. 296:27-36; 2012.
- Jin, C.Y.; Zhu, B.S.; Wang, X.F.; Lu, Q.H. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol*. 21:1871-1877; 2008.
- Kang, S.J.; Kim, B.M.; Lee, Y.J.; Chung, H.W. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*.49:399-405; 2008.
- Kinsinger, N.; Tantuccio, A.; Sun, M.; Yan, Y.; Kisailus, D. Photocatalytic titanium dioxide composite. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 11:7015–7021; 2011.
- Konigsberg, M. Cadena Respiratoria Mitochondrial; enKoninsberg, M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno, primera edición. 49-60; 2008.
- Lee, J.H.; Kim, Y.S.; Song, K.S.; Ryu, H.R.; Sung, J.H.; Park, J.D.; Park, H.M.; Song, N.W.; Shin, B.S.; Marshak, D.; Ahn, K.; Lee, J.E.; Yu, I.J. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part. Fibre Toxicol*. 10:36–51;2013.
- Liu, Y.; Xu, Z.; Li, X. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in rat neuroglia cells. *Brain Inj*. 27:934–939; 2013.

- Liu, S.; Xu, L.; Zhang, T.; Ren, G.; Yang, Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology*. 267:172-177; 2010.

- Ma, L.; Liu, J.; Li, N.; Wang, J.; Duan, Y.; Yan, J.; Liu, H.; Wang, H.; Hong, F. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials* 31:99–105; 2010.

- Márquez-Ramírez, S.G.; Delgado-Buenrostro, N.L.; Chirino, Y.I.; Iglesias, G.G.; López-Marure, R. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology* 302:146–156; 2012.

- Meena, R.; Rani, M.; Pal, R.; Rajamani, P. Nano-TiO₂-induced apoptosis by oxidative stress-mediated DNA damage and activation of p53 in human embryonic kidney cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167:791-808; 2012.

- Motloch, L.; Hu, J.; Akar, F. The Mitochondrial Translocator Protein and Arrhythmogenesis in Ischemic Heart Disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* Article ID 234104, 8 pages, 2015. doi:10.1155/2015/234104; 2015.

- Montiel-Dávalos, A.; Ventura-Gallegos, J.L.; Alfaro-Moreno, E.; Soria-Castro, E.; García-Latorre, E.; Cabañas-Moreno, J.G.; Ramos-Godínez, M.D.; López-Marure, R. TiO₂ nanoparticles induce dysfunction and

activation of human endothelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 25:920–930; 2012.

- Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113:823–839; 2005.

- Pentreath V, W.; Slamon N, D. Astrocyte phenotype and prevention against oxidative damage in neurotoxicity. *Human Exptl. Toxicol.* 19:641-649; 2000.

- Peraza, L. Catalasa; en Koninsberg, M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno, primera edición. 183-199; 2008.

- Peters, R.J.; van Bommel, G.; Herrera-Rivera, Z.; Helsper, H.P.; Marvin H.J.; Weigel, S.; Tromp, P.C.; Oomen, A.G.; Rietveld, A.G.; Bouwmeester, H. Characterization of Titanium Dioxide Nanoparticles in Food Products: Analytical Methods To Define Nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 62:6285–6293; 2014.

- Petković, J.; Zegura, B.; Stevanović, M.; Drnovšek, N.; Uskoković, D.; Novak, S.; Filipič, M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology.* 5:341-353; 2011.

- Rastogi, R.P.; Singh, S.P.; Häder, D.P.; Sinha, R.P. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem Biophys Res. Commun.* 397:603-7, 2010.
- Shimizu, M.; Tainaka, H.; Oba, T.; Mizuo, K.; Umezawa, M.; Takeda, K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part. Fibre Toxicol.* 6:20–27; 2009.
- Shedova, A.A.; Kagan, V.E. The role of nanotoxicology in realizing the 'helping without harm' paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. *J. Intern. Med.* 267: 106–118; 2010.
- Singh, S; Shi, T; Duffin, R.; Albrecht, C.; van Berlo, D.; Höhr, D.; Fubini, B.; Martra, G.; Fenoglio, I.; Borm, P.J.; Schins, R.P. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *ToxicolAppl Pharmacol.*222:141-51; 2007
- Siomek A. NF-κB signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim. Pol.* 59:323-31; 2012.

- Smith, J.A.; Park, S.; Krause, J.S.; Banik, N.L. Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 62:764–775; 2013.
- Stone, V.; Johnston, H.; Clift, M.J. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience.* 6:331-340; 2007.
- Sun, Q.; Tan, D.; Ze, Y.; Sang, X.; Liu, X.; Gui, S.; Cheng, Z.; Cheng, J.; Hu, R.; Gao, G.; Liu G.; Zhu, M.; Zhao, X.; Sheng, L.; Wang. L.; Tang, M.; Hong, F. Pulmotoxicological effects caused by long-term titanium dioxide nanoparticles exposure in mice. *J. Hazard Mater.* 235-236:47-53; 2012.
- Threes G.S.; Stanislav P. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2011:4 95-112; 2011.
- Vaissier-Traussat, M.; Kreps S.; Adrie, C.; Dal’Ava, J.; Christiani D.; Polla, B. Mitochondrial Membrane Potential: A Novel Biomarker of Oxidative Environmental Stress. *Environ. Health Perspect.* 110(3): 301–305; 2002.
- Valant, J.; Lavicoli, I.; Drobne, D. The importance of a validated standard methodology to define in vitro toxicity of nano-TiO₂. *Protoplasma.* 249:493-502; 2012.

- Wang, J.X.; Li, Y.F.; Zhou, G.Q.; Li, B.; Jiao, F.; Chen, C.Y.; Gao, Y.X.; Zhao, Y.L.; Chai, Z.F. Influence of intranasal instilled titanium dioxide nanoparticles on monoaminergic neurotransmitters of female mice at different exposure time. *ZhonghuaYuFangYiXueZaZhi* 41:91–95; 2007.

- Wang, J.; Liu, Y.; Jiao, F.; Lao, F.; Li, W.; Gu, Y.; Li, Y.; Ge, C.; Zhou, G.; Li, B.; Zhao, Y.; Chai, Z.; Chen, C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* 254:82–90; 2008.

- Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol. In Vitro.* 25:2147–51; 2011.

- Warheit, D.B.; Hansen, J.F.; Yuen, I.S.; Kelly, D.P.; Snajdr, S.; Hartsky, M.A. Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in pulmonary and macrophage clearance impairments. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145:10–22; 1997.

- Weir, A.; Westerhoff, P.; Fabricius, L.; Hristovski, K.; van Goetz, N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* 46: 2242–2250; 2012.

- Xia, T.; Hamilton, R.F.; Bonner, J.C.; Crandall, E.D.; Elder, A.; Fazlollahi, F.; Girtsman, T.A.; Kim, K.; Mitra, S.; Ntim, S.A.; Orr, G.; Tagmount, M.; Taylor, A.J.; Telesca, D.; Tolic, A.; Vulpe, C.D.; Walker, A.J.; Wang, X.; Witzmann, F.A.; Wu, N.; Xie, Y.; Zink, J.I.; Nel, A.; Holian

A. Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environ. Health Perspect.* 121:683-90; 2013.

- Xue, C.; Wu, J.; Lan, F.; Liu, W.; Yang, X.; Zeng, F.; Xu, H. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J. Nanosci. Nanotechnol.*10:8500-8507; 2010.

- Xue, Y.; Wu, J.; Sun, J. Four types of inorganic nanoparticles stimulate the inflammatory reaction in brain microglia and damage neurons in vitro. *Toxicol. Lett.* 214:91-8; 2012.

- Zanotto-Filho, A.; Braganhol, E.; Battastini, A.M.; Moreira, J.C. Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NF kappa B pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling. *Invest. New Drugs.* 30:2252-2262; 2012.

- Ze, Y.; Hu,R.; Wang, X.; Sang,X.; Ze,X.; Li,B.; Su,J.; Wang, Y.; Guan, N.; Zhao, X.; Gui, S.; Zhu, L.; Cheng, Z.; Cheng, J.; Sheng, L.; Sun, Q.; Wang, L.; Hong, F. Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102: 470–478;2014.

- Zenteno, T.; Saldaña, Y. Daño a lípidos; en Koninsberg, M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno, primera edición. 135-146; 2008.
- Zhang, J.; Song, W.; Guo, J.; Zhang, J.; Sun, Z.; Li, L.; Ding, F.; Gao, M. Cytotoxicity of different sized TiO₂ nanoparticles in mouse macrophages. *Toxicol Ind Health*.29:523-533; 2013.
- Zmijewski, J.W.; Landar, A.; Watanabe, N.; Dickinson, D.A.; Noguchi, N.; Darley-Usmar, V.M. Cell signaling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1385–1389; 2005.
- Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J.; Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757:509-17; 2006.

APÉNDICE:

ARTÍCULO PUBLICADO



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells



Elizabeth Huerta-García^{a,b,1}, José Antonio Pérez-Arizti^{a,1},
Sandra Gissela Márquez-Ramírez^{a,b}, Norma Laura Delgado-Buenrostro^c,
Yolanda Irasema Chirino^c, Gisela Gutiérrez Iglesias^b, Rebeca López-Marure^{a,*}

^a Departamento de Fisiología (Biología Celular), Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," Tlalpan, CP 14080 México DF, Mexico

^b Departamento de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México DF, Mexico

^c Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2014

Received in revised form

25 April 2014

Accepted 28 April 2014

Available online 10 May 2014

Keywords:

Nanoparticles

Titanium dioxide

Glial cells

Oxidative stress

Liperoxidation

ROS

Mitochondrial damage

Free radicals

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are widely used in the chemical, electrical, and electronic industries. TiO₂ NPs can enter directly into the brain through the olfactory bulb and can be deposited in the hippocampus region; therefore, we determined the toxic effect of TiO₂ NPs on rat and human glial cells, C6 and U373, respectively. We evaluated some events related to oxidative stress: (1) redox-signaling mechanisms by oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; (2) peroxidation of lipids by *cis*-parinaric acid; (3) antioxidant enzyme expression by PCR in real time; and (4) mitochondrial damage by MitoTracker Green FM staining and Rh123. TiO₂ NPs induced a strong oxidative stress in both glial cell lines by mediating changes in the cellular redox state and lipid peroxidation associated with a rise in the expression of glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase 2. TiO₂ NPs also produced morphological changes, damage of mitochondria, and an increase in mitochondrial membrane potential, indicating toxicity. TiO₂ NPs had a cytotoxic effect on glial cells; however, more *in vitro* and *in vivo* studies are required to ascertain that exposure to TiO₂ NPs can cause brain injury and be hazardous to health.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Nanoparticles (NPs)² are a subset of nanomaterials defined as single particles with a diameter < 100 nm that can form aggregates larger than 100 nm in diameter [1]. Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are used extensively in many commercial products, including paints, cosmetics, plastics, paper, and food, as an anticaking or whitening agent [2]. It is likely that during their production, distribution, and use, TiO₂ NPs may become released into the environment and become suspended in air, representing a consumer and occupational risk in the long term, and potentially causing harm [3]. Despite this, it has been described that TiO₂ NPs are not dangerous to human health; these particles are in the breathable size range and several toxic effects have been described after their inhalation [4,5].

Tissue deposition of NPs and their toxicity are closely related to the route of exposure and, with this point of view, keratinocytes

Abbreviations: NP, nanoparticles; C6, rat brain glial tumor cell line; U373, human astrocytoma cell line grade III; GPx, glutathione peroxidase; SOD2, superoxide dismutase 2

* Corresponding author. Fax: +52 55 55 73 09 26.

E-mail address: rlmarure@yahoo.com.mx (R. López-Marure).

¹ These authors contributed equally to this work.

have been studied as the primary target of dermal exposure, lung tissue as the target for inhalation, and intestines, kidney, and liver for oral exposure. The lung is the best characterized organ regarding the toxic effects induced by TiO₂ NPs. For example, cellular uptake and distribution of TiO₂ NPs have been shown in A549 lung epithelial cells [6]. In addition, in rat pulmonary alveolar macrophages, TiO₂ NPs induce membrane and ultrastructure damage and dysfunction mediated by an increase in the phagocytic ability of macrophages and a decrease of their chemotactic ability [7]. All the reported effects induced by TiO₂ NPs are associated with adverse effects on mammalian cells such as increase in reactive oxygen species (ROS) production and cytokine levels, reduction in cell viability and proliferation, induction of apoptosis, and genotoxicity [8].

TiO₂ NPs can be translocated to all regions of the respiratory tract. Their small size facilitates uptake into cells and transcytosis across epithelial and endothelial cells into the blood and lymph circulation to reach potentially sensitive target sites, such as bone marrow, lymph nodes, spleen, and heart [9]. However, there is increasing evidence that NPs can cross the blood–brain barrier independent of the route of exposure. In this regard, it has been demonstrated that even after 4 months of oral exposure, NPs can

persist in the brain [10]. Specifically, nasal exposure to TiO₂ NPs can not only allow for their deposition in the brain [11] and induce release of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α [12], but can also induce alterations in genes related to memory formation and learning [13]. Recently, it was reported that instilled TiO₂ NPs enter the brain directly through the olfactory bulb during the whole exposure period and are deposited in the hippocampus region, causing significant pathologic changes [14], as well as the release of monoaminergic neurotransmitters in the brain [15]. One study showed that TiO₂ NPs injected into the abdominal cavity can be translocated into the brain and, in turn, cause brain injury [16]. In addition, maternal exposure of mice to TiO₂ NPs affected the expression of genes related to the development and function of the central nervous system (CNS) [17]. In brain microglia (BV2) exposed to noncytotoxic (2.5–120 ppm) concentrations of TiO₂ NPs a rapid and sustained release of ROS occurs [18].

Oxidative stress, which is an imbalance between ROS production and the antioxidant systems favoring a ROS excess, has been identified as an important contributor to neurodegeneration associated with acute CNS injuries, such as DNA damage, which can affect viability of cerebral cells [19]. During oxidative stress, ROS are produced mainly from the mitochondrial electron transport chain. Several molecules/factors have been suggested as regulators of mitochondrial ROS production, including an elevated inner membrane potential, as well as of Ca²⁺ and nitric oxide (NO). The exogenous stimulators of mitochondrial ROS have not been elucidated yet, but there is evidence that lipid oxidation products play a major role [20]. At the molecular level, TiO₂ NPs induce oxidative stress by activating the Nrf2 pathway [21] but gene expression of DNA repair, immune response, and apoptosis can also be altered after intranasal exposure [13].

To minimize the damage induced by ROS, free radicals can be transformed to other less toxic molecules, for example, the superoxide anion is enzymatically converted into hydrogen peroxide by superoxide dismutase (SOD), and hydrogen peroxide may be enzymatically converted into water by catalase or glutathione peroxidase enzymes [22].

Considering that NPs can translocate into the brain, it is important to investigate the potential health effects of these particles on brain cells. We hypothesized that TiO₂ NPs could cause oxidative stress and mitochondrial damage to glial cells; therefore, we determined the effects of TiO₂ NPs on cellular redox state, lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential, integrity of mitochondria, and several antioxidant enzymes in human (U373) and rat (C6) glial cells.

Methods

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), antibiotic–antimycotic 100 \times solution, minimal essential medium (MEM) non-essential amino acids and pyruvate solutions (100 \times), 0.25% trypsin–EDTA solution, and newborn calf serum (NBCS) were purchased from Gibco/BRL (Grand Island, NY, USA). Sterile plastic material for tissue culture was from Corning (Corning, NY, USA). Flow cytometry reagents were purchased from Becton–Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, CA, USA). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) and *cis*-parinaric acid were purchased from Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Perfect RNATM, Eukaryotic, Mini solution was from Eppendorf (Hamburg, Germany). DNase was from Invitrogen. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit, the human Universal ProbeLibrary, LightCycler TaqMan master reaction mixture, and borosilicate glass capillaries were from Roche Diagnostics (Mannheim,

Germany). MitoTracker Green FM was from Invitrogen (Cat. No. M-7514). TiO₂ NPs were purchased from Paris Drugstore (Mexico City, Mexico). All other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Titanium dioxide nanoparticles

TiO₂ NPs were previously characterized by our work group [23]. TiO₂ NPs were sterilized by autoclave (1.5 atm, 20 min). A stock solution was prepared by suspending 1 mg of sterile particles in 1 ml of HEPES–phosphate buffer solution (HPBS: 150 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 10.9 mM HEPES, 12.2 mM glucose, pH 7.4), mixing in a vortex at high speed for 2 min, and sonicating at 33 W for 1 min before being used to treat cell cultures. TiO₂ NPs were characterized as used for the biological assays in supplemented medium as described below, and they were observed by means of scanning electron microscopy in a field emission scanning electron microscope (JEOL Model JSM-7401-F; see [supplementary material](#)). The size of the nanoparticles and the ζ potential were analyzed in a Zetasizer Nano Series Model ZS. For this measurement, nanoparticles were suspended in culture medium plus 10% NBCS and sonicated at 33 W for 15 min to attain a better dispersion. Additionally, nanoparticles were analyzed by X-ray diffraction to determine composition (Bruker D8 Advance with Cu K α radiation and a Lynxeye Bruker detector; Bruker, Karlsruhe, Germany; see [supplementary material](#)). Transmission electron microscopy was used to determine the uptake and internalization of TiO₂ NPs by cells. BET surface area of nanoparticles was determined in an ASAP 2050 Xtended Pressure Sorption analyzer (Micromeritics Instrument Corp., Norcross, GA, USA).

Culture of cerebral cells

U373 cells (ATCC HTB-17) were kindly provided by Dr. Ignacio Camacho Arroyo from the Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico. C6 (ATCC CCL-107) and U373 cells were cultured in DMEM supplemented with 4500 mg/L glucose, 10% NBCS, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, antibiotic–antimycotic, MEM nonessential amino acids 1 \times , as previously described [24]. Cell cultures were exposed to 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of TiO₂ NPs (concentration that was shown to have a strong biological effect on endothelial and glial cells in our previous studies) [23,25] for various times depending on the biological assay.

Determination of oxidative stress

Cellular redox state

Oxidation of H₂DCFDA into 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) was used as a redox indicator probe [26]. Redox-sensitive cellular targets provide sensitive and rapid responses to changes in metabolism and fluxes of ROS. DCFH-DA is a nonfluorescent and nonpolar dye that is converted into the polar derivative, DCFH, by cellular esterases, but it is switched to the highly fluorescent DCF when oxidized by intracellular ROS, including hydrogen peroxide, organic hydroperoxides, NO, and other peroxides, mainly peroxynitrite [27,28]. H₂DCFDA can also be oxidized directly by factors that generate oxidative stress per se, such as metal ions in high oxidation states [29]; to perform this assay, cells were cultured without or with TiO₂ NPs (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 2, 4, 6, and 24 h. H₂O₂ (500 μM) was used as positive control to induce oxidative stress. After treatment, the cells were incubated with H₂DCFDA (10 μM) for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ and washed twice with HPBS. After an extensive wash, fluorescence was evaluated by flow cytometry (FACSCalibur, Becton–Dickinson). The mean fluorescence intensity was calculated by multiplying the number of events (fluorescent

cells) by the mean of the intensity presented by the CellQuest software used for the analysis. Results are shown as percentage of fluorescence.

Antioxidant enzyme expression

Because oxidative stress is an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, which potentially lead to damage, expression of the most relevant antioxidant genes, such as GPx, catalase, and SOD2, was determined by PCR in real time.

Total RNA extraction

Total RNA from control glial cells treated with TiO₂ NPs at 20 µg/cm² was extracted using Perfect RNATM, Eukaryotic, Mini solution. Isolated RNA was quantified using the Genesys 10 series (ThermoSpectronic, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and separated (5 µg) on a 1.0% agarose gel containing ethidium bromide in Mops buffer to confirm the presence of bands and observe their integrity. Both running buffer and gel contained 0.2 M formaldehyde for denatured conditions. To prevent trace amounts of DNA contamination, RNA samples were treated with amplification-grade DNase before reverse transcription. All RNA samples were stored at –70 °C until further use.

Real-time RT-PCR assay

RNA (0.5 µg) was employed for reverse transcription with random hexamers in a 20-µl volume reaction, according to the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit, and the reactions were assayed in a Mastercycle thermocycler (Roche). The amplified cDNA was quantified on a photometer at a 260 nm length. Real-time PCRs were performed using the human Universal ProbeLibrary. Specific oligonucleotide primers and TaqMan probes were originally generated using the online assay design software (ProbeFinder; <http://www.universal-probelibrary.com>). Primers used in this work are shown in Table 1.

Samples were normalized using the housekeeping gene 18s. The amplification reaction (20 µl) contained 500 ng of cDNA synthesized previously, 1 × LightCycler TaqMan Master reaction mixture, 200 nM each primer, and 100 nM Universal ProbeLibrary probe. Real-time PCR was performed in borosilicate glass capillaries for amplification reaction in a LightCycler version 1.5 (Roche), following the protocol recommended by the manufacturer.

Table 1
Primers used in this study.

Molecule	Primer sequence	Annealing temp. (°C)
F-Catalase-r	TGTTCTCACACAGGCGTTTC	50
R-Catalase-r	GCTAATGAAGACAACGTCCTCA	50
F-SOD2-r	GACCCAAAGTCACGCTTGATA	60
R-SOD2-r	CTGGACAAAACCTGAGCCCTA	60
F-GPx-r	ATGCCTTAGGGGTTGCTAGG	55
R-GPx-r	CGACATCGAACCCGATATAGA	55
F-18s	GGGACTTAATCAACGCAAGC	50
R-18s	GCAATTAATCCCATGAACG	50
F-GPx-h	GTTCACCTCGCACTTCTCG	60
R-GPx-h	CAACCAGTTTGGGCATCAG	60
F-SOD2-h	TGATGGCTCCAGCAACTC	55
R-SOD2-h	CTGGACAAAACCTCAGCCCTA	55
F-Catalase-h	GGTCCCGAACTGTGTCA	60
R-Catalase-h	CCATCGCAGTTCGGTCT	60

F, forward; R, reverse; r, rat; h, human.

Lipid peroxidation assay

To measure the presence of lipid peroxidation we used *cis*-parinaric acid, which is an analog of endogenous membrane lipoproteins. *Cis*-parinaric acid fluorescence activity is lost when the chromophore is cleaved during oxidation; therefore, lipid peroxidation was estimated by measuring loss of *cis*-parinaric acid fluorescence. Briefly, cells were treated with TiO₂ NPs at 20 µg/cm² for 1, 2, 4, 6, and 24 h. After treatment, the cells were detached with 0.025% trypsin and incubated with 5 µM *cis*-parinaric acid at 37 °C for 1 h in the dark. Afterward, the cells were washed twice with Hepes and immediately analyzed in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton–Dickinson). The mean fluorescence intensity was calculated by multiplying the number of events (fluorescent cells) by the mean of the intensity presented by the CellQuest software used for the analysis.

Analysis of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)

The changes in mitochondrial membrane potential were examined by monitoring the staining with rhodamine 123 (Rh123), a lipophilic cation selectively taken up by mitochondria and whose uptake is directly proportional to $\Delta\Psi_m$ [30]. After 2, 4, 6, and 24 h of treatment with TiO₂ NPs at 20 µg/cm², cells were incubated with Rh123 in dimethyl sulfoxide (0.2 µg/ml) at 37 °C for 30 min and washed twice with Hepes. The cells were harvested and the fluorescence intensity was analyzed with a flow cytometer (FACS-Calibur, Becton–Dickinson) at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 530 nm, using the CellQuest software program.

Mitochondria depolarization assay

To measure mitochondrial depolarization, MitoTracker Green FM was used. This is a green-fluorescent mitochondrial stain that appears to localize to mitochondria regardless of mitochondrial membrane potential. MitoTracker fluorescence accumulates into mitochondria and binds covalently to mitochondrial proteins. MitoTracker Green FM is retained even if mitochondria depolarize subsequently, and an increase in the signal is the result of oxidative stress; therefore, mitochondrial depolarization means damage and, frequently, contributes to necrotic and apoptotic cells [31]. Human C6 and U373 cell cultures were fixed with 3% (v/v) formaldehyde in HPBS for 1 h and, then, the samples were washed three times with HPBS and permeabilized with ice-cold acetone and soaked in balanced salt solution for 7 min; immediately, the samples were washed three times with HPBS and blocked with 2% bovine serum albumin in HPBS for 2 h. Then, they were washed three times with HPBS and incubated with 75 nM MitoTracker Green FM in darkness at 37 °C for 2 h. Afterward, the samples were extensively washed with 1% HPBS–Triton and running water. The samples were mounted with glycerol:HPBS (3:1) and analyzed at 488 nm fluorescence excitation and 530 nm emission using a Leica, TCS SP-2, confocal microscope (Germany).

Nonspecific MitoTracker Green FM staining

A stock of 1 mg/ml TiO₂ NPs was prepared in supplemented DMEM. The stock was protected from light and sonicated for 15 min. A suspension of 20 µg/ml TiO₂ NPs was stained with 75 nM MitoTracker Green FM in darkness for 2 h at 37 °C. In addition, a suspension of 20 µg/ml TiO₂ NPs was incubated with HPBS and a suspension of MitoTracker Green FM in DMEM was incubated under the same above-described conditions. After incubation, all samples were washed twice with HPBS and centrifuged at 1200 g.

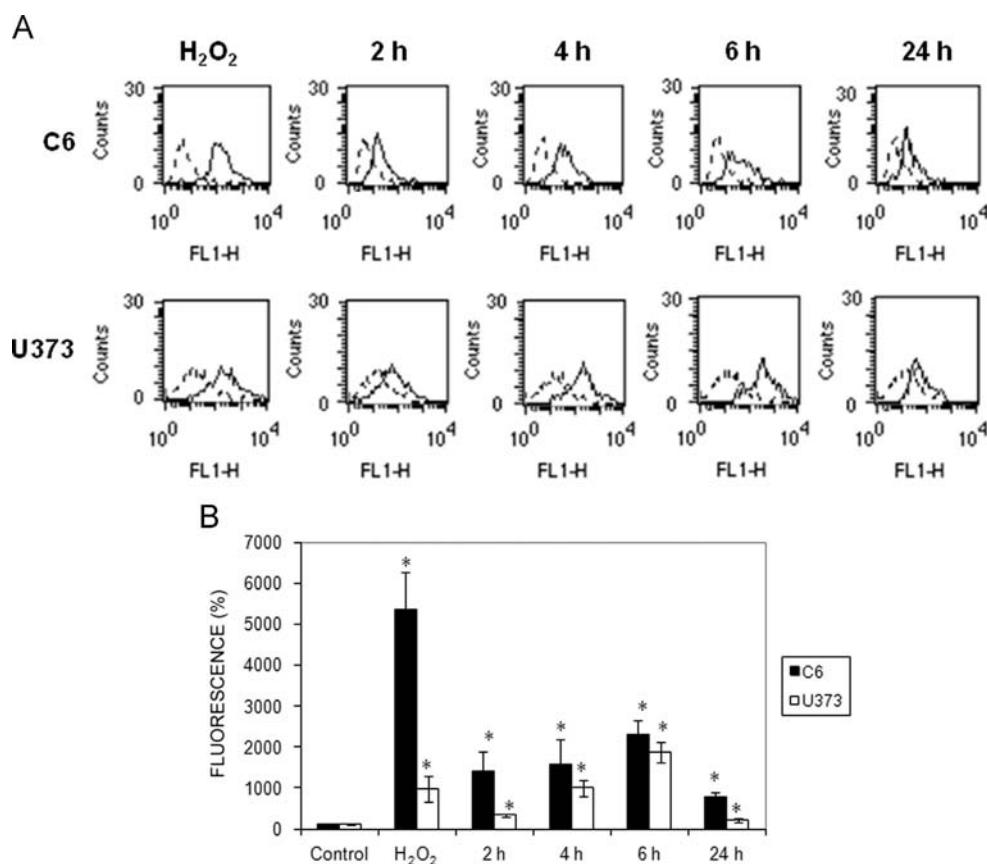


Fig. 1. Effect of TiO₂ NPs on the cellular redox state. C6 and U373 cells were treated with 20 μg/cm² TiO₂ NPs for 2, 4, 6, and 24 h, and ROS production was evaluated using H₂DCFDA through flow cytometry. Cells treated with H₂O₂ (500 μM) for 2 h were used as a positive control. (A) Histograms corresponding to a representative experiment are shown. Dashed lines correspond to control cells and continuous lines correspond to treated cells. (B) Fluorescence intensity, represented as percentage of fluorescence, where control cells are 100%, was calculated by multiplying the number of events by the mean of the fluorescence intensity value. The mean ± SD of three independent experiments is shown. **P* < 0.01, statistical significance compared to untreated cells.

Finally, the samples were mounted with glycerol:HPBS (3:1) and analyzed under confocal microscopy.

Statistical analysis

All experiments were performed in at least three independent trials. Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed with one-way analysis of variance using SPSS software version 21. A *P* value of < 0.01 was considered statistically significant.

Results

TiO₂ NPs induced oxidative stress

To determine if TiO₂ NPs could induce damage in glial cells, we determined the changes in the cellular redox state caused by oxidative stress mediating the oxidation of H₂DCFDA. TiO₂ NPs induced a strong increase in H₂DCFDA oxidation in C6 and U373 cells, in comparison with the negative control (Fig. 1). This rise was observed from 2 h after treatment, with a maximal increase at 6 h and a decrease at 24 h in both cell lines.

Considering that TiO₂ NPs induce a strong oxidative stress, the expression of some antioxidant enzyme genes was evaluated by real-time RT-PCR. In C6 cells, TiO₂ NPs increased the expression of GPx after 6 and 24 h of exposure and decreased it at longer times; catalase expression increased fivefold at 6 h and twofold at 72 h, but decreased at 24 and 48 h; last, SOD2 expression increased at

24 h and decreased at 48 and 72 h (Fig. 2). On the other hand, in U373 cells, TiO₂ NPs increased the expression of GPx, catalase, and SOD2 at 24 h of exposure; however, a decrease was found at later times (48 h for GPx and catalase and 72 h for SOD2; Fig. 3). These results indicate that there is an imbalance in the production of antioxidant enzymes induced by TiO₂ NPs.

To test if the oxidative stress induced by TiO₂ NPs could damage other biological molecules, oxidation of lipids was evaluated by measuring the oxidation of *cis*-parinaric acid. TiO₂ NPs decreased the fluorescence of *cis*-parinaric acid after 2 h of exposure, reaching the maximal effect at 24 h in both cell lines (Fig. 4), indicating oxidation and damage of membrane lipids.

Mitochondrial function contributes to the essential production of ROS necessary for redox-dependent cellular processes. We used a fluorescent probe (Rh123) to assess the damage to mitochondria and their function. TiO₂ NPs at 20 μg/cm² decreased the fluorescence of Rh123 starting at 2 h of treatment in U373 cells; however, in C6 cells, this decrease was observed starting at 6 h of treatment (Fig. 5). This reduction in the fluorescence of Rh123 indicates a loss of mitochondrial function.

TiO₂ NPs induced mitochondrial depolarization

To determine if TiO₂ NPs can induce mitochondrial depolarization in glial cells, MitoTracker Green FM was used. C6 and U373 cell cultures were treated with TiO₂ NPs for 24 and 48 h and fluorescence intensity was quantified. After TiO₂ NP exposure, C6 (Fig. 6) and U373 (Fig. 7) cells showed a clear increase in MitoTracker Green FM staining. This increase was stronger after

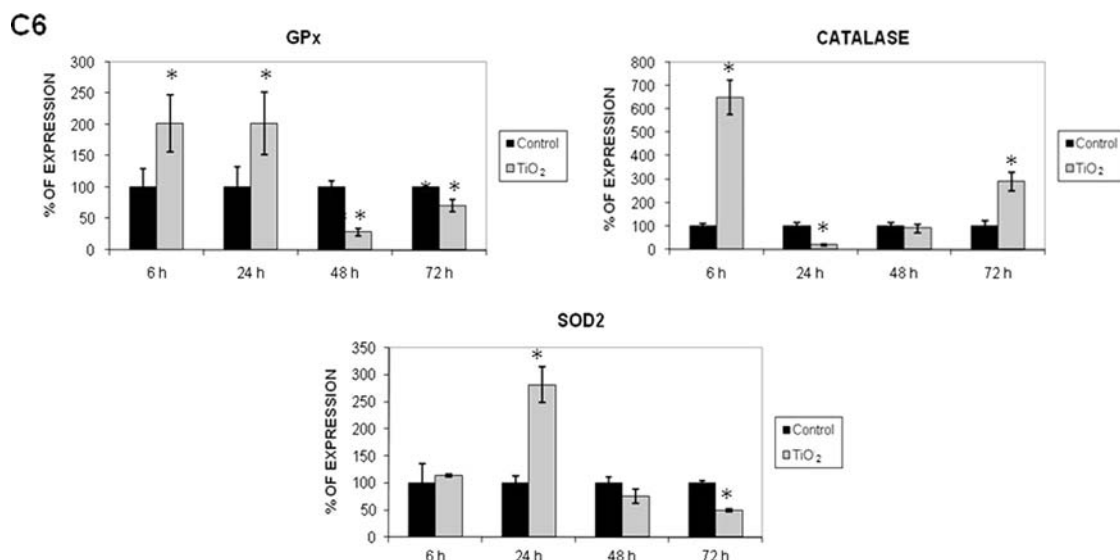


Fig. 2. Effect of TiO₂ NPs on the expression of mRNA from antioxidant enzymes. C6 cells were treated with 20 μg/cm² TiO₂ NPs for 6, 24, 48, and 72 h. Expression of GPx, catalase, and SOD2 genes was determined by real-time RT-PCR assay. Relative expression was calculated using the housekeeping gene 18s. Results are expressed as percentage of expression and are shown as relative expression compared to samples without treatment, which were equal to 100%. The mean ± SD of three independent experiments is shown. **P* < 0.01, statistical significance compared to untreated cells.

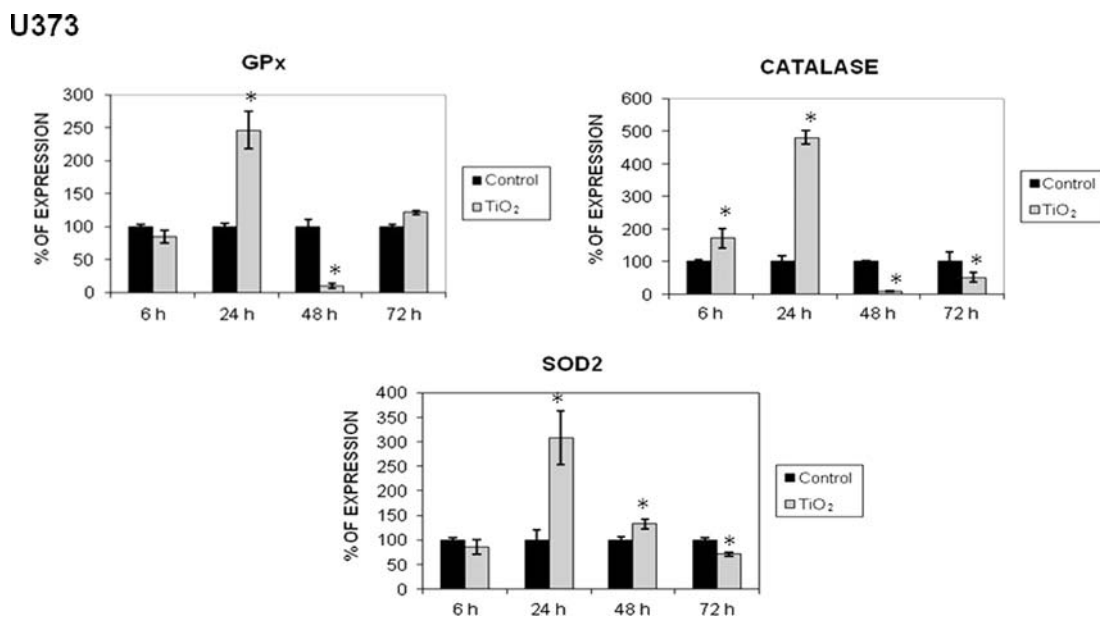


Fig. 3. Effect of TiO₂ NPs on the expression of mRNA from antioxidant enzymes. U373 cells were treated with 20 μg/cm² TiO₂ NPs for 6, 24, 48, and 72 h. The expression of GPx, catalase, and SOD2 genes was determined by real-time RT-PCR assay. Relative expression was calculated using the housekeeping gene 18s. Results are expressed as percentage of expression and are shown as relative expression compared to samples without treatment, which were equal to 100%. The mean ± SD of three independent experiments is shown. **P* < 0.01, statistical significance compared to untreated cells.

48 h of treatment in C6 cells, which exhibited a twofold increase in fluorescence (Fig. 6F). In addition, an acellular experiment was performed to test if MitoTracker Green FM was able to bind to TiO₂ NPs and discard the possibility of nonspecific MitoTracker Green FM staining. The concentration of TiO₂ NPs used in this study was selected and incubated with MitoTracker Green FM under the same conditions of cell culture staining. The result showed that TiO₂ NPs could not be stained by MitoTracker Green FM (Fig. 8).

Discussion

Because TiO₂ NPs can translocate into the CNS, we evaluated their possible toxic effect on glial cells, which are the principal

component of the CNS and provide support and protection to neurons. Several toxicity studies on astrocytes (astrocytic glial cells or astroglia) using cultures of primary, subcultured, or permanent cell lines (astrocytomas), have been extremely valuable in toxicity evaluation and to understand the mechanisms of action of a number of neurotoxic substances [32]; therefore, in this work we used human (U373) and rat (C6) astrocytoma cell lines.

We found that TiO₂ NPs induced a strong oxidative stress in both glial cells, mediating changes in the cellular redox state, which was correlated with increase in antioxidant enzyme expression and lipoperoxidation. Oxidative stress induced by TiO₂ NPs in glial cells is consistent with other studies, in which TiO₂ NPs caused intracellular formation of ROS in neuronal and glial cells derived from primary frontal cortex cell culture after 24 h of

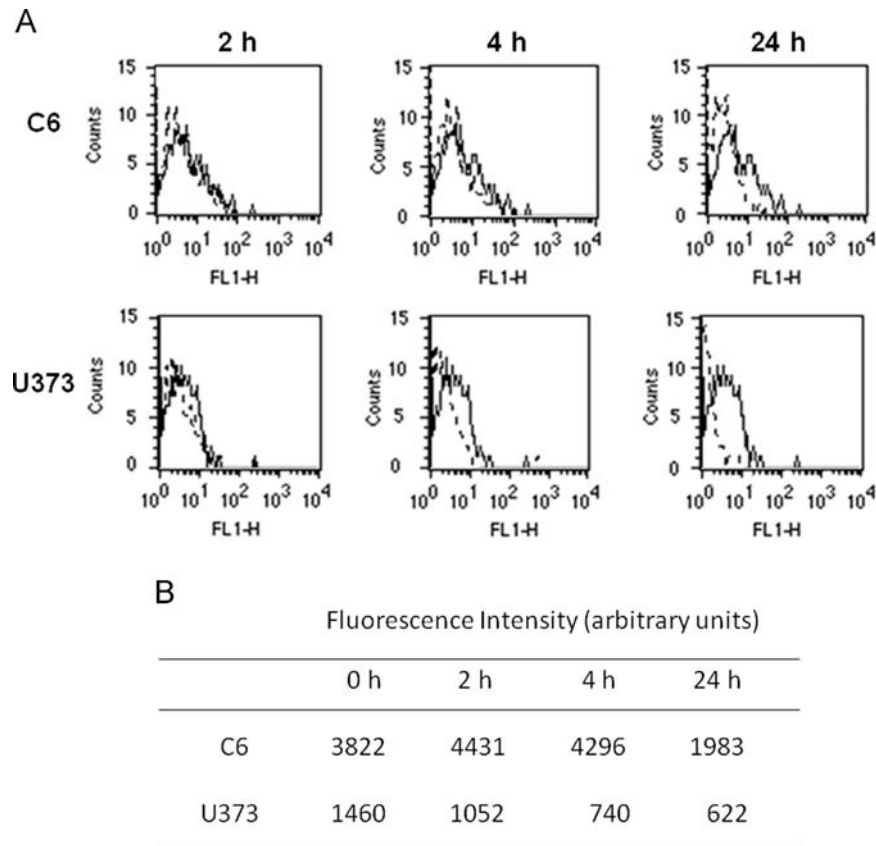


Fig. 4. Effect of TiO₂ NPs on peroxidation of lipids. (A) C6 and U373 cells were treated with 20 μg/cm² TiO₂ NPs for 2, 4, and 24 h, and lipid peroxidation was evaluated using *cis*-parinaric acid through flow cytometry. Continuous lines correspond to control cells without treatment, and dashed lines correspond to treated cells. (B) Fluorescence intensity, represented as arbitrary units, was calculated by multiplying the number of events by the mean of the fluorescence intensity value. The results shown correspond to a representative experiment of three independent assays.

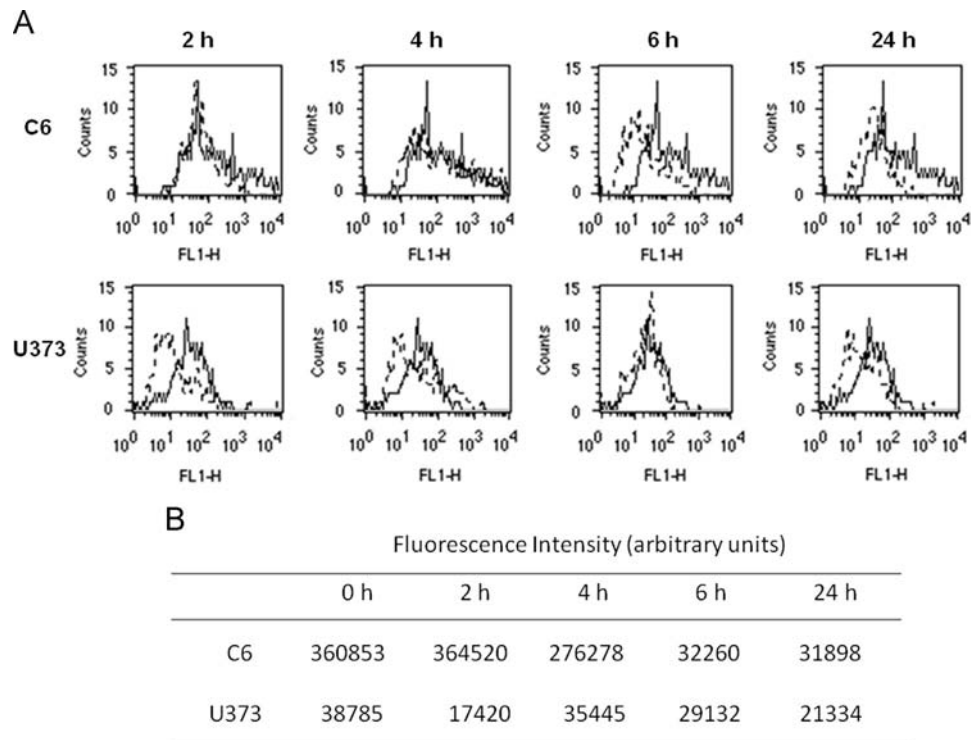


Fig. 5. Effect of TiO₂ NPs on mitochondrial membrane potential. (A) C6 and U373 cells were cultured with 20 μg/cm² TiO₂ NPs for 2, 4, 6, and 24 h. After this, the cells were stained with Rh123, and its uptake was determined by flow cytometry as described under Methods. The results are shown as histograms, in which the dotted lines represent treated cells and the continuous lines untreated cells (control). (B) Fluorescence intensity, represented as arbitrary units, was calculated by multiplying the number of events by the mean of the fluorescence intensity value. The results shown correspond to a representative experiment of three independent assays.

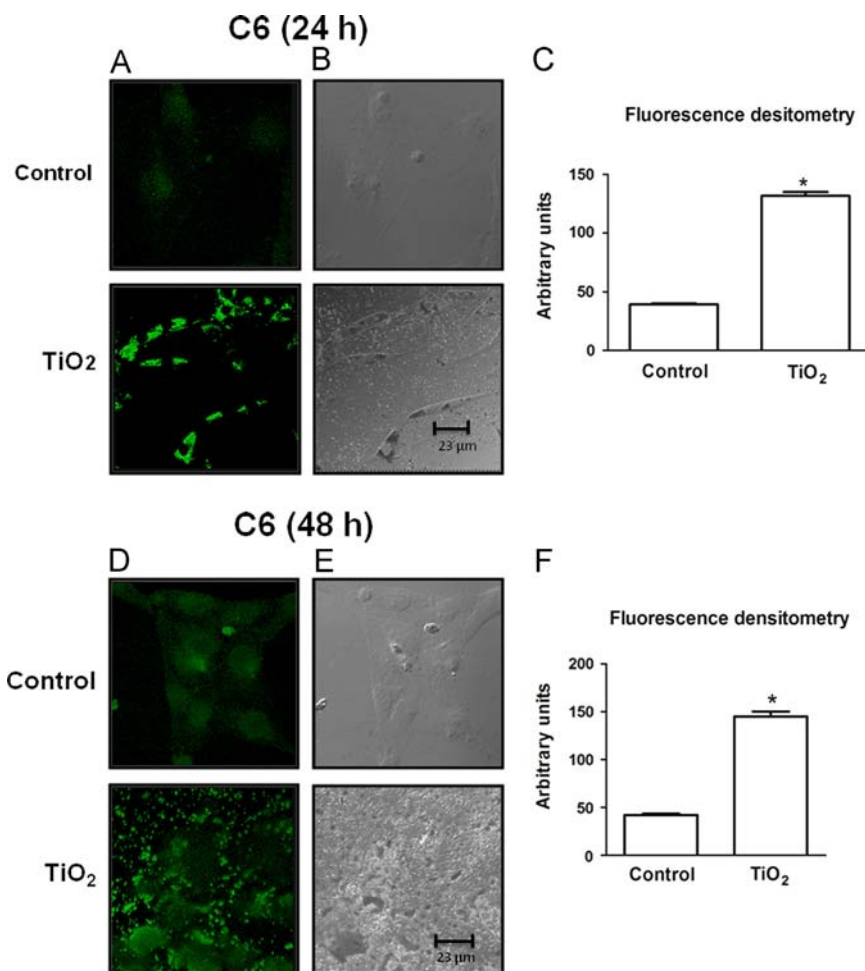


Fig. 6. Effect of TiO₂ NPs on mitochondrial depolarization of C6 cells. Cell culture was exposed to 20 μg/cm² TiO₂ NPs. Positive fluorescence of MitoTracker staining after (A) 24 h and (D) 48 h; differential interference contrast microscopy after (B) 24 h and (E) 48 h; fluorescence densitometry after (C) 24 h and (F) 48 h of treatment. Densitometry data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. **P* < 0.01, statistical significance compared with untreated cells.

exposure [33]. Other authors have shown ROS-mediated oxidative stress induced by TiO₂ NPs in other cell types, such as human embryonic kidney cells [34], mouse macrophages [35], human HaCaT keratinocytes [36], human hepatoma HepG2 cells [37], PC12 cells [38], human lung fibroblasts (IMR-90) [39], and human endothelial cells [23]. Oxidative stress induced by TiO₂ NPs also has been correlated with the peroxidation of lipids, which causes an increase in malondialdehyde (MDA), with oxidative damage of mitochondrial DNA, with alterations in the mitochondrial membrane potential, and with changes in the expression of antioxidant enzymes such as SOD2 [36,37,40,41].

Upregulation in mRNA expression of antioxidant enzymes genes such as GPx, catalase, and SOD2 after 24 h of TiO₂ NP exposure and the return to basal levels at later times in glial cells suggest that there is a first antioxidant response against TiO₂ NPs; hence, the lack of capability to upregulate mRNA could be related to an adaptive response (Figs. 2 and 3). We based this statement on a previous report that shows an adaptive response in lung tissue after long-term exposure to TiO₂ NPs [42]. On the other hand, the increase in mRNA levels of antioxidant genes does not necessarily indicate an increase in the activity of these enzymes; however, our results showed that TiO₂ NPs induced an upregulation of genes involved in the response against oxidative stress, which can be induced by changes in the redox state and by an early increase in ROS. For example, hydrogen peroxide, considered a ROS, is a substrate of GPx and catalase, and superoxide anion,

also considered a ROS, is a substrate of SOD. We suggest that these species are increased owing to ROS generation. H₂DCFDA can be oxidized in part by hydrogen peroxide, organic hydroperoxides, NO, peroxynitrite, metal ions, and superoxide anion. Because the rate of H₂DCFDA oxidation as a measure of the rate of ROS production within cells is only an approximation, the change in the redox state induced by TiO₂ NPs in glial cells indicates a strong index of oxidative stress, which could be caused by increased ROS formation [27].

A possible mechanism involved in the oxidative stress induced by TiO₂ NPs could be the recently described process named “ROS-induced ROS release”; this process involves the mitochondrial permeability transition pore and takes place on the inner membrane anion channel, inducing an excessive oxidative stress that results in an increase in ROS [43]. This process constitutes a positive feedback mechanism for enhanced ROS production, leading to potentially significant mitochondrial and cellular injury, which correlates with the strong mitochondrial damage induced by TiO₂ NPs in glial cells. One molecule responsible for ROS increase is the nuclear transcription factor κB (NF-κB). The main mechanism by which NF-κB activity can influence the level of ROS is via increased expression of antioxidant enzymes [44], which was observed in our results. This agrees with our previous work, which showed that TiO₂ NPs induced NF-κB nuclear translocation and a decrease in the expression of its inhibitor, IκB-α, in endothelial cells [23].

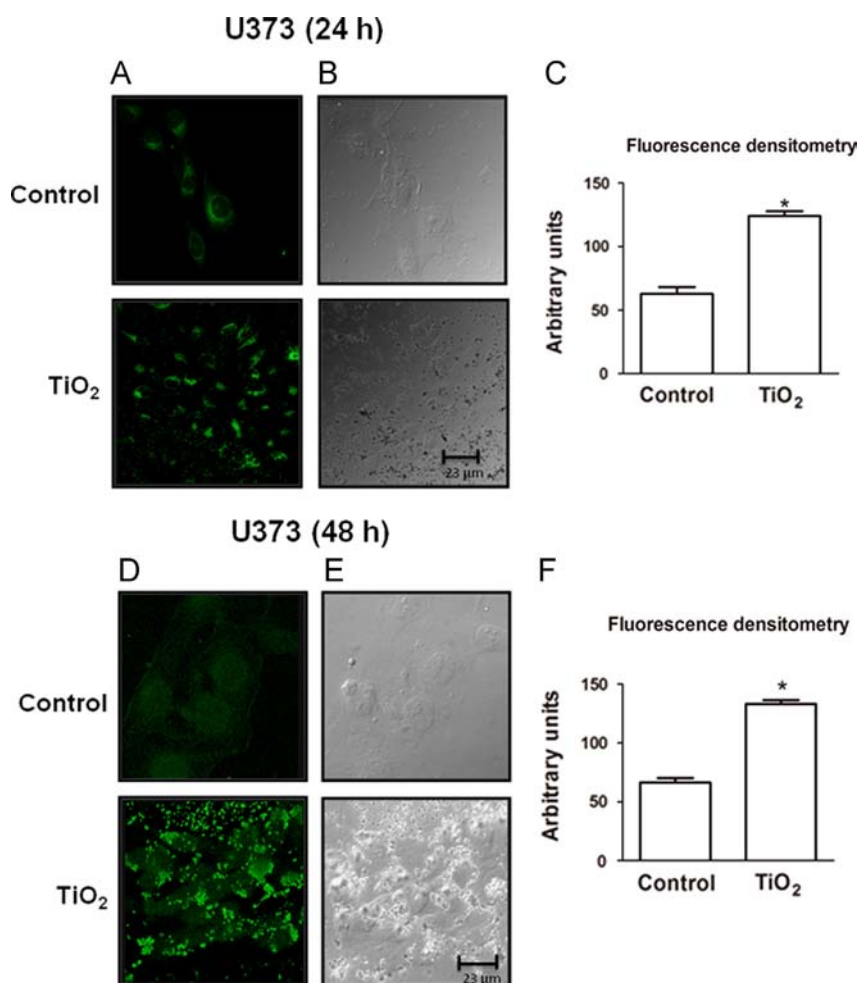


Fig. 7. Effect of TiO₂ NPs on mitochondrial depolarization of U373 cells. Cell culture was exposed to 20 μg/cm² TiO₂ NPs. Positive fluorescence of MitoTracker Green FM staining after (A) 24 h and (D) 48 h; differential interference contrast microscopy after (B) 24 h and (E) 48 h; fluorescence densitometry after (C) 24 h and (F) 48 h of treatment. Densitometry data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. **P* < 0.01, statistical significance compared with untreated cells.

ROS generated during oxidative stress are important mediators in the expression of genes of antioxidant enzymes; therefore, the upregulation of GPx, catalase, and SOD2 genes after early TiO₂ NP exposure times could be a consequence of the increase in ROS, because at late exposure times (after 24 h), oxidative stress and mRNA expression of antioxidant enzymes decrease. In addition, a similar pattern is observed in peroxidation of lipids, which increased at the beginning of TiO₂ NP exposure and decreased by the end of 24 h (Figs. 4 and 5).

Other studies have shown an increase in oxidative stress induced by TiO₂ NPs associated with a decrease in glutathione and SOD expression in mouse fibroblast cells (L929) [45], and with a reduction in SOD and increase in MDA in human keratinocyte HaCaT cells [40]. Other events, such as activation of DNA damage checkpoints and upregulation of p53, mdm2, gadd45α, and p21 proteins, have been observed due to ROS generation by these nanoparticles in peripheral blood lymphocytes [46], as well as an increased transcription of proinflammatory mediators via intracellular signaling pathways in other cells [47]; therefore, it would be very interesting to evaluate if some of the proteins involved in the regulation of the cell cycle are altered in glial cells.

Because TiO₂ NP exposure induced oxidative stress, and it is well known that mitochondria are one of the main ROS sources under oxidative stress conditions, we also investigated if TiO₂ NPs could induce mitochondrial alterations in glial cells. TiO₂ NPs

caused mitochondrial depolarization after 24 h of exposure. It is important to highlight that at low concentrations (≤ 50 nM), MitoTracker Green FM can detect changes in mitochondrial mass, but a higher concentration is useful to evaluate mitochondrial depolarization [48]; therefore we used 75 nM in this study. Because cytochrome c release is followed by mitochondrial depolarization [49], we suggest that cytochrome c release could be associated with this mitochondrial alteration. In addition, mitochondrial depolarization observed in glial cells could lead to a decrease in oxygen consumption and NADH levels in mitochondria, because TiO₂ NPs can cause these alterations in isolated mitochondria [50]. In addition, mitochondrial depolarization in C6 and U373 cells leads to caspase-3 activation, chromatin condensation, and apoptosis [51]. In this regard, it is important to point out that all the cellular alterations induced by TiO₂ NPs observed in this work, including change in the redox state, decrease in antioxidant enzymatic defense, and mitochondrial depolarization, could activate apoptotic pathways [50]. A previous report by our work group using glial cells exposed to TiO₂ NPs showed inhibition of proliferation, morphological changes, and apoptotic death [25]. An autophagy process also has been induced by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells [52].

Toxic effects induced by TiO₂ NPs have been related to their concentration and small size. Several studies show that various cells can be subjected to the same effect at very different

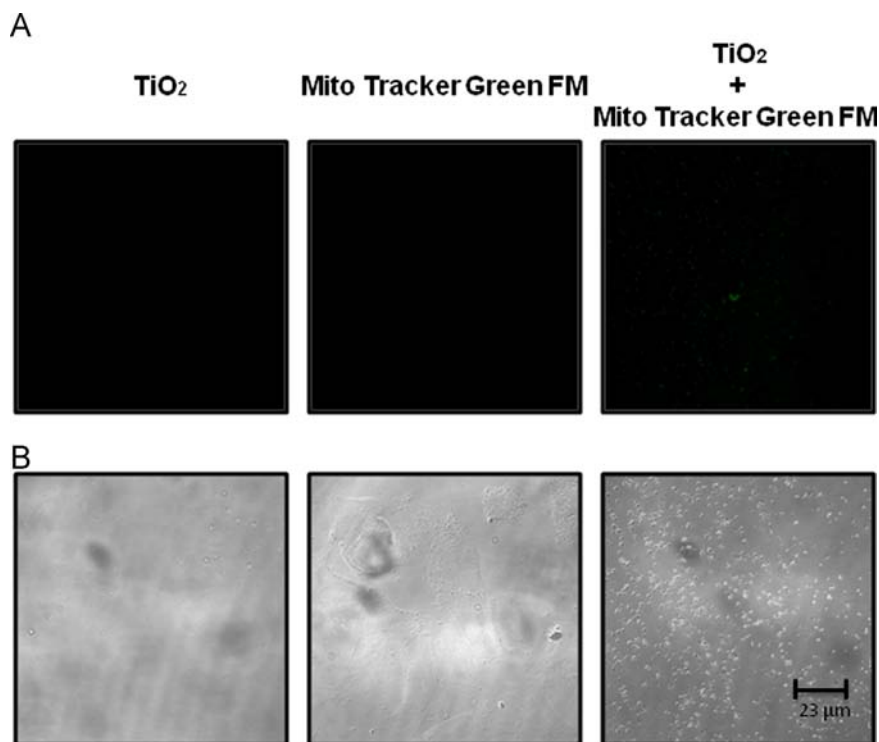


Fig. 8. Negative staining of TiO₂ NPs with MitoTracker Green FM dye. (A) Fluorescence detection of TiO₂ NPs without staining, MitoTracker Green FM dye and TiO₂ NPs (20 µg/ml) plus MitoTracker dye. (B) Their differential interference contrast microscopy. Experiments were done in triplicate under acellular conditions to detect nonspecific fluorescence.

concentrations of TiO₂ NPs in the range from 5 to 1000 µg/ml [53]. This discrepancy can be attributed to differences in secondary sensitivities of cell lines to TiO₂ NPs or to the interaction of the nanoparticles with the different compounds of the culture media. Regarding the size, *in vivo* and *in vitro* toxicology studies confirm that ultrafine particles are more toxic and proinflammatory than fine particles [47]. The mean size of TiO₂ NPs used in this work is around 50 nm, which allows that these nanoparticles can be taken up easily by cells and induce toxicity.

In addition, the TiO₂ NP concentration used was based on previous concentrations evaluated in *in vitro* models, which investigated their effects on the brain [37,54,55]. Although this concentration is high and hardly found as an occupational exposure, we consider that TiO₂ NPs exert toxic effects at long-term exposures, because several studies have shown that these nanoparticles are taken up and accumulated in cells as aggregates in cytosolic vesicles, vacuoles, and lamellar bodies and the number of aggregates increases over time or with the dose [52,56,57]. Also, no metabolizing or elimination mechanism of TiO₂ NPs by cells is known.

Conclusions

In conclusion, TiO₂ NPs induced a strong oxidative stress, mediated by change in the redox state as well as by a decrease in genes of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, reduction in mitochondrial membrane potential, and mitochondrial depolarization, in glial cells *in vitro*. These findings suggest that the exposure of brain cells *in vivo* to TiO₂ NPs could cause brain injury, contribute to the development of neurodegenerative diseases [58], and be hazardous to health.

Acknowledgments

We thank to CONACyT, for providing financial support to Elizabeth Huerta-García, Sandra Gissela Márquez-Ramírez, and José Antonio Pérez-Arízti, graduate students from the Posgrado en Investigación en Medicina, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional and from the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Scholarship Nos. 227281, 175962, and 294521, respectively. We also thank CONACyT for economical support of this work and Project 182341.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.026>.

References

- [1] Borm, P. J.; Robbins, D.; Haubold, S.; Kuhlbusch, T.; Fissan, H.; Donaldson, K.; Schins, R.; Stone, V.; Kreyling, W.; Lademann, J.; Krutmann, J.; Warheit, D.; Oberdorster, E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part. Fibre Toxicol.* **14**:3–11; 2006.
- [2] Kinsinger, N.; Tantuccio, A.; Sun, M.; Yan, Y.; Kisailus, D. Photocatalytic titanium dioxide composite. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**:7015–7021; 2011.
- [3] Shvedova, A. A.; Kagan, V. E. The role of nanotoxicology in realizing the 'helping without harm' paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. *J. Intern. Med.* **267**: 106–118; 2010.
- [4] Warheit, D. B.; Hansen, J. F.; Yuen, I. S.; Kelly, D. P.; Snajdr, S.; Hartsky, M. A. Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in pulmonary and macrophage clearance impairments. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145**:10–22; 1997.
- [5] Bermudez, E.; Mangum, J. B.; Asgharian, B.; Wong, B. A.; Reverdy, E. E.; Janszen, D. B.; Hext, P. M.; Warheit, D. B.; Everitt, J. I. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* **70**:86–97; 2002.

- [6] Andersson, P. O.; Lejon, C.; Ekstrand-Hammarstrom, B.; Akfur, C.; Ahlinder, L.; Bucht, A.; Osterlund, L. Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of TiO₂ nanoparticles in living lung epithelial cells. *Small* **7**:514–523; 2011.
- [7] Liu, R.; Zhang, X.; Pu, Y.; Yin, L.; Li, Y.; Zhang, X.; Liang, G.; Li, X.; Zhang, J. Small-sized titanium dioxide nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages in vivo. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**: 5161–5169; 2010.
- [8] Lavicoli, I.; Leso, V.; Fontana, L.; Bergamaschi, A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**:481–508; 2011.
- [9] Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **113**:823–839; 2005.
- [10] Lee, J. H.; Kim, Y. S.; Song, K. S.; Ryu, H. R.; Sung, J. H.; Park, J. D.; Park, H. M.; Song, N. W.; Shin, B. S.; Marshak, D.; Ahn, K.; Lee, J. E.; Yu, I. J. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part. Fibre Toxicol.* **10**:36–51; 2013.
- [11] Li, Y.; Li, J.; Yin, J.; Li, W.; Kang, C.; Huang, Q.; Li, Q. Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**:8544–8549; 2010.
- [12] Liu, Y.; Xu, Z.; Li, X. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in rat neuroglia cells. *Brain Inj.* **27**:934–939; 2013.
- [13] Ze, Y.; Hu, R.; Wang, X.; Sang, X.; Ze, X.; Li, B.; Su, J.; Wang, Y.; Guan, N.; Zhao, X.; Gui, S.; Zhu, L.; Cheng, Z.; Cheng, J.; Sheng, L.; Sun, Q.; Wang, L.; Hong, F. Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* **102**: 470–478; 2014.
- [14] Wang, J.; Liu, Y.; Jiao, F.; Lao, F.; Li, W.; Gu, Y.; Li, Y.; Ge, C.; Zhou, G.; Li, B.; Zhao, Y.; Chai, Z.; Chen, C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* **254**:82–90; 2008.
- [15] Wang, J. X.; Li, Y. F.; Zhou, G. Q.; Li, B.; Jiao, F.; Chen, C. Y.; Gao, Y. X.; Zhao, Y. L.; Chai, Z. F. Influence of intranasal instilled titanium dioxide nanoparticles on monoaminergic neurotransmitters of female mice at different exposure time. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **41**:91–95; 2007.
- [16] Ma, L.; Liu, J.; Li, N.; Wang, J.; Duan, Y.; Yan, J.; Liu, H.; Wang, H.; Hong, F. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials* **31**:99–105; 2010.
- [17] Shimizu, M.; Tainaka, H.; Oba, T.; Mizuo, K.; Umezawa, M.; Takeda, K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part. Fibre Toxicol.* **6**:20–27; 2009.
- [18] Long, T. C.; Saleh, N.; Tilton, R. D.; Lowry, G. V.; Veronesi, B. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 4346–4352; 2006.
- [19] Smith, J. A.; Park, S.; Krause, J. S.; Banik, N. L. Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochem. Int.* **62**:764–775; 2013.
- [20] Zmijewski, J. W.; Landar, A.; Watanabe, N.; Dickinson, D. A.; Noguchi, N.; Darley-Usmar, V. M. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1385–1389; 2005.
- [21] Ze, Y.; Zheng, L.; Zhao, X.; Gui, S.; Sang, X.; Su, J.; Guan, N.; Zhu, L.; Sheng, L.; Hu, R.; Cheng, J.; Cheng, Z.; Sun, Q.; Wang, L.; Hong, F. Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere* **92**:1183–1189; 2013.
- [22] Alfadda, A. A.; Sallam, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**:1–14; 2012.
- [23] Montiel-Dávalos, A.; Ventura-Gallegos, J. L.; Alfaro-Moreno, E.; Soria-Castro, E.; García-Latorre, E.; Cabañas-Moreno, J. G.; Ramos-Godínez, M. D.; López-Marure, R. TiO₂ nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* **25**:920–930; 2012.
- [24] González-Agüero, G.; Gutiérrez, A. A.; González-Espinosa, D.; Solano, J. D.; Morales, R.; González-Arenas, A.; Cabrera-Muñoz, E.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* **32**:129–135; 2007.
- [25] Márquez-Ramírez, S. G.; Delgado-Buenrostro, N. L.; Chirino, Y. I.; Iglesias, G. G.; López-Marure, R. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology* **302**:146–156; 2012.
- [26] Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K. J.; Dennery, P. A.; Forman, H. J.; Grisham, M. B.; Mann, G. E.; Moore, K.; Roberts 2nd L. J.; Ischiropoulos, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **52**:1–6; 2012.
- [27] Rastogi, R. P.; Singh, S. P.; Häder, D. P.; Sinha, R. P. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**:603–607; 2010.
- [28] Jakubowski, W.; Bartosz, G. 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol. Int.* **34**:757–760; 2000.
- [29] Martin, B. D.; Schoenhard, J. A.; Sugden, K. D. Hypervalent chromium mimics reactive oxygen species as measured by the oxidant-sensitive dyes 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine. *Chem. Res. Toxicol.* **11**:1402–1410; 1998.
- [30] Haugland, R. P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Eugene, OR: Molecular Probes Inc; 1996.
- [31] Lemasters, J. J.; Ramshesh, V. K. Imaging of mitochondrial polarization and depolarization with cationic fluorophores. *Methods Cell Biol.* **80**:283–295; 2007.
- [32] Pentreath, V. W.; Slamon, N. D. Astrocyte phenotype and prevention against oxidative damage in neurotoxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**:641–649; 2000.
- [33] Gramowski, A.; Flossdorf, J.; Bhattacharya, K.; Jonas, L.; Lantow, M.; Rahman, Q.; Schiffmann, D.; Weiss, D. G.; Dopp, E. Nanoparticles induce changes of the electrical activity of neuronal networks on microelectrode array neurochips. *Environ. Health Perspect.* **118**:1363–1369; 2010.
- [34] Meena, R.; Rani, M.; Pal, R.; Rajamani, P. Nano-TiO₂-induced apoptosis by oxidative stress-mediated DNA damage and activation of p53 in human embryonic kidney cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **167**:791–808; 2012.
- [35] Zhang, J.; Song, W.; Guo, J.; Zhang, J.; Sun, Z.; Li, L.; Ding, F.; Gao, M. Cytotoxicity of different sized TiO₂ nanoparticles in mouse macrophages. *Toxicol. Ind. Health* **29**:523–533; 2013.
- [36] Jaeger, A.; Weiss, D. G.; Jonas, L.; Kriehuber, R. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology* **296**:27–36; 2012.
- [37] Liu, S.; Xu, L.; Zhang, T.; Ren, G.; Yang, Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology* **267**:172–177; 2010.
- [38] Petković, J.; Zegura, B.; Stevanović, M.; Drnovšek, N.; Uskoković, D.; Novak, S.; Filipić, M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology* **5**:341–353; 2011.
- [39] Bhattacharya, K.; Davoren, M.; Boertz, J.; Schins, R. P.; Hoffmann, E.; Dopp, E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part. Fibre Toxicol.* **21**:6–17; 2009.
- [40] Gurr, J. R.; Wang, A. S.; Chen, C. H.; Jan, K. Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* **213**:66–73; 2005.
- [41] Xue, C.; Wu, J.; Lan, F.; Liu, W.; Yang, X.; Zeng, F.; Xu, H. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**:8500–8507; 2010.
- [42] Sun, Q.; Tan, D.; Ze, Y.; Sang, X.; Liu, X.; Gui, S.; Cheng, Z.; Cheng, J.; Hu, R.; Gao, G.; Liu, G.; Zhu, M.; Zhao, X.; Sheng, L.; Wang, L.; Tang, M.; Hong, F. Pulmonary toxicological effects caused by long-term titanium dioxide nanoparticles exposure in mice. *J. Hazard Mater.* **235–236**:47–53; 2012.
- [43] Zorov, D. B.; Juhaszova, M.; Sollott, S. J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**:509–517; 2006.
- [44] Siomek, A. NF-κB signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim. Pol.* **59**:323–331; 2012.
- [45] Jin, C. Y.; Zhu, B. S.; Wang, X. F.; Lu, Q. H. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem. Res. Toxicol.* **21**:1871–1877; 2008.
- [46] Kang, S. J.; Kim, B. M.; Lee, Y. J.; Chung, H. W. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* **49**:399–405; 2008.
- [47] Stone, V.; Johnston, H.; Clift, M. J. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans. Nanobiosci.* **6**: 331–340; 2007.
- [48] Buckman, J. F.; Hernández, H.; Kress, G. J.; Votyakova, T. V.; Pal, S.; Reynolds, I. J. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J. Neurosci. Methods* **15**:165–176; 2001.
- [49] Heiskanen, K. M.; Bhat, M. B.; Wang, H. W.; Ma, J.; Nieminen, A. L. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J. Biol. Chem.* **26**:5654–5658; 1999.
- [50] Freyre-Fonseca, V.; Delgado-Buenrostro, N. L.; Gutiérrez-Cirlos, E. B.; Calderón-Torres, C. M.; Cabellos-Avelar, T.; Sánchez-Pérez, Y.; Pinzón, E.; Torres, I.; Molina-Jijón, E.; Zazueta, C.; Pedraza-Chaverri, J.; García-Cuellar, C. M.; Chirino, Y. I. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol. Lett.* **25**:111–119; 2011.
- [51] Zanutto-Filho, A.; Braganhol, E.; Battastini, A. M.; Moreira, J. C. Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFκappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling. *Invest. New Drugs* **30**:2252–2262; 2012.
- [52] Halamoda Kenzaoui, B.; Chapuis Bernasconi, C.; Guneş-Ayra, S.; Juillerat-Jeanneret, L. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *Biochem. J.* **441**:813–821; 2012.
- [53] Valant, J.; Lavicoli, I.; Drobne, D. The importance of a validated standard methodology to define in vitro toxicity of nano-TiO₂. *Protoplasma* **249**: 493–502; 2012.
- [54] Xue, Y.; Wu, J.; Sun, J. Four types of inorganic nanoparticles stimulate the inflammatory reaction in brain microglia and damage neurons in vitro. *Toxicol. Lett.* **214**:91–98; 2012.
- [55] Xia, T.; Hamilton, R. F.; Bonner, J. C.; Crandall, E. D.; Elder, A.; Fazlollahi, F.; Girtsman, T. A.; Kim, K.; Mitra, S.; Ntim, S. A.; Orr, G.; Tagmount, M.; Taylor, A. J.; Telesca, D.; Tolic, A.; Vulpe, C. D.; Walker, A. J.; Wang, X.; Witzmann, F. A.; Wu, N.; Xie, Y.; Zink, J. I.; Nel, A.; Holian, A. Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environ. Health Perspect.* **121**:683–690; 2013.

- [56] Belade, E.; Armand, L.; Martinon, L.; Kheuang, L.; Fleury-Feith, J.; Baeza-Squiban, A.; Lanone, S.; Billon-Galland, M. A.; Pairon, J. C.; Boczkowski, J. A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. *Toxicol. in vitro* **26**:57–66; 2012.
- [57] Singh, S.; Shi, T.; Duffin, R.; Albrecht, C.; van Berlo, D.; Hohr, D.; Fubini, B.; Martra, G.; Fenoglio, I.; Borm, P. J.; Schins, R. P. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**:141–151; 2007.
- [58] Andersen, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* **10(Suppl)**:S18–S25; 2004.