



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la toxicidad de las nanopartículas
de dióxido de titanio relacionado con muerte
celular no dependiente de caspasas**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO
PRESENTA:**

Sergio Javier Martínez García



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Angélica Montiel Dávalos**

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Martínez

García

Sergio Javier

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

307125163

2. Datos del tutor

Dra.

Angélica

Montiel

Dávalos

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Francisco Jesús

Arenas

Huertero

5. Datos del sinodal 3

Dr.

César

Valdovinos

Flores

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Rodolfo Omar

Arellano

Aguilar

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la toxicidad de las nanopartículas
de dióxido de titanio relacionado con muerte
celular no dependiente de caspasas

(Methuosis)

62 pp.

2016

Agradecimientos

A mi madre y a mi padre, por las enseñanzas —que fueron y seguirán siendo un ejemplo—, por su paciencia y especialmente por la libertad y confianza de permitirme tomar mis propias decisiones desde siempre.

A mi hermano, que ha sido un gran mentor al compartir sus conocimientos, fuente inagotable de ayuda en mi formación académica y personal.

A mis tíos, por brindarme auxilio desde pequeño, particularmente a mi tío Rodolfo, por su apoyo, tanto moral como económico, sin el cual no me habría sido posible la consecución de este logro en mi vida: mi titulación.

A Susanita, por recorrer este camino conmigo y recordarme la belleza de las cosas simples, por su compañía para la realización tanto de este trabajo, como de otros proyectos, pero ante todo por aquellos momentos bellísimos que compartimos.

Al laboratorio de Toxicología Ambiental, del Instituto Nacional de Cancerología, en especial a la Dra. Angélica, por aceptarme como alumno, por tenerme la paciencia necesaria —que no ha sido poca— y por brindarme su confianza, aspectos que se ven materializados en este trabajo; a Pilar Ramos Godínez, por su apoyo con las fotografías de microscopía electrónica; al Dr. Ernesto, por aceptarme como parte del grupo de trabajo; a Raúl O. Quintana Belmares e Inés López, por sus críticas sobre el presente trabajo y por sus aportes en los seminarios, los cuales me han sido sumamente útiles para crecer como estudiante; a María Guadalupe Reyes Alva, Christiam Rueda Romero, José Mariano Ontiveros, Guillermina Jazmín, Elizabeth Huerta García, Guadalupe Jazmín Silva, Herminia Ávila y Andrea Rivera Pineda, por hacer de mi estancia en el laboratorio un grato momento.

Al Dr. Francisco Arenas Huertero y a Monserrat, por sus asesorías en las técnicas

de anaranjado de acridina y LDH, además de los consejos y observaciones del Dr. Arenas.

Al Dr. Daniel Espinoza de los Monteros, por sus asesorías en estadística y la medición del área vacuolar.

Al Dr. Omar Arellano, Dr. Luis Felipe y Dr. César Valdovinos, por sus observaciones como parte de mi jurado de titulación.

A mis amigos, Alitzel, Concha, China, Amaranta, Itzell, Mara, Adrián, Xime, Yísus, Yoa..., por brindarme su amistad, sus charlas, algunos entrenamientos... y a todas aquellas personas de la facultad que me faltan por mencionar.

Lista de abreviaturas

NPs: Nanopartículas.

NPs-TiO₂: Nanopartículas de dióxido de titanio.

CNMC: Comité de nomenclatura de muerte celular.

HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

A549: Adenocarcinoma de células no epidermoides proveniente de neumocito tipo II.

%av: Porcentaje de área vacuolar.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

Índice de contenido

Resumen.....	9
1. Marco teórico.....	10
1.1. Nanopartículas.....	10
1.2. Nanopartículas de dióxido de titanio.....	10
1.3. Modelo experimental.....	17
2. Antecedentes.....	18
3. Pregunta de investigación	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivos	20
6. Justificación	21
7. Diseño experimental	21
7.1. Nanopartículas de dióxido de titanio	22
7.2. Cultivo celular	22
7.3. Morfología celular	24
7.3.1. Tinción con cristal violeta	24
7.3.2. Microscopia electrónica	25
7.3.3. Tinción con anaranjado de acridina	25
7.4. Evaluación de citotoxicidad	26
7.5. Ensayo de fragmentación del DNA.....	26
7.6. Análisis estadístico	27
8. Resultados	28
8.1. Análisis morfológico.....	28
8.1.1. Medición del porcentaje de área vacuolar	28
8.1.2. Ultraestructura.....	33

8.1.3. Tinción con anaranjado de acridina.....	35
8.2. Análisis de citotoxicidad	36
8.3. Correlación lineal LDH % av	40
8.4. Análisis de fragmentación de DNA	40
9. Discusión.....	42
10. Conclusiones.....	49
11. Anexo.....	50
11.1. Técnica para la extracción de cultivo primario de células endoteliales de vena umbilical humana (<i>Human Umbilical Vein Endotelial-Cells</i> , HUVEC).....	50
11.2. Tinción vital con anaranjado de acridina.....	55
11.3. <i>Buffer</i> de lisis.....	56
Lista de referencias.....	57

Resumen

Actualmente, las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO₂) representan un riesgo para la salud en las personas que se encargan de su obtención, purificación, almacenamiento, transporte y procesamiento para las industrias cosmetológica, farmacéutica, automotriz, alimenticia, entre otras. Por ello se ha incrementado el interés en la realización de estudios sobre los efectos tóxicos en las personas expuestas a dicho nanomaterial. Se ha reportado que las NPs-TiO₂ inducen muerte celular por apoptosis y necrosis. Sin embargo, existen otros tipos de muerte que aún se deben evaluar. En el presente trabajo se analizó si las NPs-TiO₂ podrían inducir la muerte celular por *methuosis*, la cual se caracteriza por un incremento masivo de vacuolas en las células, debido a un un proceso de macropinositosis sostenido. Se utilizaron dos tipos celulares: la línea celular A549 y células HUVEC expuestas a NPs-TiO₂, en busca de la muerte por methuosis. Se observó un incremento del área vacuolar en las HUVEC desde las 3 horas (p<0.05) y en las A549 a partir de las 18 horas (p<0.05); la ultraestructura no mostró similitud de las vacuolas con las producidas en la methuosis. No se observó la unión a lisosomas por medio de la tinción con anaranjado de acridina. Con respecto al análisis de citotoxicidad por el método de la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH), se observó en las HUVEC un incremento de la producción de LDH desde los 30 minutos en la concentración más baja (0,3 µg/mL) (p<0.05), mientras que en las A549 el incremento de la LDH es hasta las 24 horas (p<0.05). Finalmente, se evaluó la degradación del DNA por medio de electroforesis y no se encontró la fragmentación típica de la muerte por apoptosis. En conclusión, las NPs-TiO₂ no inducen muerte celular por methuosis en las células A549 ni en HUVEC. Sin embargo, los datos muestran que las NPs-TiO₂ inducen la desregulación de las vías endocíticas y el mal funcionamiento en el tráfico vacuolar.

1. Marco teórico

1.1. Nanopartículas

Se consideran nanopartículas (NPs) a los materiales con un diámetro menor a los 100nm, las cuales se clasifican, por su origen, en naturales, como polen, esporas, productos metabólicos de organismos y partículas propias del suelo; y en sintéticas, como los nanotubos de carbón, *quantum dots*, fulerenos y óxidos metálicos (Urrutia-Ortega, 2011). Actualmente, las NPs sintéticas tienen un amplio uso en la vida cotidiana, medicina, ingeniería y ciencias, por lo cual se ha profundizado en el estudio de sus efectos adversos en el ambiente y la salud.

Las NPs son consideradas como contaminantes ambientales, ya que se han observado en conglomerados dentro del material particulado de 2.5 μ m (PM2.5). Los mecanismos de toxicidad ambiental más importantes que se les han adjudicado son la bioacumulación y el transporte de las NPs a través de las aguas continentales y oceánicas. Actualmente, las NPs más utilizadas pertenecen al grupo de los óxidos metálicos, y son las de dióxido de titanio, las cuales se consideran el contaminante más importante dentro de este grupo (Berube, Cummings, Cacciatore, Scheufele, y Kalin, 2011).

1.2. Nanopartículas de dióxido de titanio

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) cataloga el TiO₂ como 2B, posible carcinógeno en humanos (Cristhiam et al., 2016). El TiO₂ se encuentra en la naturaleza en cuatro formas cristalinas. La menos estable es el TiO₂ monoclinico (monoclinico, $a=12.16 \text{ \AA}$, $b=3.74 \text{ \AA}$, $c=6.51 \text{ \AA}$), seguida por la brookita (rhombohedral, $a=5.436 \text{ \AA}$, $b=9.166 \text{ \AA}$, $c=5.135 \text{ \AA}$), la anatasa (tetragonal, $a=b=3.782 \text{ \AA}$, $c=9.502 \text{ \AA}$) y, finalmente, la más estable, el rutilo (tetragonal,

$a=b=4.584 \text{ \AA}$, $c=2.953 \text{ \AA}$). Las dos últimas son las más utilizadas en la industria e investigación (Yin, Wu, Yang, y Su, 2013). El uso de las NPs-TiO₂ se ha incrementado en los últimos años. Se emplean en colorantes blancos de alimentos, pinturas, cosméticos; en biorremediación de suelos y agua; en sistemas fotocatalizadores; en investigación biomédica, para el tratamiento contra el cáncer, excipientes de medicamentos, escaneo celular, biosensores para pruebas biológicas e ingeniería genética (Yin et al., 2013; Hu et al., 2010). Es de gran importancia estudiar y evaluar los efectos negativos de las NPs-TiO₂ en el ambiente y en las personas expuestas en la obtención, elaboración y manufactura de los productos (figura 1).

Las principales vías de ingreso al organismo son cutánea, gástrica e inhalatoria (Zhao et al., 2009). De esta forma, las vías respiratorias de los trabajadores expuestas quedan vulnerables, con el potencial riesgo de cáncer de pulmón u otros daños a las vías respiratorias.

El Instituto Nacional de Seguridad y Salud Humana señala que la exposición laboral a las NPs-TiO₂, principalmente por inhalación o por contacto dérmico, debe ser de concentraciones por debajo de 1.5mg/m³ para TiO₂ (>100nm) y de 0.1mg/m³ para el ultrafino (<100nm), con una exposición media de 10 h al día en 40 horas de trabajo semanales (Montiel-Dávalos et al., 2012). Mientras que el promedio de ingesta del TiO₂ (E171) es de 1-2 mg/kg de masa corporal al día para niños menores de 10 años, y aproximadamente 0.2-0.7 mg/kg de masa corporal al día en adultos (Weir, Westerhoff, Fabricius y Von Goetz, 2012). Esto se debe a que se ha visto en diversos estudios que, al ser de menor diámetro la partícula, presenta efectos tóxicos más severos (No obstante, se ha comprobado que el consumo de algunos productos, tales como protectores solares, pueden superar la norma, siendo 35mg/m³ la media de contacto al usarlo en una aplicación (Montiel-Dávalos et al., 2012).

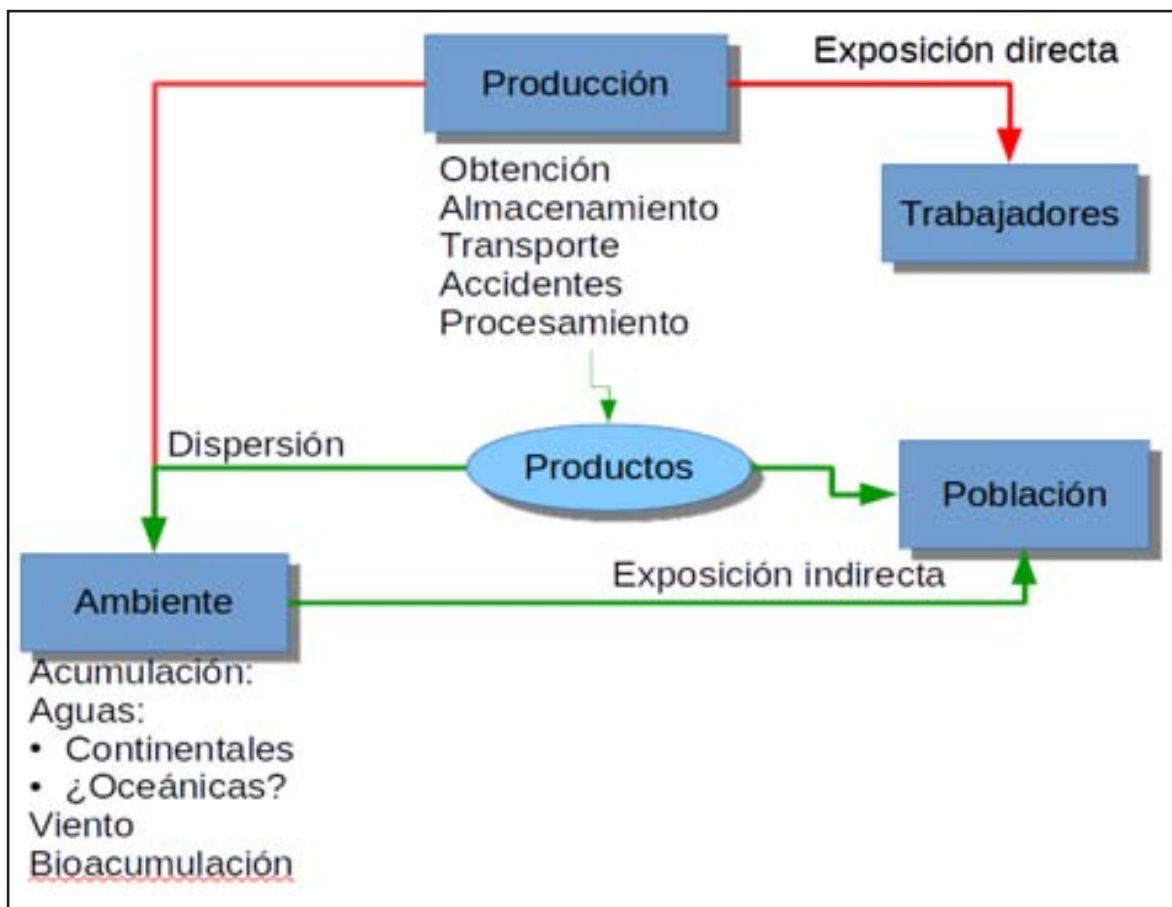


FIGURA 1. Representación de la exposición a las NPs-TiO₂. La población más afectada son los trabajadores que lo manipulan constantemente. Las nanopartículas, al estar en el ambiente, se pueden dispersar por viento y aguas, tanto continentales como oceánicas. Los signos de interrogación ponen en duda si la cantidad de nanopartículas entrantes en ellas tiene un efecto considerable. Por otra parte, también se presenta la bioacumulación (Hernández-Gutiérrez, 2015).

Dado que las NPs-TiO₂ son un material de gran uso, además de un contaminante, se han efectuado estudios de toxicidad *in vitro*, en los que se ha comprobado que el material es capaz de inducir la muerte celular vía apoptosis y necrosis (Zhao et al., 2009; Montiel-Dávalos et al., 2012), además de otros efectos tóxicos en modelos *in vivo* e *in vitro* de las NPs, sobre todo de los óxidos metálicos, los cuales pueden traslocar a los epitelios de piel, pulmones, sistema nervioso central, etc. Los efectos adversos a la salud se deben a que, después del contacto, las nanopartículas in-

gresan al organismo principalmente por el tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, piel u ojos. Una vez dentro, pueden llegar a transportarse y distribuirse a diversos órganos, como los pulmones, y, en función del tamaño y la capacidad de formar agregados, será el sitio del destino final dentro del organismo (Zhao et al., 2009; Gao et al., 2013; Hubbs et al., 2011). También se ha visto que interactúan con estructuras celulares como el huso mitótico (Hubbs et al., 2011). Es importante hacer notar que los efectos tóxicos de los nanomateriales se deben a la combinación de sus características químicas y físicas como: el tamaño, la forma, la carga, la solubilidad y la superficie química (Stoccoro, Karlsson, Coppedè y Migliore, 2013). Por tal motivo, se ha incrementado el número de estudios de los efectos tóxicos de los nanomateriales, sobre todo de los óxidos metálicos, como es el caso de las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO₂).

1.3. Muerte celular: methuosis

La muerte celular es un proceso ampliamente estudiado desde hace dos siglos, con un avance en función de las técnicas empleadas, que inicia con descripciones con el microscopio, hasta llegar a técnicas más avanzadas (Majno y Joris, 1995). Actualmente, el concepto de muerte celular se debe entender como el conjunto de procesos que tienen como desenlace la pérdida de las funciones celulares. En la última revisión, el Comité de Nomenclatura en Muerte Celular (CNMC) define 13 procesos distintos que han sido confirmados bajo diferentes condiciones, como son: células manipuladas genéticamente, farmacológicamente, *in vitro*, o en tejidos que han sido expuestos a daño isquémico, citotoxicidad, compuestos o patógenos. Dentro de éstos se reconocen diversos tipos de apoptosis de forma intrínseca, dependiente e independiente de caspasas, y apoptosis extrínseca, necrosis, autofagia y catástrofe mitótica, mientras los demás tipos pueden considerarse variantes de éstos. Por otra

parte, el CNMC define ciertos tipos de muerte celular con un fenotipo caracterizado por una vacuolarización, la cual puede provocar el rompimiento de membrana, como en necrosis, con poca o nula respuesta a inhibidores de caspasas, entre los cuales están paraptosis, oncosis y methuosis. Este último continúa en evaluación por el CNMC (Galluzzi et al., 2012; Maltese y Overmeyer, 2014), y es en el que se centra el presente trabajo.

La methuosis (del griego *methuo*: tomar hasta intoxicarse) se observó por primera vez en células de glioblastoma y carcinoma gástrico inducido por una activación ectópica de Ras (H-Ras, G12V; Chi et al., 1995), la cual se asoció con el proceso de autofagia. Sin embargo, en investigaciones posteriores se vieron diferencias morfológicas con autofagosomas y autofagolisosomas (Overmeyer, Kaul, Johnson, y Maltese, 2008). La methuosis es un tipo de muerte celular independiente de caspasas que se da como consecuencia de alteraciones en el tráfico vacuolar y en la cual hay una acumulación masiva de vacuolas provenientes de macropinocitosis (Overmeyer, Young, Bhanot, y Maltese, 2011; Robinson, Overmeyer, Young, Erhardt, y Maltese, 2012). Las características de este tipo de muerte son: una expresión ectópica de Ras, es decir, que se desregula en tiempo y espacio, lo que induce una acumulación de vacuolas de una sola membrana que no se unen a ningún organelo ni son recicladas, las cuales pueden unirse entre ellas, formando vacuolas más grandes y amorfas que van desplazando al citoplasma hasta producir un desanclaje de la célula y pérdida de la integridad de la membrana, así como fallas en el metabolismo celular. Estas vacuolas pueden presentar marcadores de macropinosoma tardío, como la proteína de membrana asociada a lisosomas 1 (LAMP1) y la proteína relacionada a Ras 7 (Rab7). Pero en el caso de estas vacuolas, no se presenta una naturaleza ácida comprobable con Lyso-Tracker o anaranjado de acridina: son translúcidas electrónicamente; y no se presenta condensación de la cromatina ni

se observa fragmentación de nucleosomas o disminución con inhibidores de caspasas (Maltese y Overmeyer, 2014; Overmeyer, Kaul, Johnson, y Maltese, 2008; Robinson, Overmeyer, Young, Erhardt, y Maltese, 2012). Se ha visto que inicia la inducción en un tiempo entre 13-80 minutos, con macropinosomas y regiones activas en formación de lamelopodios dentro de este tiempo. Además se ha notado que es un proceso reversible, ya que a las 4 horas la inducción de macropinosomas es evidente; no obstante, si se remueve el compuesto inductor, se puede recuperar la morfología común de la célula. Se han reportado características similares en ocho distintos tipos de líneas de glioblastoma (Overmeyer, Kaul, Johnson, y Maltese, 2008), en células U2OS de osteosarcoma (Bhanot, Young, Overmeyer, y Maltese, 2010) y células de carcinoma gástrico MKN-1 y TMK-1 (Chi et al., 1999). Además, se han visto características similares en otros tipos celulares como: meduloblastoma al ser tratado con TRK-A positivo (Li, MacDonald, Hryciw, y Meakin, 2010), (sólo que en este caso las vacuolas se fusionan con lisosomas, por lo que se excluye del proceso de methuosis), neuronas al estar expuestas a metanfetaminas (Nara, Aki, Funakoshi, y Uemura, 2010), cáncer de próstata tratado con AS1441 (Reyes-Reyes, Teng, y Bates, 2010). También se ha visto una morfología similar en el hongo *Aspergillus fumigatus* como resultado de modificar la expresión de RasA por un alelo dominante (Fortwendel, Juvvadi, Rogg, y Steinbach, 2011). No obstante, la inducción de macropinosomas como resultado de la inducción de Ras no es común en todos los tipos celulares (Maltese y Overmeyer, 2014).

La vía de la methuosis está relacionada con el proceso de macropinocitosis. Éste es un proceso de endocitosis independiente de clatrin, en el cual las células internalizan fluidos, nutrientes y proteínas en vesículas originadas por protusiones de la membrana llamadas lamelopodios o *ruffles*. Una vez engullidos los macropinosomas, son marcados por adquirir fosfatidil-inositol-3-fosfato y Rab5, la cual funcio-

na como GTPasa. Posteriormente, entran en una vía endocítica, en la que existen dos caminos: el reciclaje en la superficie celular o la maduración, que consiste en adquirir las características de endosoma, tardío como LAMP1 y Rab7. Por último, se fusionan con lisosomas (Swanson y Watts, 1995; Donaldson, Porat-Shliom, y Cohen, 2009). Sin embargo, el proceso en methuosis presenta alteraciones, ya que los macropinosomas no son reciclados ni fusionados con lisosomas. La inducción de la vacuolarización por medio de Ras no es por medio de la vía canónica: Raf-mitógeno-ERK-fosfatidil-inositol-3fosfato-Akt o RaIGDS-RALS/RaIB. Antes bien, Ras promueve la vía de macropinocitosis por medio de la activación de Rac1, una GTPasa que funciona como mediador positivo de ensamblaje de filamentos de actina necesarios para la macropinocitosis. Aunque Rac1 es consistente con el incremento de macropinocitosis, no explica el defecto en el reciclaje de macropinosomas. Por tanto, se propone la hipótesis de que la expresión mantenida de Ras(G12V) produce una estimulación crónica de Rac1, la cual presenta un efecto dual, pues contribuye a la vacuolarización sostenida por medio de macropinosomas y disminuye los niveles de Arf6 (GTPasa), cuya actividad está presente en la vía de reciclaje de endosomas independientes de clatrina (Maltese y Overmayer, 2014; Bhanot, Young, Overmayer, y Maltese, 2010).

Existen características que se comparten entre la methuosis y otros tipos de muerte celular. En la methuosis se ha comprobado la activación de la caspasa 3, el rompimiento de los sustratos de las caspasas, la activación de PARP y laminina A/C. No obstante, al tratar con inhibidores de caspasas, la pérdida de viabilidad celular no disminuye, además de que las características morfológicas típicas de apoptosis están generalmente ausentes. También se ha notado una diferencia al comparar la vacuolarización inducida por paraptosis y oncosis, ya que el origen de las vacuolas en estos tipos de muerte proviene del retículo endoplásmico o mitocon-

drias, mientras que en methuosis se presentan macropinosomas que provienen de la membrana citoplásmica. Por otra parte, se ha pensado en una forma remanente de necrosis, tomando en cuenta la morfología presente al separarse del sustrato y la pérdida de la integridad de la membrana. No obstante, al probar necrostatina, no hay efecto protector, lo que la distingue de la necroptosis (Maltese y Overmayer, 2014; Overmeyer, Kaul, Johnson, y Maltese, 2008).

Actualmente se están buscando compuestos que induzcan la methuosis, con el fin de tratar tumores resistentes de forma alternativa, y se han encontrado compuestos indólicos capaces de inducirla (Trabbic et al.).

1.3. Modelo experimental

Al ser las vías respiratorias los trabajadores vulnerables por exposición, el modelo planteado consiste en células del sistema neumocito-endotelio. Sin embargo, se presenta de forma independiente el efecto de las NPs-TiO₂ en cada tipo celular. Esto se debe a que no se sabe si existe inducción de methuosis en estos tipos de células, ni si las NPs-TiO₂ son capaces de inducirla. Este modelo tiene como fundamento, primeramente, que el material particulado inhalado tiene un impacto principalmente en el sistema respiratorio y que, en segunda instancia, el daño por deposición de las partículas se correlaciona con el tamaño de éstas. Además, los efectos finales son: remodelamiento de los pulmones, daño y activación endotelial que puede concluir en efectos sistémicos (Moreno, Cuellar, Ruiz, y Rojas-Bracho, 2009). De esta forma, se ha observado que los efectos sistémicos son el resultado de la interacción entre célula-partícula-endotelio (Alfaro-Moreno et al., 2008). En cuanto a la biología del modelo, se trata de células alveolares. Éstas en condiciones normales están rodeadas por una red de capilares que les proporcionan nutrientes. Los alvéolos están constituidos principalmente por dos tipos celulares: los neumocitos tipo I y II. Los

tipo I se encargan de dar soporte al alvéolo y provienen directamente de los tipo II; estos últimos son células secretoras que se encargan de producir los surfactantes necesarios para el intercambio gaseoso, entre otras moléculas de señalización. La relación que existe entre los neumocitos y las células endoteliales se da a nivel de la lámina basal. Ésta presenta dos regiones: la región gruesa, donde existe la acumulación de proteínas, desechos celulares y material particulado. Una vez ahí translocan al interior del alvéolo; y la región delgada, donde ocurre la fusión entre las láminas basales del epitelio pulmonar y del endotelio, siendo esta región en la que ocurre el intercambio gaseoso y la cual se le conoce como la “barrera aire-sangre” (Ross y Pawlina, 2011).

2. Antecedentes

Numerosos estudios prueban los efectos tóxicos de las NPs-TiO₂, en los que se ha reportado que pueden inducir moléculas proinflamatorias y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células endoteliales y epitelio alveolar, así como la activación del endotelio y monocitos; también se ha probado que pueden llevar a muerte celular, principalmente por necrosis, y que hay inducción de apoptosis desde los 5µg/cm² y hasta los 40 µg/cm² en estos tipos celulares (Cristhiam et al., 2016; Montiel-Dávalos et al., 2012; Ramos-Godínez, González-Gómez, Montiel-Dávalos, López-Marure, y Alfaro-Moreno, 2013). Por otra parte, se ha visto que pueden atravesar la barrera entre el sistema circulatorio y pulmones, causando estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en bronquios. En la línea A549 se ha visto muerte celular y daño a mitocondria (Montiel-Dávalos et al., 2012); no obstante, la muerte se presenta después de las 24 horas y en concentraciones mayores a 10µg/cm² (Ispanixtlahuatl-Meráz, 2015). Además, se ha demostrado en cocultivos que inducen la activación de endotelio (Ramos-Godínez et al., 2013). También las NPs-TiO₂

pueden atravesar la barrera testicular, acumularse en los testículos y ocasionar una disminución en el conteo espermático y desequilibrio hormonal en ratones (Gao et al., 2012).

Se ha observado que la exposición por inhalación en ratones puede traslocar el sistema nervioso central por medio del tracto olfatorio y causar daño en el cerebro, bajar las funciones cognitivas, daño al hipocampo, reducción del ATP mitocondrial, oxidación de ácidos grasos y proteínas, causar inflamación, ocasionar la muerte de neuronas por apoptosis y producción de vacuolas en células de glía, microglía y neuronas, además de que se depositan cerca de los núcleos dentro de las células (Hu et al., 2005; Ze et al. 2013; Ze et al., 2014). Las NPs-TiO₂ producen muerte por apoptosis en células de leucemia de ratón después de las 18 horas de exposición, la cual no se relaciona directamente con la endocitosis de las partículas, sino con el contacto de éstas en la superficie celular (Takaki, Higuchi, Hashii, Ogino, y Shimizu, 2014). Por otra parte, se han realizado estudios para conocer los mecanismos de internalización de las nanopartículas a las células y si éstas crean un efecto tóxico. Se ha reportado que las NPs-TiO₂ inducen daño mitocondrial en pulmón de rata, acompañado de cambios conformacionales en los citoesqueletos de células epiteliales de pulmón, en los cuales se incluye el incremento en la longitud de los filamentos de actina y tubulina (Hernández-Gutiérrez, 2015). En células de próstata se produce endocitosis mediado por clatrina, caveolina y macropinositosis en función de la concentración del tiempo (Thurn et al., 2011), inducción de autofagia, que produce muerte en células de cáncer de colón con exposición a NPs-TiO₂ menores a 25 nm (HT29) (Yu Li, 2011), mal funcionamiento de lisosomas en células de gónadas de trucha (Vevers y Jha, 2008), con partículas de 5 nm, en fibroblastos (L929) (Jin, Zhu, Wang, y Lu, 2008) y en macrófagos alveolares (Hamilton et al, 2009). En A549 se ha observado mal funcionamiento en los lisosomas (Thurn et al., 2011) y

que las NPs-TiO₂ son internalizadas principalmente por endocitosis y se localizan en la periferia del núcleo en cuerpos multivesiculares, los cuales presentan movimiento por medio de la dineína; ésta no está involucrada con el cambio de tamaño de las células (Ispanixtlahuatl-Meráz, 2015). En esta misma línea, se ha comprobado una aceleración del ciclo celular, induciendo un incremento en la proporción de células mitóticas. Por último, se ha documentado que existe la degradación típica del DNA vista en apoptosis debido a la exposición a NPs-TiO₂ posterior a las 24 horas de exposición desde los 40 µg/cm² (Montiel-Dávalos et al., 2012; Bucio-López, 2013).

3. Pregunta de investigación

Conociendo que las NPs-TiO₂ inducen tanto muerte celular como alteraciones en las vías endocíticas, surge la duda de si las NPs-TiO₂ pueden inducir el fenómeno de methuosis en células endoteliales y neumocitos tipo II, al ser expuestas de forma independiente a cada tipo celular, ya que estos tipos de células se encuentran entre los más expuestos, al ser el tracto respiratorio una de las principales vías de entrada de las partículas.

4. Hipótesis

Si las células son expuestas a NPs-TiO₂, entonces se encontrarán los componentes morfológicos del fenómeno de methuosis en ambos tipos celulares.

5. Objetivos

Principal:

- Evaluar, por medio del análisis morfológico en función de las características conocidas en células endoteliales y en la línea A549, si la exposición a NPs-TiO₂ provoca methuosis.

Particulares:

- Observar y analizar la morfología de las células cuando son expuestas a NPs-TiO₂ a diferentes concentraciones.
- Observar y analizar la ultraestructura de las células posterior a la exposición a las NPs-TiO₂.
- Conocer la naturaleza de las vacuolas producidas por NPs-TiO₂.
- Medir la citotoxicidad a la exposición con NPs-TiO₂.
- Corroborar la integridad del DNA a la exposición a NPs-TiO₂.

6. Justificación

Al ser las NPs-TiO₂ un material de constante uso y producción para la elaboración de productos en las industrias cosmetológica, automotriz, farmacológica, etcétera, es de gran relevancia investigar si las personas expuestas a este tipo de nanomateriales podrían presentar efectos en la salud, e inclusive daño al medio ambiente. Con este proyecto se pretenden analizar los efectos de las NPs-TiO₂ enfocados en los cambios morfológicos en las células A549 y las células endoteliales, además de rastrear las características propias de la methuosis, siendo éste un fenómeno aún no explorado. De igual manera, se busca ampliar los estudios sobre la exposición de los sistemas biológicos de las NPs-TiO₂. Estas aportaciones podrían ser utilizadas en un futuro para las aplicaciones técnicas en el área de la medicina, tanto por la methuosis como por las NPs-TiO₂.

7. Diseño Experimental

La parte experimental se realizó en el Laboratorio de Toxicología Ambiental, del Ins-

tituto Nacional de Cancerología. Se utilizaron dos tipos de células: la línea celular A549 de adenocarcinoma no epidermoide de pulmón proveniente de neumocitos tipo II, y las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), que fueron expuestas a las NPs-TiO₂ de diferentes tamaños y formas cristalinas (anatasa de 25 nm, anatasa-rutilo de 50 nm y anatasa rutilo de 100 nm), a las concentraciones 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 µg/mL y a los tiempos de 30 minutos, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas. El proyecto se divide en: un análisis morfológico, que incluye la observación y cuantificación de cambios celulares con respecto al incremento del área vacuolar, la ultraestructura (microscopía electrónica) y naturaleza de las vacuolas (si son ácidas o básicas). Se realizó un análisis de citotoxicidad celular y, finalmente, se observó la integridad del DNA.

7.1. Nanopartículas de dióxido de titanio

Se utilizaron tres presentaciones diferentes de NPs-TiO₂, esto con la idea de comprobar si a diferentes tamaños presenta un efecto distinto en las células. Los tamaños de las NPs-TiO₂ fueron anatasa de 25 nm (Sigma-Aldrich 637254-50G), anatasa-rutilo de 50 nm (farmacia París) y anatasa-rutilo de 100 nm (Sigma-Aldrich 634662-25G). Las NPs-TiO₂ se pesaron y esterilizaron en viales previamente horneados a 120°C y 20ATM durante 15 minutos. Las NPs-TiO₂ se resuspendieron en un amortiguador de fosfatos pH7.4 (PBS 1X Gibco 1672850), y para llevar a la concentración de cada tratamiento, se adicionó la disolución más el medio sin suero fetal de bovino (SFB).

7.2. Cultivo celular

Se utilizaron células de cordón umbilical humana (HUVEC), las cuales se obtuvieron por medio de una disgregación enzimática con colagenasa tipo II de la vena

umbilical humana, de mujeres aparentemente sanas, y éstos fueron recolectados en el Hospital Troncoso, bajo la autorización del jefe del departamento de Servicios Generales, el Dr. Gerardo Tinoco.

Para la obtención de las células, posterior a la recolección de los cordones, se realizan lavados a través de la vena con HEPES 1X (Sigma-Aldrich H4034-1KG). Cuando el exceso de sangre es retirado, se coloca la colagenasa (Gibco 913813) en la vena con ayuda de cinchos estériles, para cerrar la parte inferior del cordón, mientras la superior se mantiene con la presión de la jeringa y las pinzas; se mantiene 30 minutos con la colagenasa hasta que se recupera. En el momento de recuperar las células se realizan masajes a los cordones y se colecta la solución de despegado con colagenasa en un tubo de 50 mL. Posteriormente, se realizan lavados hasta completar el volumen de 50 mL: en cada lavado se realizaron masajes. A continuación, se centrifuga a 1200 RPM y se recupera el botón, el cual se siembra en cajas de 75 cm², a las cuales se les puso previamente 2 mL de gelatina al 0.02% (Sigma Aldrich G6650-100G). Para cada caja se siembran de dos a tres cordones, dependiendo del tamaño.

Para el crecimiento de las células en cada resiembra, se adicionaba previamente 2 ml de gelatina al 0.02% durante 30 minutos a las superficies de las botellas de 75 cm², para simular la matriz extracelular; el medio utilizado fue M199 (Gibco 31100-035) complementado con 1 µL/mL de factor de crecimiento endotelial (Bio-Rad 4110-5004), 10% SFB (Gibco 1122050), 1 µL/mL de fungizone (Gibco 1553205), 100 µL/mL de penicilina (Sigma Aldrich 74K2331); las células se incubaron a 36 °C con 5% de CO₂. (Ver procedimiento completo en Anexo)

Se utilizaron las HUVEC en un pase de 2-5. Previamente se adicionó la gelatina 0.02% en los siguientes volúmenes: para los portaobjetos 500 µL; en las placas de 6 pozos, 12 pozos y 24 pozos, 250 µL; y 96 pozos con 50 µL. Para el tratamiento con

las NPs-TiO₂, el medio utilizado fue sin SFB.

Las células A549 se sembraron en botellas de 75 cm², se utilizó el medio F12K (Gibco 1677031), el cual fue complementado con 10% SFB, 1 µL/mL de fungizone, 1 mL/100 mL antibiótico-antimicótico. Las células se incubaron a 37 °C, con 5% de CO₂. Se consideraron las células que estuvieran dentro del pase 3-30. Para el tratamiento con las NPs-TiO₂, el medio utilizado fue sin SFB.

Para sembrar la cantidad requerida de células en cada experimento, se realizó un conteo celular con la cámara de Neubauer, en la cual se adicionó 10 µL de la mezcla, la cual se compuso con 450 µL de azul de tripano (Sigma Aldrich RNBC8200) y 50 µL de la disolución celular. Se contaron las células vivas en los cuatro cuadrantes y se calculó el número estimado total de células mediante la fórmula:

$$TC \approx \frac{D * V * C * 100004}{4}$$

donde: TC es el número total de células aproximadas, D es la disolución, C el número de células contadas y V el volumen.

7.3. Morfología celular

7.3.1. Tinción con cristal violeta

Se sembraron 400 000 células en portaobjetos. Se les agregaron los tratamientos de exposición por tamaño de partícula correspondientes a los tiempos de 30 minutos, 3, 6, 9, 18 y 24 horas, con las siguientes concentraciones: 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 µg/mL y el control negativo.

Terminado el tiempo de tratamiento, se realizaron tres lavados con PBS 1X. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma Aldrich 158127-100G) durante dos horas; a continuación se lavaron con abundante agua. Se colocó 1 mL de violeta de genciana 1g, c.b.p. 100 mL (Reproquifin 10690) por 30 segundos

y se lavó con abundante agua. Se montaron con resina, para ser observadas al microscopio. Se tomaron fotos de tres campos visuales distintos a 10X, 40X y 100X. El procesamiento de las imágenes se realizó en *ImageJ*, mediante el cual se midió el % av.

7.3.2. Microscopia electrónica

Se sembraron 400 000 células en placas de 6 pozos. Las células se trataron a 3 y 24 horas con las concentraciones de 0.3, 3, 10, 100 µg/mL y el control negativo. Transcurrido el tiempo del tratamiento, se fijaron con una solución amortiguadora de fosfatos salinos con glutaraldehído al 2.5% pH 7.2 durante 3 horas. Para el procesamiento se llevaron al laboratorio de Microscopia Electrónica, del Instituto Nacional de Cancerología, para la posterior toma de fotografías. En este caso se analizó la ultraestructura celular, en particular de las vacuolas.

7.3.3. Tinción con anaranjado de acridina

Se sembraron 15 000 células por pozo en un portaobjetos con compartimientos para cultivo slide-chamber. En este caso, se trataron a 30 minutos, 3 y 24 horas, con las concentraciones de 0.3, 3, 10, 100 µg/mL y el control negativo. Se retiró el medio y se realizaron tres lavados con PBS 1X. Se fijaron con con paraformaldehído frío al 4% 150 µL toda la noche a 4°C; se decantó el paraformaldehído y se realizaron lavados con PBS 1X tres veces por 5 minutos. Se retiraron las celdillas y el adhesivo. En cuarto oscuro se colocó el *buffer I* (ver Anexo), cubriendo toda la superficie durante 5 minutos, y se retiraron, evitando que se secan. De la misma forma, en un cuarto oscuro se agregó el colorante anaranjado de acridina (Sigma Aldrich 235474), cubriendo toda la superficie durante 5 minutos. Se lavó con abundante agua destilada. (Preparación de los *buffers* en Anexo).

Para la observación al microscopio, se montaron con glicerol 1:1 y agua destilada, y se observaron en microscopio de fluorescencia con el filtro BP 546, FT 580, LP 590 (canal rojo).

7.4. Evaluación de citotoxicidad

Ésta se realizó utilizando el principio de liberación de la enzima citoplásmica más abundante, que es la deshidrogenasa láctica (DHL), por medio del kit de LDH (Sigma Aldrich TOX7-1KT), y se siguieron las indicaciones que marca el fabricante:

Se trabajó en cuarto oscuro. Se sembraron 15000 células en placa de 96 pozos, las cuales fueron tratadas a 30 minutos, 3 y 24 horas, con las concentraciones de 0.3, 3, 10, 100 µg/mL, el control negativo y TNF como control positivo. En este caso se utilizó medio M199 sin rojo fenol para las células HUVEC. Pasado el tiempo de tratamiento, se recuperaron 50 µL de medio de cada pozo de la placa y se pasaron a una placa limpia, la cual fue centrifugada a 350 RPM durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 100 µL de la mezcla de DHL a cada pozo, se cubrió con papel aluminio y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se midió inmediatamente por espectrofotometría a 490nm. En el caso de las células A549, se hizo una lectura de absorbancia con puro medio de cultivo, el cual fue restado de la lectura del ensayo para restar la interferencia causada por la presencia del rojo fenol en el medio.

7.5. Ensayo de fragmentación del DNA

Se sembraron 100000 células por pozo en placas de 6 pozos. Se trataron con anatasa-rutilo de 50nm, a 30 minutos y 24 horas, a concentraciones de 0.3, 3, 10 y 100 µg/mL. Se obtuvo DNA, tanto de las células adheridas, como de las células en

suspensión en el medio. En ambas células se realizó el mismo procedimiento para la obtención del DNA.

Posteriormente se centrifugaron los tubos a 1500 RPM por 10 minutos y se decantó el sobrenadante, el botón se resuspendió con 0.5 mL de *buffer* de lisis (ver Anexo) y se dejó en agitación por 24 horas a temperatura ambiente. De la suspensión lisada se extrajo el DNA con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 2.5:2.4:0.1 v/v (Sigma-Aldrich P2069) y se homogeneizó la mezcla, para después centrifugar a 10000 RPM durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se colectó la fase acuosa y se adicionó 1/10 del volumen de acetato de sodio (Técnica Química A1130) 3M pH: 3.5 y 2 veces el volumen de etanol grado molecular (Merck K36773783 648). Se dejó precipitar durante 24 horas a -20°C. Posteriormente, se concentró por centrifugación a 10000 RPM durante 15 minutos a 4°C, se decantó y el botón se resuspendió en 20 µL de agua inyectable. Se cuantificó la muestra en nanodrop para cargar 50µg/µL de DNA en cada carril y se corrió en un gel de agarosa (Bio Rad 161-3102) al 0.8% a 120mVolts durante 2 horas aproximadamente.

7.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en *Wolfram Mathematica Student Edition 10.2.0.0*. Para cada experimento se realizó un ANDEVA de una vía y un multifactorial. Se tomó en cuenta un $\alpha=0.05$ y se realizaron las pruebas de diferencias de media entre tratamiento de Bonferroni. También se realizó un análisis de correlación lineal entre el % av contra los datos del ensayo de citotoxicidad.

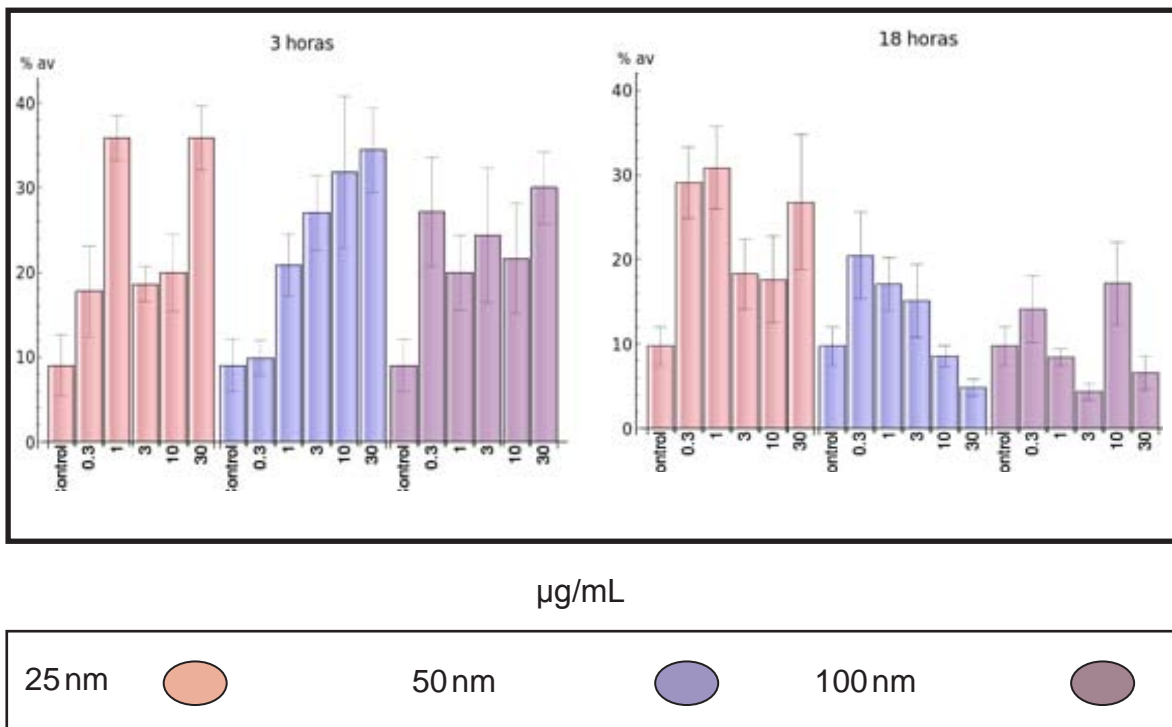
8. Resultados

8.1. Análisis morfológico

8.1.1. Medición del porcentaje de área vacuolar

El porcentaje de área vacuolar (%av) se midió a partir de la tinción con violeta de genciana de las vacuolas traslúcidas. En cuanto a la respuesta, se observó un incremento significativo de la proporción del área utilizada por las vacuolas a periodos de exposición cortos en células HUVEC (figura 4), mientras que en las células A549 no se observó el mismo efecto (figuras 3 y 5). Con respecto al incremento del %av en las células HUVEC, se notó que las partículas de 25 nm y 50 nm producen una respuesta similar, en el incremento del %av, mayor a las de 100 nm (tabla 1). En cuanto al tiempo, se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, empezando el incremento del %av desde los primeros 30 minutos, con un aumento gradual y mantenido hasta las 3 horas; pasado este tiempo, se observó un declive en el %av (figura 3). Por último, se observó un patrón, en el que, al incrementar la concentración, se incrementa la respuesta, con diferencias significativas contra el control desde la concentración más baja 0.3 µg/mL, manteniendo estas diferencias en cada concentración.

HUVEC



A549

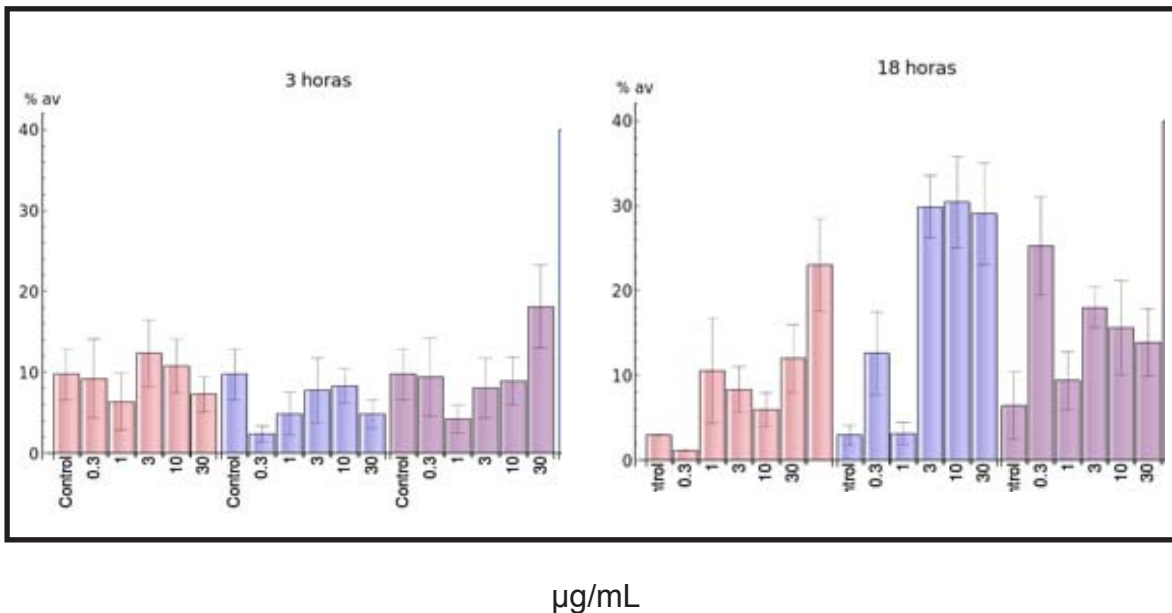


FIGURA 2. Porcentaje de área vacuolar inducida por la exposición a diferentes concentraciones de NPs-TiO₂. Se representan los promedios de los resultados por tipo de partícula y diferentes concentraciones en dos diferentes tiempos. Se observa el incremento del % de área vacuolar con mayor magnitud en HUVEC desde los primeros 30 minutos, mientras que en células A549, se observa hasta las 18 horas de exposición.

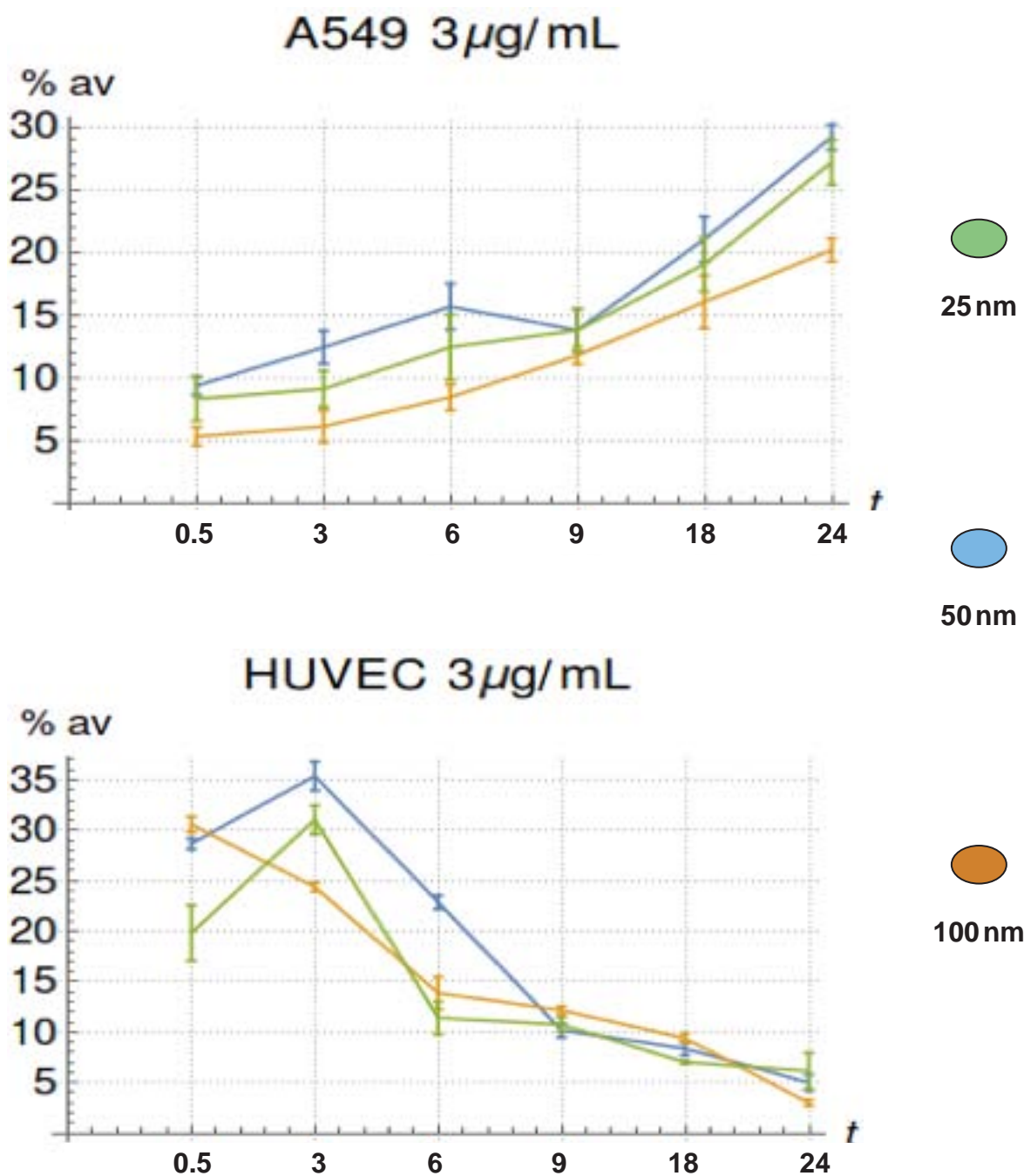


FIGURA 3. Inducción del porcentaje de área vacuolar en el tiempo. Se observa que, con mayor tiempo de exposición, el % av incrementa en las células A549, mientras que en las células HUVEC, el incremento comienza con poco tiempo de exposición y posteriormente va disminuyendo.

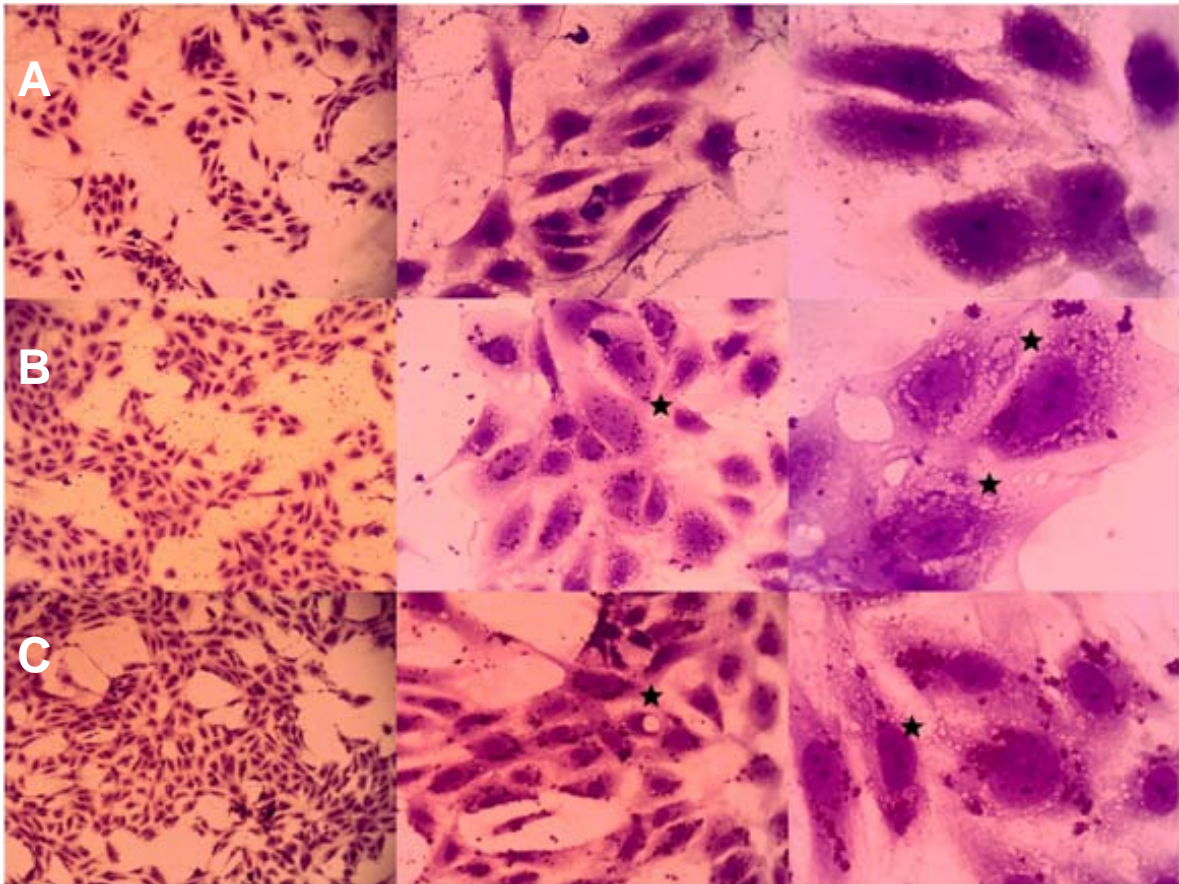


FIGURA 4. Aspecto morfológico de células HUVEC expuestas 3 horas con Nps-TiO₂ de 50nm. Las estrellas señalan la localización de estrés vacuolar. A) control negativo; B) 3µg/mL; C) 10µg/mL. Se muestran a tres diferentes aumentos, siendo de la primera a la tercera columna 10X, 40X y 100X, respectivamente.

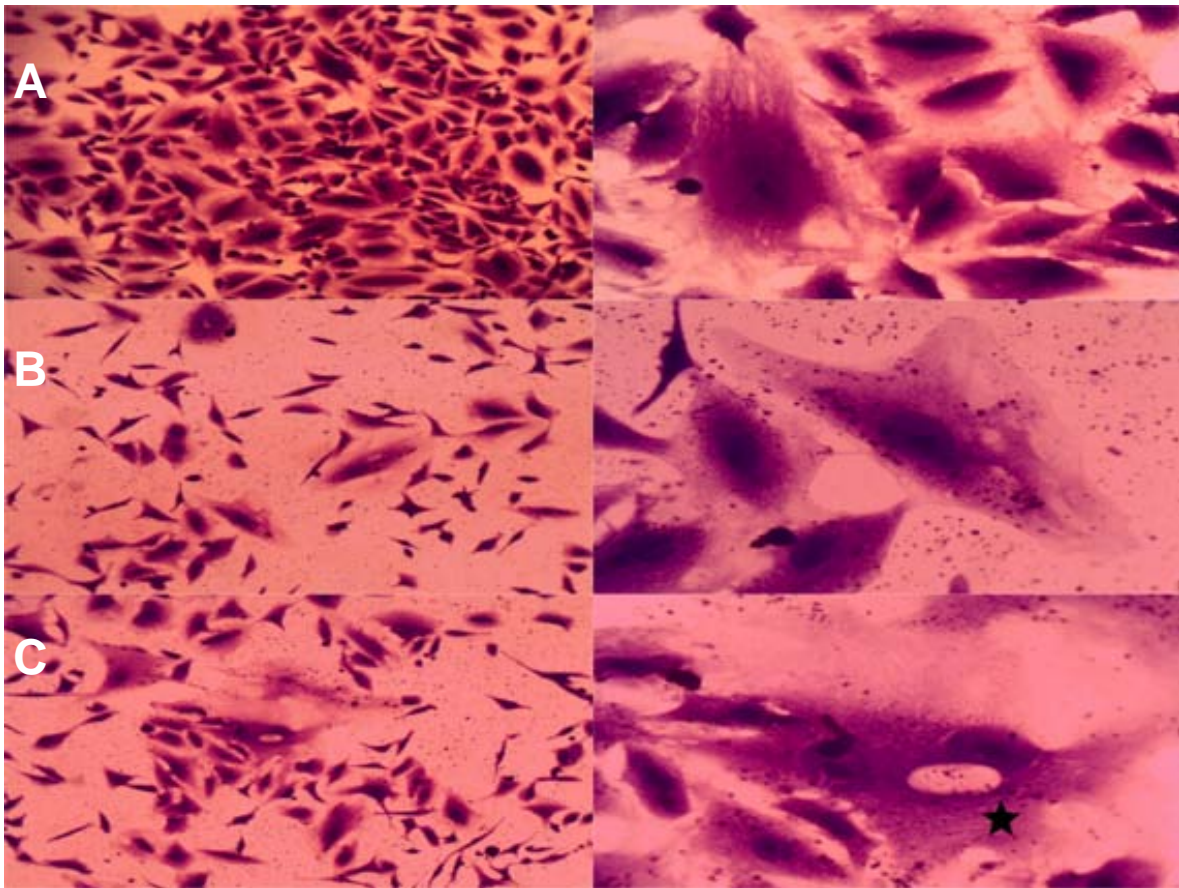


FIGURA 5. Células A549 expuestas durante 3 horas con Nps-TiO₂ de 50nm. Las estrellas señalan la localización de área de estrés vacuolar. A) control negativo; B) 3 µg/mL; C) 10 µg/mL. Se muestran dos diferentes aumentos que corresponden 10X y 40X, respectivamente.

HUVEC	Bonferroni	pValue
TP	25nm=50nm>100nm	0.0000488043
t	{-<3h},{-,6h=9h}	1.54219 * 10 ⁻⁸
C	{-,<0.3},{-<1,= 3= 10},{-<30}	7.47751 * 10 ⁻⁶
A549		
TP	25nm=50nm>100nm	0.00303683
t	{-< 12h=18h} {-<24h}	4.52674 * 10 ⁻¹³
C	---	0.049361

TABLA 1. Porcentaje de área vacuolar, resultados MANOVA. TP, tamaño de partícula; t, tiempo de exposición; C, concentración.

8.1.2. Ultraestructura

Se analizó la ultraestructura de las diferentes células, expuestas a las NPs-TiO₂ de 50 nm a las concentraciones de 0.3, 3, 10 y 100 µg/mL, a 3 horas de exposición, enfocándose en la estructura de las membranas de las vacuolas y en la integridad de los núcleos. Se observaron las mismas alteraciones en ambos tipos celulares, las cuales fueron: las vacuolas presentan reforzamiento de la membrana; son electrotraslúcidas, no obstante, se puede observar en el interior de las vacuolas material, probablemente celular, entre lo que se pudo distinguir mitocondrias en degeneración; además, presentan forma irregular y se puede observar que existe fusión entre ellas, explicando el incremento de tamaño de las vacuolas observada desde el análisis morfológico. El núcleo no presenta rupturas ni ninguna clase de daño aparente, sólo se observa que es desplazado por el incremento en la cantidad y tamaño de las vacuolas, además no se observa una condensación de la cromatina. También se observan procesos de endocitosis: existen a lo largo de la membrana tanto lamelopodios, como invaginaciones, lo que hace pensar en un incremento de las vías de endocitosis de una forma mixta, tanto macropinocitosis, como endocitosis. Otro hallazgo importante es la presencia de daño mitocondrial, ya que se observan fragmentos de mitocondrias y otras en proceso de degeneración o lisis (figuras 6 y 7).

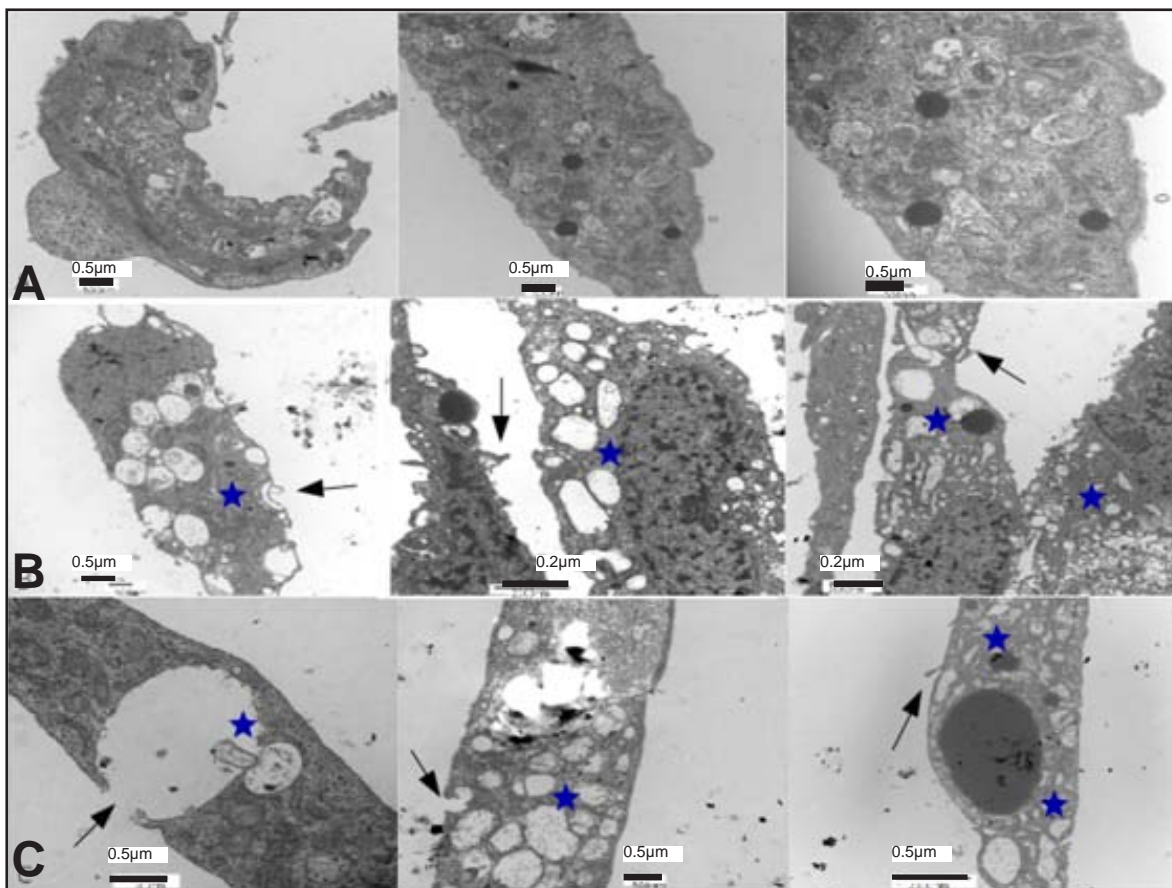


FIGURA 6. Ultraestructura de células HUVEC a 3 horas de exposición con Nps-TiO₂ de 50nm. Las estrellas señalan áreas de estrés vacuolar. A) control negativo; B) con 3µg/mL. Las flechas señalan puntos donde se presentan fenómenos de endocitosis, se puede observar tanto formación de lamelopodios y la formación de invaginaciones; C) con 10µg/mL. La flecha representa el rompimiento de una vacuola y procesos de endocitosis.

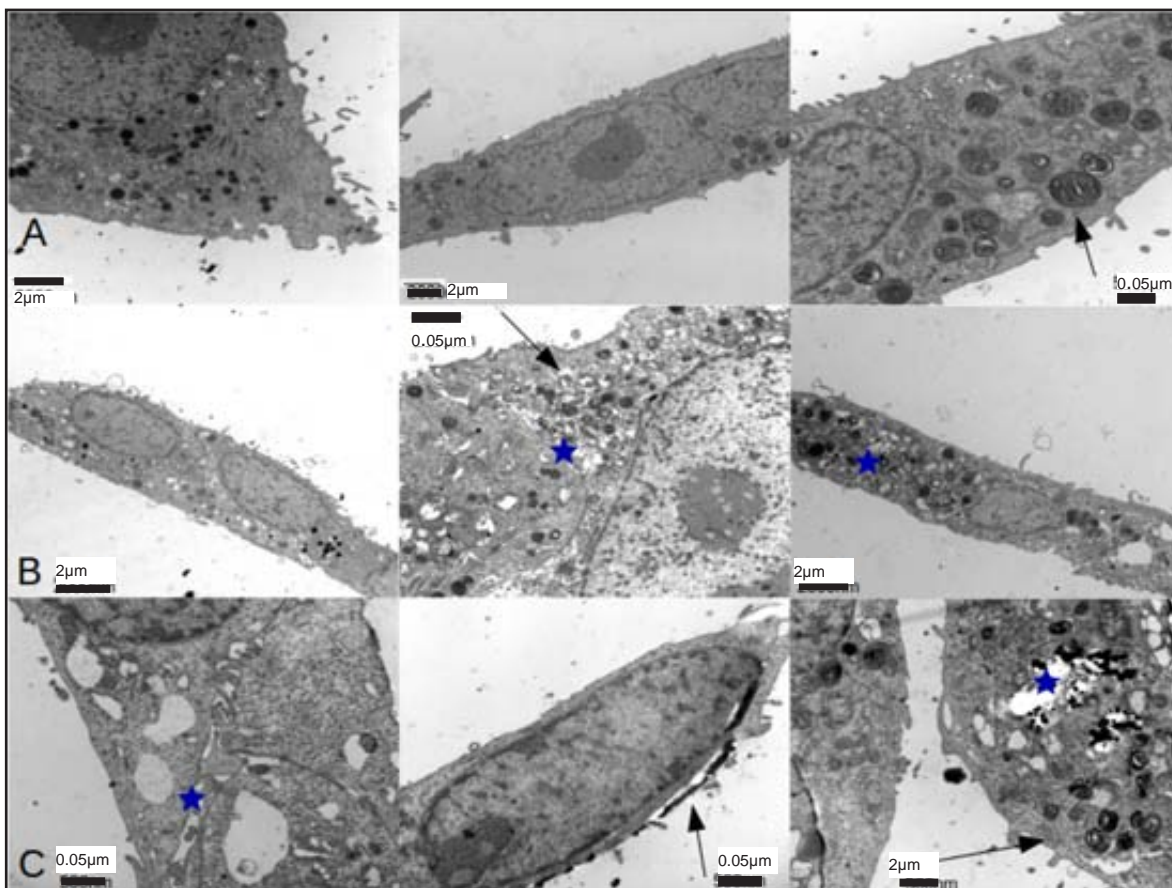


FIGURA 7. Ultraestructura de células HUVEC a 3 horas de exposición con Nps-TiO₂ de 50nm. Las estrellas señalan áreas de estrés vacuolar. A) control negativo. Flecha señala los cuerpos lamelares propios de estas células; B) con 3 µg/mL. La flecha señala estrés vacuolar y contenido dentro de las vacuolas; C) con 10 µg/mL. La flecha representa procesos de endocitosis. Se observa cómo las Nps-TiO₂ se aglomeran cerca del núcleo.

8.1.3. Tinción con anaranjado de acridina

No se observó la presencia de vacuolas acídicas, que a ese pH deben aparecer de color anaranjado, tanto en HUVEC como en A549. Por tanto, no se descarta la presencia de lisosomas y/o que exista una unión entre las vacuolas observadas y los lisosomas (figura 8).

8.2. Análisis de citotoxicidad

Se realizó mediante la medición de LDH liberada. En ambos tipos celulares se observó un incremento en la liberación de esta enzima. Sin embargo, la respuesta es diferente entre ellas. En las células HUVEC no se observaron diferencias significativas en cuanto a la respuesta, tomando en cuenta el tamaño de la partícula. Por otra parte, los factores de tiempo y concentración presentaron un efecto similar: al aumentar tanto el tiempo como la concentración, se observó un incremento gradual y significativo en cuanto a la cantidad de LDH liberada (figura 9). En las células A549 sí existe una diferencia significativa en la liberación de la enzima, siendo las partículas de 50nm las que presentaron una respuesta mayor, mientras que las de 25nm y 100nm son parecidas (tabla 3). El tiempo de exposición fue un factor relevante en la respuesta para este tipo de célula: hasta 24 horas se presentan las diferencias significativas a altas concentraciones ($p < 0.05$). Durante la exposición a tiempos cortos y bajas concentraciones no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (figura 10).

HUVEC	Bonferroni	pValue
TP	-----	8.03364
t	-<3h<24h	.000176022
C	-<0.3=1= 3=10<100	3.46879 * 10 ⁻⁹
A549		
TP	100<25nm<50nm	5.95658 * 10 ⁻⁸
t	-<24h	0.0471185
C	{-, .3}{-, 1},{-, 3},{-, 10}{-, 100}	0.00549948

TABLA 2. MANOVA. LDH. TP, tamaño de partícula; t, tiempo; C, concentración.

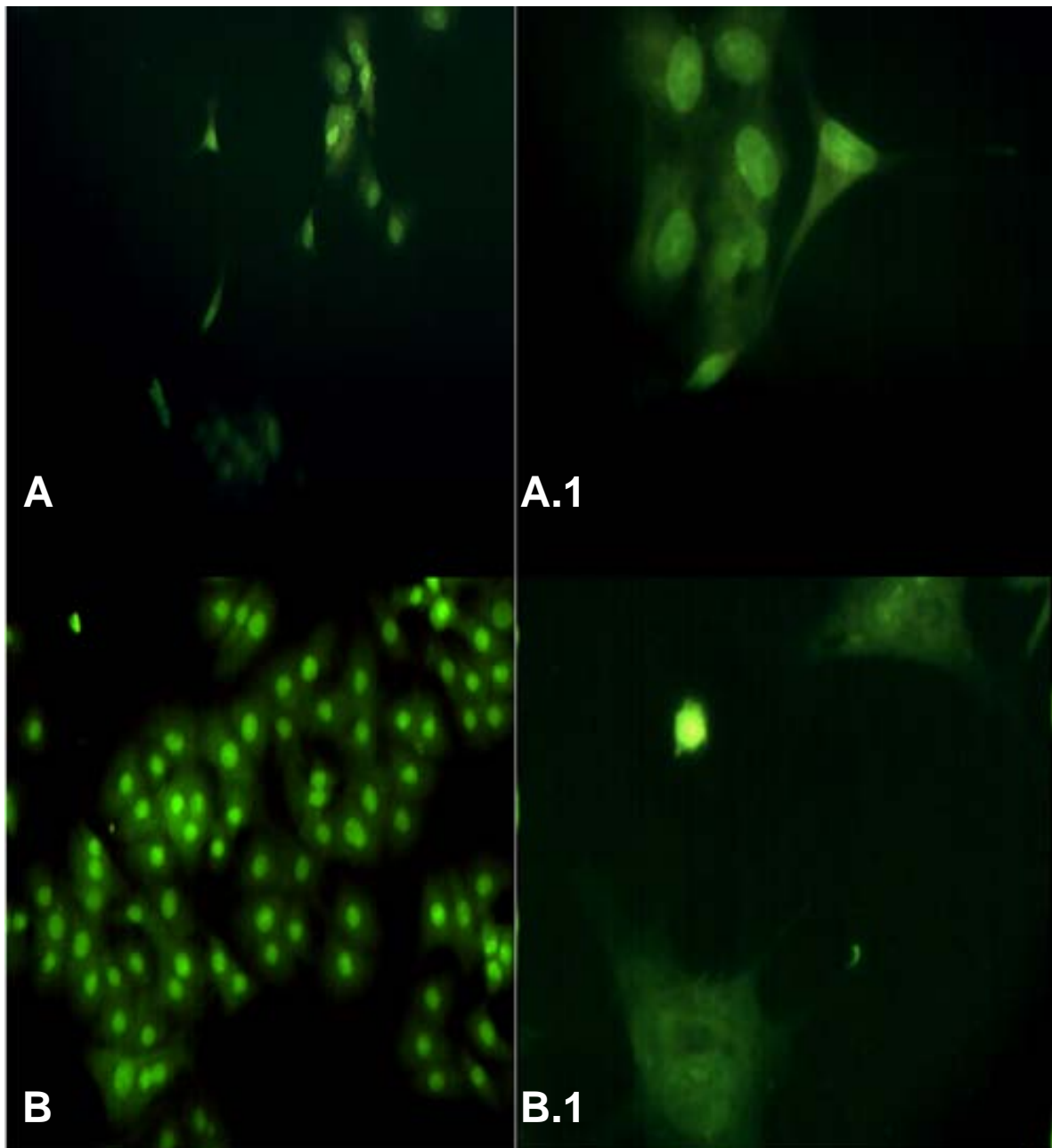


FIGURA 8. Tinción de anaranjado de acridina en células expuestas durante 3 horas a 3 µg/mL de NPs-TiO₂ de 50 nm. a) células HUVEC control negativo; A1) HUVEC con tratamiento 40X; B) células A549 control negativo; B1) A549 con tratamiento 40X. No se observa la presencia de ningún lisosoma: ausencia de vacuolas de color anaranjado.

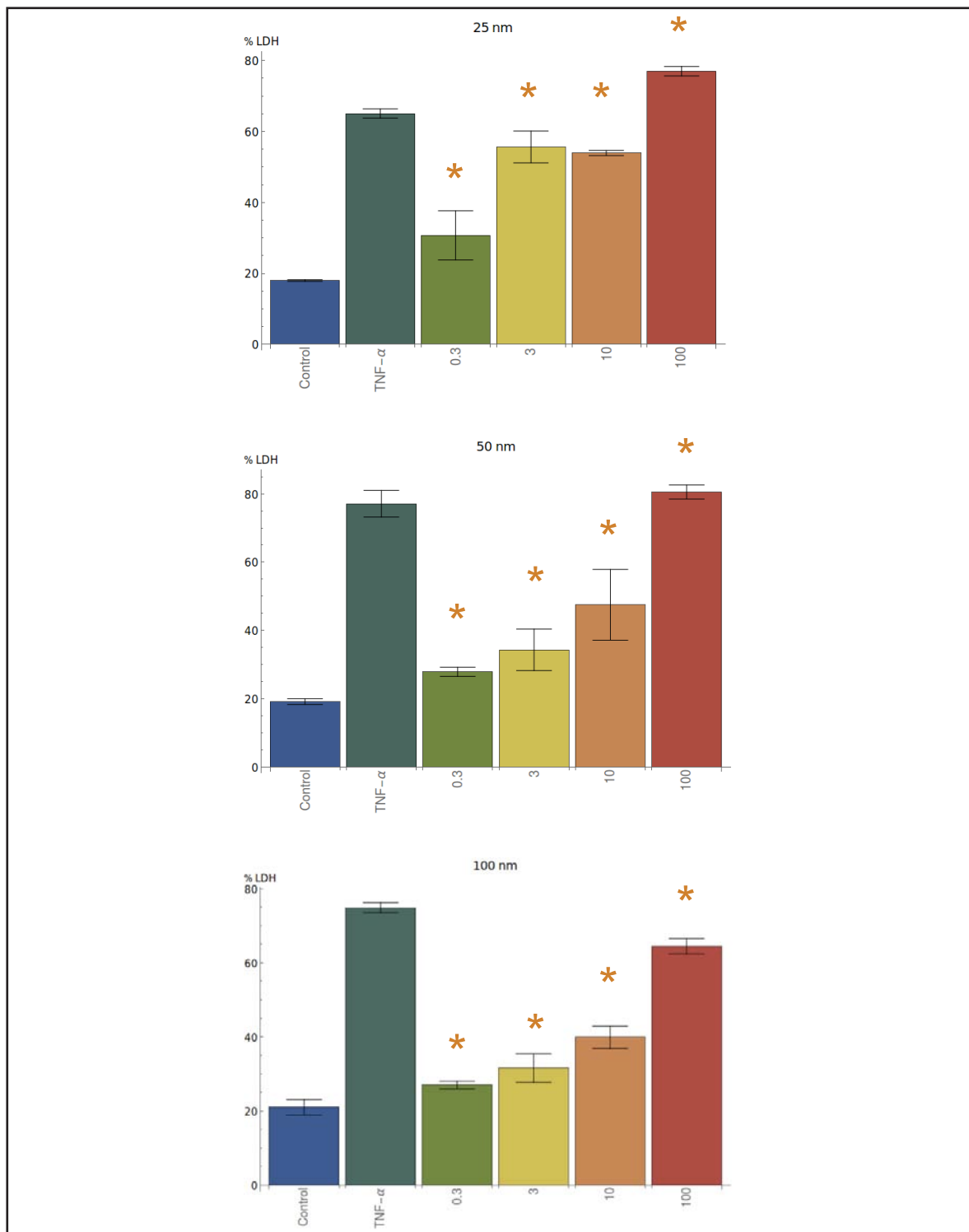


FIGURA 9. Porcentaje de liberación de DLH en células HUVEC expuestas por 3 horas a NPs-TiO₂. La concentración está en μ g/mL. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo. Se puede observar un patrón de dosis respuesta con los tres tamaños de partículas.

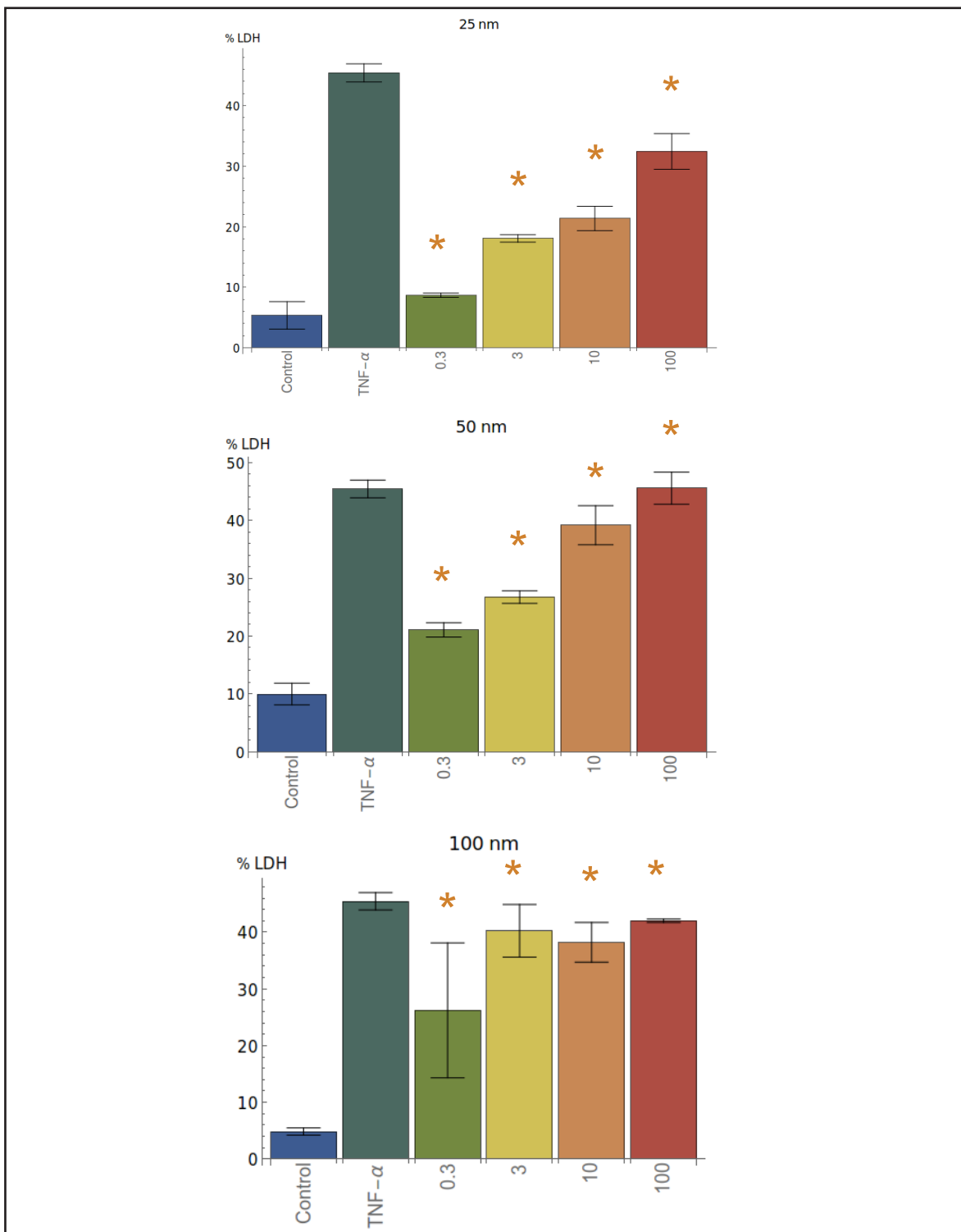


FIGURA 10. Porcentaje de liberación de DLH en células A549 expuestas por 3 horas a NPs-TiO₂. La concentración está en μ g/mL. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo. Se puede observar un patrón de dosis respuesta con los tres tamaños de partículas.

8.3. Correlación lineal LDH %av

En las células HUVEC se observó una relación lineal positiva entre el incremento del %av y la cantidad de LDH liberada. Esta relación sólo se observa para los tiempos de 30 minutos y hasta las 3 horas. Por otra parte, se observó que, conforme aumenta el tiempo de exposición, se va perdiendo la relación, y en los experimentos de 24 horas no existe dicha relación. En las células A549 no existe la relación lineal en estos parámetros y no se realizó el análisis al no ser significativo el incremento del %av.

Tratamiento	Modelo lineal	r
30 min 25 nm	$-7.99104 + 0.68404x$	0.951915
3 h 25 nm	$12.0815 + 0.115396x$	0.683312
24 h 25 nm	$-36.4217 + 0.75699x$	-.024551
30 min 50 nm	$-119238 + 0.755031x$	0.86597
3 h 50 nm	$-0.8099 + 0.668359x$	0.719905
24 h 50 nm	$17.9648 - 0.216286x$	0.0723736
30 min 100 nm	$-5.59533 + 0.474812x$	0.810351
3 h 100 nm	$7.42672 + 0.481588x$	0.340747
24 h 100 nm	$100.263 - 0.49496x$	-0.178419

TABLA 3. Modelo de lineal. HUVEC.

8.4. Análisis de fragmentación de DNA

Los geles de agarosa no revelaron la presencia de fragmentación de DNA como una imagen de “escalera” típica de degradación de DNA en apoptosis. Los resultados fueron consistentes tanto para el DNA de células en sobrenadante, como en células adheridas (figura 11). Por tanto, no se documentó el proceso de apoptosis en tiempos cortos antes de 24 horas de tratamiento.

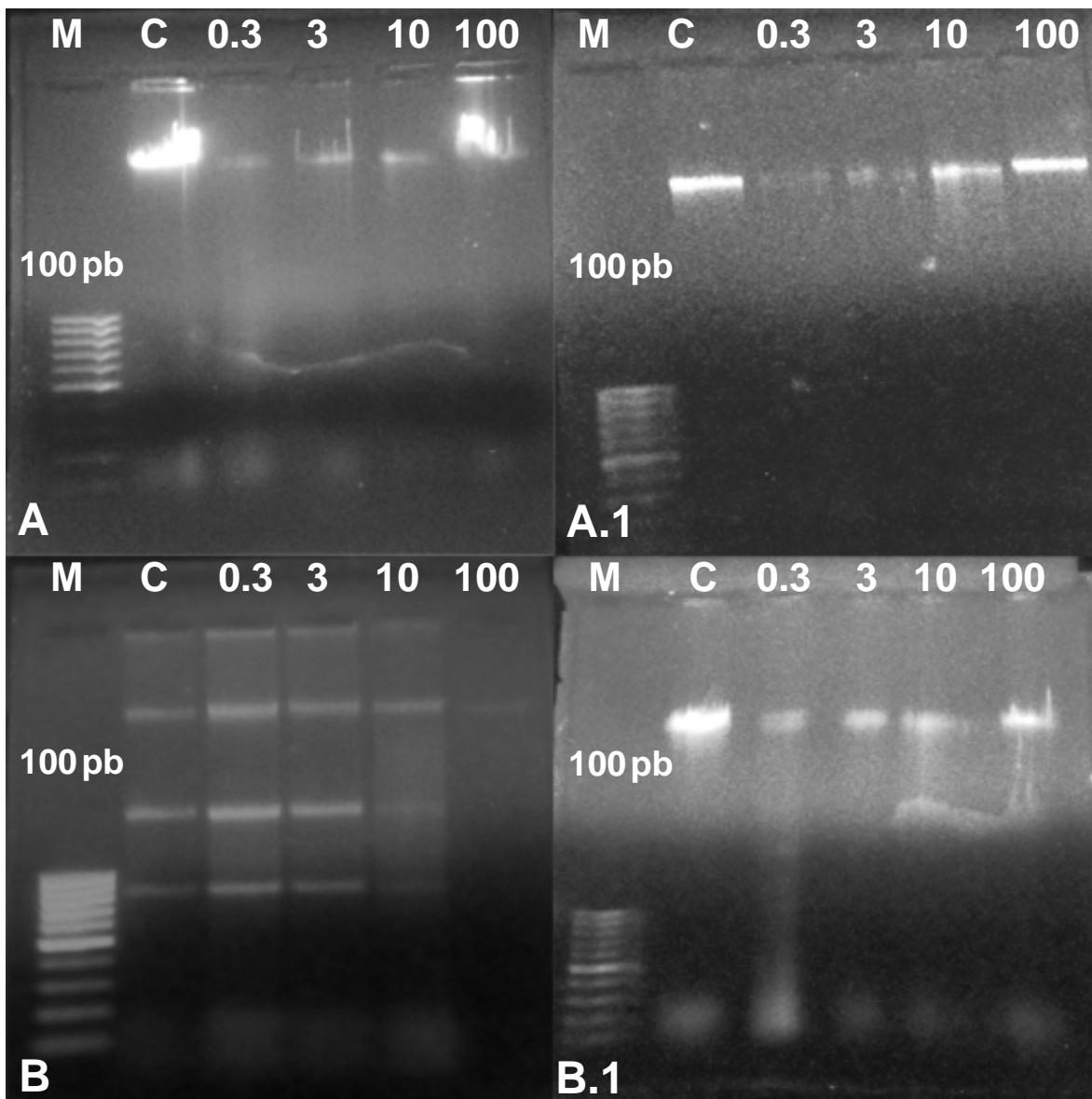


FIGURA 11. Geles de agarosa de DNA. No se observa la escalera de degradación del DNA típica de la apoptosis. A) células HUVEC suspendidas 30 minutos; A.1) células HUVEC adheridas 30 minutos de exposición; B) células HUVEC suspendidas 24 horas; B.1) células HUVEC adheridas 24 horas. El marcador molecular corresponde a 100pb.

	Incremento del %av	Vacuolas traslucidas	Vacuolas sin contenido	Vacuolas detectables con anaranjado de acridina	Vacuolas de una sola membrana	Escalera de DNA	Integridad núcleo	Endocitosis
<i>Methuosis</i>	Si	Si	Si	No	Si	No	Si	Si
<i>HUVEC</i>	Si	Si	No	No	No	No	Si	Si
<i>A549</i>	No	Si	No	No	No	No	Si	Si

TABLA 4. Resumen de los resultados obtenidos. Se comparan las características obtenidas en las células HUVEC y A549 y las observadas en methuosis y autofagia.

9. Discusión

El objetivo de este estudio fue comprobar si las NPs-TiO₂ provocan methuosis en las células A549 y las HUVEC. Los resultados muestran que los cambios morfológicos parecen corresponder a una desregulación importante de las vías de endocitosis. El incremento del %av está influenciado por el tamaño de las NPs-TiO₂ más que por el tiempo de exposición y la concentración. Los tamaños de 25 y 50nm fueron los más tóxicos en ambos tipos celulares. Esto concuerda con estudios previos, en los que se observó que la exposición a NPs con menor tamaño tiende a inducir en mayor grado el mal funcionamiento en las vías lisosomales (Tedesco, Doyle, Blasco, Redmond, y Sheehan, 2010). El tiempo de exposición con las NPs-TiO₂ desempeña un papel importante en el incremento del %av, observándose una respuesta desde los 30 minutos hasta las 3 horas en las células HUVEC. Estos resultados concuerdan con la posibilidad de que la desregulación de las vías lisosomales sea un proceso reversible, como

se ha reportado previamente (Maltese y Overmeyer, 2014), dando como resultado el proceso de exocitosis, el cual es similar al de las células de músculo liso, proceso en el que cierto porcentaje de las NPs-TiO₂ son expulsadas (Panyam y Labhassetwar, 2003). Por otra parte, hay que tener en cuenta que el área total de la célula a tiempos largos tiene un efecto sobre la medida de la disminución del tamaño propio de la célula, provocando un error de medición.

No obstante, no se descarta el hecho de que haya un daño a la célula en el que se involucren los componentes del citoesqueleto (Hernández-Gutiérrez, 2015). Contrariamente, en las células A549 a tiempos cortos no se observó un incremento del % av; sin embargo, en el análisis se encontró que a las 18 horas de exposición existe una diferencia significativa; además, se han reportado efectos tóxicos en esta línea celular posterior a las 24 horas (Ispanixtlahuatl-Meráz, 2015), tales como la inducción de macropinocitosis y endocitosis (Thurn et al., 2011), por lo que se puede decir que el efecto tóxico en este tipo celular con las NPs-TiO₂ recae principalmente en el tiempo de exposición más que en la concentración y el tamaño de partícula.

Por otra parte, en cuanto a lo observado con el análisis de citotoxicidad en células HUVEC, se observó un incremento significativo en la muerte celular, lo cual reportan en trabajos previos como con 20% de las células muertas de apoptosis, mientras que 60% se asemeja a necrosis (Montiel-Dávalos et al. 2012). Esto muestra un aspecto importante, al considerar la methuosis como un tipo de necrosis, presentando las características señaladas previamente, así como otros tipos de muerte debido a la desregulación lisosomal. Sumado a esto, también se ha mencionado que

en el proceso se comparten algunas características con apoptosis como la activación de caspasa-3. Por tal motivo, se recomienda hacer un análisis más exhaustivo para comprobar a detalle el proceso que ocurre durante tiempos cortos de exposición a las NPs-TiO₂.

Una vez más el efecto observado en las células A549 difiere del observado en las células HUVEC: en este tipo de células no se observó un incremento significativo a concentraciones cortas ni tiempos cortos; con todo, sigue concordando con el hecho de que este tipo de células son más resistentes, y se ha reportado que incluso a concentraciones de 10 µg/cm² durante 24 horas no se produce una diferencia significativa con respecto al control (Ispanixtlahuatl-Meráz, 2015). Un aspecto relevante para el proyecto es la relación directa entre el incremento del %av y la muerte celular, con el fin de establecer que la exposición a las NPs-TiO₂ se vincula con el incremento en el área vacuolar, el cual se asocia con un tipo de estrés en la célula que eventualmente genera la muerte celular. Se observó que existe la relación al menos en los tiempos cortos de 30 minutos hasta 3 horas en las células HUVEC.

De esta forma se comprueba que el incremento del %av está relacionado con la muerte celular. Posiblemente la relación lineal en las HUVEC se pierde a tiempos largos, debido a que se produce más de un tipo de estrés en la célula, además del ya mencionado, generando más de un tipo de muerte celular. De esta forma, el incremento del área vacuolar no tiene un incremento significativo en función del tiempo tanto como el incremento de muerte celular, además de considerar que es un proceso reversible. Con el conocimiento de esto, se prosiguió a comprobar aspectos morfológicos e integridad del DNA que concordaran con el proceso de

methuosis. Como se observa en la tabla 1, aparentemente las vacuolas presentadas tanto en las células HUVEC como en las células A549 no son del todo compatibles con las descritas para el fenómeno de methuosis, ya que, como se observa en las imágenes de microscopia electrónica, la ultraestructura de las vacuolas corresponde a una cubierta de doble membrana, con aspectos que difieren de la methuosis. Además las vacuolas presentaron contenido y forma redonda y amorfa, diferenciándolas de methuosis, en la que sólo hay vacuolas amorfas y sin contenido. Por tanto, se descarta que suceda un proceso de methuosis, sino que se trata de una desregulación de las vías de endocitosis. Con el sustento de esto, se observaron lamelopodios e invaginaciones, por lo que se plantea que las vías de endocitosis no son excluyentes y, por tal motivo, se presentan más de una a la vez; sin embargo, es preciso buscar con marcadores más sensibles para comprobar lo expuesto anteriormente.

La explicación planteada a los resultados obtenidos se basa en estudios previos sobre los efectos tóxicos de las NPs-TiO₂, en los que se relacionan procesos de inflamación y un incremento del estrés oxidante (Li, Xia, y Nel, 2008), aspectos que se pueden inferir al ver la degradación de mitocondrias (Montiel-Dávalos, A. et al., 2012; Ramos-Godínez et al., 2013). Otro aspecto importante para explicar los resultados es la comprobación de la internalización de las NPs-TiO₂ a las células, lo cual produce alteraciones en las vías lisosomales, que a su vez son compartidas en diversos tipos celulares. (Stern y Johnson, 2008; Conner y Schmid, 2003). Se ha comprobado que con las NPs-TiO₂ se activan las vías endocíticas de clatrina, caveolina y macropinositosis (Thurn et al., 2011). Por tanto, es posible pensar que un evento similar puede estar ocurriendo en las célu-

las HUVEC desde los 30 minutos de exposición y probablemente se pueda producir en las células A549 con exposiciones más prolongadas. En este trabajo se plantea que la exposición a NPs-TiO₂ provoca una desregulación en las vías de endocitosis, basados en la evidencia de ultraestructura, el incremento del %av y el análisis de citotoxicidad. Ello puede tener una relación con estudios previos, en los que se ha observado el aumento de estrés oxidativo, acumulación de proteínas dañadas, daño al retículo endoplásmico y daño mitocondrial (Stern, Adisheshaiah, y Crist, 2012; He y Klionsky, 2009). Por otra parte, también existe evidencia de que la inflamación producida por nanopartículas genera un evento de regulación negativa, que puede bloquear los mecanismos de autofagia por medio del inflamasoma y concluir en mal funcionamiento vesicular (Shi et al., 2014).

Por último, se ha propuesto que la vía de autofagia se activa como respuesta a los nanomateriales como vía de degradación de las partículas que logran introducirse a la célula (Stern, Adisheshaiah, y Crist, 2012). No obstante, se produce una permeabilización de la membrana del lisosoma como resultado de la inhibición de enzimas lisosomales y sustratos no metabolizables, tales como las nanopartículas, y, de esta forma, puede alterar e interrumpir la fusión entre ellos (Futerman y van Meer, 2004), lo que da como resultado la muerte de las células. Es importante comprender esto, ya que dicho conocimiento puede ser aplicado al presente estudio y sustentado con trabajos previos. A partir de los resultados obtenidos, se puede mencionar que las NPs-TiO₂ inducen alteraciones al tráfico vacuolar y la fusión de los lisosomas. Este bloqueo de la fusión puede ser la causa de que no se hayan observado lisosomas con la tinción de anaranjado de acridina. Asimismo, este fenómeno ha sido observado

también en fibroblastos de ratón (Jin et al., 2008) y células epiteliales de bronquios (Hussain et al., 2010), con estas mismas partículas. Por tanto, se propone como una alteración a las vías de los procesos de endocitosis que culmina en una mezcla de éstos. Así pues, se plantea que la muerte celular se debe al estrés vacuolar producido en la célula y que culmina en la ruptura de la membrana (figura 12). Por ello, no se encuentran evidencias suficientes por el momento para comprobar el proceso de methuosis en estos tipos celulares con la exposición a Nps-TiO₂, ya que, como se ha mencionado, éste es un proceso que inicia a tiempos cortos, tal como ocurrió en las células HUVEC desde los 30 minutos de exposición, con el incremento en el %av, sin mencionar que se presentan estructuras como lamelopodios, lo cual concuerda con los primeros pasos de macropinositosis, vía que presenta desregulación en la methuosis. No obstante, la ultraestructura mostró que no hay concordancia debido al reforzamiento de las vacuolas y la presencia de material en el interior de ellas.

En última instancia, es importante hacer notar el tiempo al que se está expuesto a las NPs-TiO₂, ya que, además de producir los efectos comúnmente asociados a ellas, como el estrés oxidativo, los procesos inflamatorios y los efectos mencionados aquí (como la inhibición de enzimas lisosomales) también son considerados materiales biopersistentes (Ueng, Kang, Wang, Cheng, y Chiang, 1997; Shcharbin, Jokiel, Klajnert, y Bryszewska, 2006), lo que significa que son capaces de producir una exposición local crónica. Por tal motivo, y teniendo como base el modelo inicial planteado, las NPs-TiO₂ pueden permanecer en contacto con los neumocitos II y generar así algún efecto tóxico de los que se enumeran en el presente estudio para las células A549. Todo esto, a tiempos largos,

podría ocasionar algún trastorno respiratorio en modelos *in vivo*.

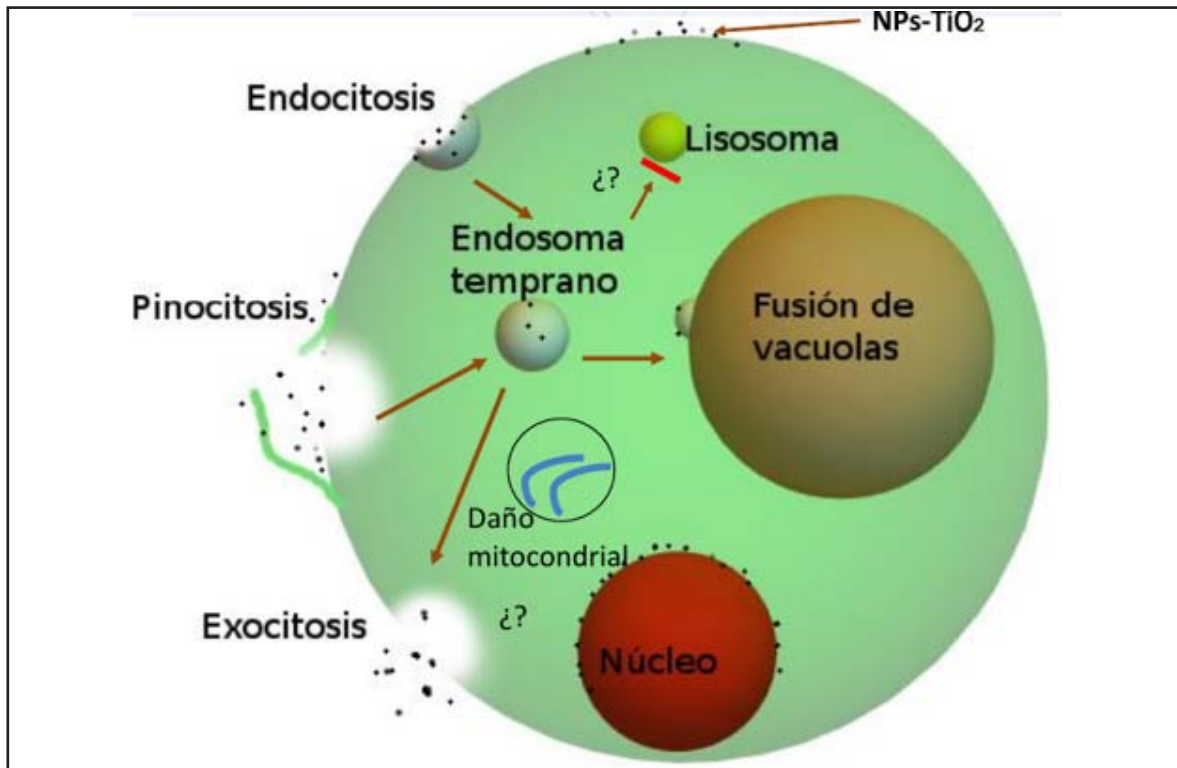


FIGURA 12. Modelo de los procesos que ocurren en las células al exponerse a NPs-TiO₂. Existe una inducción de diversas vías de endocitosis. Se dispara al contacto de las Nps-TiO₂ con la membrana de la célula y, de esta forma, se internan las nanopartículas en vacuolas, las cuales no llegan a unión con lisosomas por alteraciones ocasionadas en estas vías. Posteriormente, las vacuolas se fusionan entre ellas, produciendo la ruptura de la membrana. Se observa que las NPs se aglomeran cerca del núcleo de la célula.

10. Conclusiones

- Las Nps-TiO₂ producen un incremento en el % av desde tiempos cortos en células HUVEC, mientras que en A549 no se ve este incremento hasta después de las 18 horas.
- Las vacuolas inducidas tanto para HUVEC como para A549 no presentan características ácidas, presentan material en el interior y doble cubierta.
- No se observó evidencia de que a tiempos cortos se produzca un proceso apoptótico en ninguno de los dos tipos celulares.
- Las Nps-TiO₂ inducen más de un tipo de proceso de endocitosis, de los cuales en el presente estudio se proponen pinocitosis y endocitosis independientes de clatrin.
- Por tanto, no hay evidencia por el momento para continuar con la búsqueda del fenómeno de methuosis en células HUVEC ni A549. Además de que se corroboró que hay alteraciones en las vías endocíticas que se correlaciona con muerte celular.

11. Anexo

11.1 Técnica para la extracción de cultivo primario de células endoteliales de vena umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endotelial-Cells, HUVEC*)

Materiales:

- uniforme de cirugía, gorro, cubre bocas, guantes y botas;
- gasas y gasas estériles;
- navajas;
- botella, aproximadamente de 600 ml con 100 ml de agua inyectable o HE-PES 1x;
- jeringa de 20 mL;
- botellas de cultivo de 75 cm²; una por cada dos cordones;
- pinzas;
- cinchos;
- tijeras;
- tres vasos de precipitado;
- cánulas;
- papel aluminio;
- cordones umbilicales y
- guantes estériles.

Soluciones

- HEPES 1X
- Medio M199 completo
- Suero Fetal Bovino (SFB)
- Colagenasa 0.02%
- Gelatina 0.02%

Recolección de Cordones Umbilicales

Los cordones se recolectaron en el Hospital General de Zona N° 2-A Troncoso. Dirección: Añil 144, entre Francisco del Paso y Troncoso, esq. Viaducto, Col. Granjas México. CP 08400. Deleg. Iztacalco, DF.

Procedimiento

1. Estando en el Hospital colocarse la bata para ingresar en la entrada principal, dirigirse a la sala de partos donde entregarás el permiso de recolección a la jefa de enfermeras y comentar tu asunto.
2. Colocarse el uniforme. (Ver material). Buscar los contenedores con bolsas de color amarillo, que es donde se encuentran los cordones y placentas que se obtuvieron en las cirugías y partos de ese día. Ya ubicados los contenedores, destapar la botella en la que se recolectarán las muestras y tomar la navaja, esto para evitar manchar con sangre el lugar y el uniforme.
3. Localizar la placenta con el cordón dentro de la bolsa amarilla. En caso de que estén unidos a la placenta, limpiar la base del cordón con la navaja (con la parte contraria al filo) y cortar uno o dos centímetros por arriba de la unión. Colocar el cordón dentro de la botella y cerrar.
4. Una vez terminada la recolección, avisar a la jefa de enfermeras que has terminado. Quitarse el uniforme de cirugía y guardarlo para llevarlo a lavandería.

Obtención de células a partir de cordones

1. Cubrir la campana con aluminio. Para esto, rociar alcohol y colocar el aluminio.
2. Preparar las cajas de cultivo con 2 mL de gelatina (uniformemente sobre la superficie de la caja) para sembrar las células obtenidas.
3. Preparar todo el material requerido para procesar dentro de la campana.

4. Colocar tres vasos de precipitados, cada uno con una cierta cantidad de HEPES.
5. Ponerse los guantes estériles. Nota: una vez colocados los guantes estériles no sacar las manos.
6. Sacar de la botella de recolección los cordones y ponerlos en el primer vaso de precipitado.
7. Tomar con las pinzas uno de los cordones y limpiarlo con la gasa estéril.
8. Colocar el cordón sobre la campana, rociarle alcohol y limpiarlo con la gasa no estéril.
9. Tomar con las pinzas la cánula y meterla lentamente en la vena del cordón, cuidando de no perforarlo.
10. Una vez metida la cánula, ayudarse con las tijeras para evitar que salga y así poder pinzar.
11. Ya que se ha pinzado, se coloca el primer cincho por debajo de la pinza y se aprieta fuertemente.
12. Se toma HEPES con la jeringa (del segundo vaso de precipitado) y se ajusta a la cánula para lavar el cordón, colocándolo sobre el vaso donde están los otros cordones con el fin de lavar, con la mano se aprieta el cordón del otro extremo y se le vuelve a agregar HEPES para verificar que no esté picado. Hacer pasar HEPES dos veces más o hasta observar que no sale tanta sangre, posteriormente cinchar el otro extremo del cordón.
13. Tomar colagenasa con la jeringa, ajustar a la cánula y agregarla al cordón. Se va tocando el cordón verificando que no quede con mucha presión porque podría romperse.
14. De esta manera se mete el cordón en el tercer vaso de precipitado, y se tapa con aluminio (para conservar el calor).

15. Se lleva a baño maría por 20 minutos, agitando el vaso cada 10 minutos.
16. Se trasladan los cordones a la campana.
17. Se toma un cordón con las pinzas y se limpia con la gasa estéril.
18. Asegurarse de volver a apretar los cinchos para evitar fugas.
19. Con la jeringa se recupera la colagenasa previamente inyectada en la vena umbilical, esto se puede hacer disponiendo el cordón de manera horizontal o con cierto ángulo de inclinación respecto a la base de la campana (con la jeringa hacia abajo) e ir enrollando la parte superior con ayuda de los dedos al tiempo que se extrae la solución con ayuda del émbolo de la otra mano.
20. La colagenasa recuperada se lleva a un tubo de 50 mL al cual previamente se le agregó 1 mL de SFB para su inactivación.
21. Ya que el cordón no está turgente, por ausencia de solución dentro de la vena, se realiza un masaje a lo largo del cordón, con ayuda de una gasa tomada por los dedos pulgar, índice y medio si así se prefiere.
22. Terminado el masaje, se realizan de 2 a 3 lavados con solución de HEPES 1X tomando con la jeringa la cantidad aproximada que se observó tenía el cordón y se hace pasar nuevamente por la vena hasta alcanzar una turgencia moderada. No olvidar los masajes.
23. Se recupera el volumen de HEPES 1X de la misma manera que se realizó con la colagenasa y se lleva el volumen al tubo de 50 mL.
24. Para el último lavado con HEPES 1X se masajea el cordón y se corta la parte inferior del mismo a la altura del cincho. (el más distal a las pinzas).
25. El extremo liberado del cordón se presenta en la boca del tubo de 50 mL teniendo cuidado de no tocarlo y se hace pasar el HEPES 1X. Nota: Los lavados pueden variar, teniendo en cuenta que para cada tubo de 50 mL se contemplan dos cordones 25 mL para cada uno.

26. Una vez obtenidas las células de dos cordones cerrar el tubo y centrifugar a 1200 rpm durante 8 min. Las células se re suspenden con un mililitro de medio M199 y se siembran en botellas de 75 cm² con medio M199 llevando a un volumen total de 8 mL. Nota: A las botellas de 75 cm² previamente se les debió de colocar gelatina al .02% durante 30 minutos (antes de sembrar retirar la gelatina), la cantidad es de 2mL por caja y se distribuye bien de tal manera que la superficie quede completamente cubierta.
27. Las botellas se llevan a incubar a 37°C, con 5% de CO₂.

Lavado de las células

Después de 24 horas de obtención de las células endoteliales se realizan lavados con HEPES 1X de la siguiente manera:

1. Observar las células al microscopio.
2. Con el medio de la caja hacer lavados de manera suave y posteriormente desecharlo.
3. Lavar con 4mL de HEPES 1x, cuidando de no despegar las células.
4. Se observan en el microscopio para ver la cantidad de células que se encuentran en la caja, si la cantidad de células adheridas es mayor de un 20% se volverá a lavar hasta observar que no haya células sin adherirse, de lo contrario se desecha la caja.
5. Al terminar los lavados se adiciona 8 mL de medio M199 complementado.

NOTA: Se recomienda hacer los cambios de medio cada tercer día, debido a que el medio tiende a acidificarse más rápidamente (viraje de anaranjado-amarillo) ya que la densidad celular aumenta y se liberan productos de desecho.

Procedimientos accesorios

Preparación de un litro de medio m199

Medio M199	9.5 g.
L-glutamina	0.292 g. (2mM)
Bicarbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	2.2 g.
HEPES	
Agua bi-destilada estéril	
Heparina en solución de 5 UI/mL.	

11.2. Tinción vital con anaranjado de acridina

- *Buffer I* pH 3.0:
 - 125 mL dH₂O
 - 40 uL EDTA 0.5 M
 - 26.48 mL ácido cítrico* 0.1 M
 - 6.85 mL Na₂HPO₄ 0.2 M*
 - 13.69 g sucrosa 0.2 M
 - 0.2 mL triton X-100 1%
 - csp 200 mL
- *Buffer II* citrato-fosfato a pH 3.8:
 - 150 dH₂O
 - 9.92 ml ácido cítrico* a 0.1 M
 - 5.46 mL Na₂HPO₄ 0.2 M*
 - 1.7 g NaCl
 - csp 200 mL
- Ioduro de propidio stock: 50 µg ioduro de propidio/ml PBS.
- Ioduro de propidio solución de trabajo: 2 µL IP en 498 µL de PBS más 10 µg de RNAsa.

- Anaranjado de acridina stock: 2 mg/mL anaranjado de acridina en dH₂O.
- Anaranjado de acridina solución de trabajo: diluir 1:100 en *Buffer II*
- Glicerol: 1:1 glicerol y dH₂O.

*Ácido cítrico 0.1 M: (FW 192.1); 1.921g/ 100 mL dH₂O.

*Fosfato monobásico de sodio Na₂HPO₄ (FW 142.0) 0.2 M: 2.839g/100 mL dH₂O

11.3 Buffer de lisis

Buffer de lisis 50 ml:

- Tris-HCl pH: 8 a 10 mM
- 0.5% SDS
- 100mM EDTA
- 0.02 mg/mL RNAsa A
- .1 mg/mL proteinasa-K

Lista de referencias

- Alfaro-Moreno, E. et al. (2008). Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM₁₀. *Eur. Respir. J.*, 32, 1184–1194.
- Berube, D., Cummings, C., Cacciatore, M., Scheufele, D. & Kalin, J. (2011). Characteristics and classification of nano-particles: expert Delphi survey. *Nanotoxicology*, 5, 236–43.
- Bhanot, H., Young, A. M., Overmeyer, J. H. & Maltese, W. a. (2010). Induction of nonapoptotic cell death by activated Ras requires inverse regulation of Rac1 and Arf6. *Mol. Cancer Res.*, 8, 1358–1374.
- Bucio-López, L. (2013). *Evaluación de las alteraciones en el ciclo celular de neumocitos expuestos a nanopartículas de dióxido de titanio*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Conner, S. D. & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37–44.
- Cristhiam, R.-R. et al. (2016). *TiO₂ nanoparticles induce the expression of early and late receptors for adhesion molecules on monocytes*.
- Chi, S. et al. (1999). Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*, 18, 2281–2290.
- Donaldson, J. G., Porat-Shliom, N. & Cohen, L. A. (2009). Clathrin-independent endocytosis: A unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cell. Signal.*, 21, 1–6.
- Fadeel, B. (2012). Clear and present danger? *Swiss Med. Wkly.*, 142, 1–9.
- Fortwendel, J. R., Juvvadi, P. R., Rogg, L. E. & Steinbach, W. J. (2011). Regulatable ras activity is critical for proper establishment and maintenance of polarity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell*, 10, 611–615.
- Futerman, A. H. & van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat.*

Rev. Mol. Cell Biol., 5, 554–565.

- Galluzzi, L. et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19, 107–120.
- Gao, G. et al. (2013). Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J. Hazard. Mater.*, 258-259, 133–143.
- Hamilton, R. F. et al. (2009). Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part. Fibre Toxicol.*, 6, 35.
- He, C. & Klionsky, D. J. (2009). Regulation Mechanisms and Signalling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.*, 43, 67.
- Hernández-Gutiérrez, L. (2015). *Evaluación de la exposición a nanopartículas de dióxido de titanio en la remodelación de citoesqueleto*. Universidad Autónoma de México.
- Hu, R. et al. (2010). Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO₂ nanoparticles. *Biomaterials*, 31, 8043–8050.
- Hubbs, A. F. et al. (2011). Nanotoxicology--a pathologist's perspective. *Toxicol. Pathol.*, 39, 301–324.
- Hussain, S. et al. (2010). Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bron-chial epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.*, 7, 10.
- Ispanixtlahuatl-Meráz, O. (2015). *Papel de la dineína citoplasmática en células epiteliales de pulmón expuestas a nanopartículas de dióxido de titanio*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jin, C.-Y., Zhu, B.-S., Wang, X.-F. & Lu, Q.-H. (2008). Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibro-blast cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 1871–1877.
- Li, C., MacDonald, J. I. S., Hryciw, T. & Meakin, S. O. (2010). Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma

- Daoy cells. *J. Neurochem.*, *112*, 882–899.
- Li, N., Xia, T. & Nel, A. (2008). The Role of Oxidative Stress in Ambient Particulate Matter- induced Lung Diseases and Its Implications in the Toxicity of Engineered Nanoparticles. *Free Radic. Biol. Med.*, *44*, 1689–1699.
- Majno, G. & Joris Isabelle. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *Am. J. Pathol.*, *146*, 3–15 (1995).
- Maltese, W. a. & Overmeyer, J. H. (2014). Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macrophagosome and endosome compartments. *Am. J. Pathol.*, *184*, 1630–1642.
- Montiel-Dávalos, A. et al. (2012). TiO₂ nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. *Chem. Res. Toxicol.*, *25*, 920–30.
- Moreno, E. A., Cuellar, C. G., Ruiz, A. D. V. & Rojas-Bracho, L. (2009). Air Pollution. Health and Environmental Impacts, 249–275. En <behind Particulate Matter Air Pollution-Related Health Effects>
- Nara, A., Aki, T., Funakoshi, T. & Uemura, K. (2010). Methamphetamine induces macropinocytosis in differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.*, *1352*, 1–10.
- Overmeyer, J. H., Kaul, A., Johnson, E. E. & Maltese, W. a. (2008). Active ras triggers death in glioblastoma cells through hyperstimulation of macropinocytosis. *Mol. Cancer Res.*, *6*, 965–977.
- Overmeyer, J. H., Young, A. M., Bhanot, H. & Maltese, W. a. (2011). A chalcone-related small molecule that induces methuosis, a novel form of non-apoptotic cell death, in glioblastoma cells. *Mol. Cancer*, *10*, 69.
- Panyam, J. & Labhasetwar, V. (2003). Dynamics of Endocytosis and Exocytosis of Poly (D, L-Lactide- co -Glycolide). *Nanoparticles in Vascular Smooth Muscle Cells.*, *20*, 212–220.
- Racoosin, E. L. & Swanson, J. a. (1993). Macrophagosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell Biol.*, *121*, 1011–1020.

- Ramos-Godínez, M. D. P., González-Gómez, B. E., Montiel-Dávalos, A., López-Marure, R. & Alfaro-Moreno, E. (2013). TiO₂ nanoparticles induce endothelial cell activation in a pneumocyte-endothelial co-culture model. *Toxicol. Vitr.*, *27*, 774–781.
- Reyes-Reyes, E. M., Teng, Y. & Bates, P. J. (2010). A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: Uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism. *Cancer Res.*, *70*, 8617–8629.
- Robinson, M. W., Overmeyer, J. H., Young, A. M., Erhardt, P. W. & Maltese, W. A. (2012). Synthesis and Evaluation of Indole-Based Chalcones as Inducers of Methuosis, a Novel Type of Nonapoptotic Cell Death. *J. Med. Chem.*, *55*, 1940–1956.
- Ross, M. H. & Pawlina, W. (2011). Respiratory System. En *Histology A Text and Atlas* (ed. Taylor, C.) 664–697 (Lippincott Williams & Will-kins).
- Shcharbin, D., Jokiel, M., Klajnert, B. & Bryszewska, M. (2006). Effect of dendrimers on pure acetylcholinesterase activity and structure. *Bioelectrochemistry*, *68*, 56–59.
- Shi, C. et al. (2014). Activation of Autophagy by Inflammatory Signals Limits IL-1 β Production by Targeting Ubiquitinated Inflammasomes for Destruction. *Nat. Immunology*, *13*, 255–263.
- Stern, S. T. & Johnson, D. N. (2008). Role for nanomaterial-autophagy interaction in neurodegenerative disease. *Autophagy*, *4*, 1097–1100.
- Stern, S. T., Adisheshaiah, P. P. & Crist, R. M. (2013). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. Part. Fibre Toxicol. *9*, 20 (2012).
- Stoccoro, A., Karlsson, H. L., Coppedè, F. & Migliore, L. (2013). Epigenetic effects of nano-sized materials. *Toxicology*, *313*, 3–14.
- Swanson, J. a & Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.*, *5*, 424–428.
- Takaki, K., Higuchi, Y., Hashii, M., Ogino, C. & Shimizu, N. (2014). Induction of apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in leukemia L1210 cells by TiO₂ nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.*, *117*, 129–133.

- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G. & Sheehan, D. (2010). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.*, *100*, 178–186.
- Thurn, K. T. et al. (2011). Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, *7*, 123–130.
- Trabbic, C. J. et al. (2015). Synthesis and Biological Evaluation of Indolyl-Pyridinyl-Propenones Having Either Methuosis or Microtubule Disruption Activity. *J. Med. Chem.* doi:10.1021/jm501997q
- Ueng, T. H., Kang, J. J., Wang, H. W., Cheng, Y. W. & Chiang, L. Y. (1997). Suppression of microsomal cytochrome P₄₅₀-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullerenol, a polyhydroxylated fullerene C₆₀. *Toxicol. Lett.*, *93*, 29–37.
- Urrutia-Ortega, I. M. (2011). Efecto de la exposición a nanopartículas de dióxido de titanio en la función mitocondrial de pulmón. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vevers, W. F. & Jha, A. N. (2008). Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology*, *17*, 410–420.
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L. & Von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.*, *47*, 2242–2250.
- Wittmaack, K. (2007). In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nano-particle exposure: Particle number, surface area, or what? *Environ. Health Perspect.*, *115*, 187–194.
- Yin, Z. F., Wu, L., Yang, H. G. & Su, Y. H. (2013). Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *15*, 4844–58.
- Yu, J. X. & Li, T. H. (2011). Distinct biological effects of different nanoparticles commonly used in cosmetics and medicine coatings. *Cell Biosci.*, *1*, 19.
- Ze, Y. et al. (2013). Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere*, *92*, 1183–1189.

- Ze, Y. et al. (2014). Neurotoxic characteristics of spatial recognition damage of the hippocampus in mice following subchronic peroral exposure to TiO₂ nanoparticles. *J. Hazard. Mater.*, 264, 219–229.
- Zhao, J. et al. (2009). Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the cas-pase-8/Bid and mitochondrial pathways. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 72, 1141–1149.