



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LAS NANOFIBRAS DE DIÓXIDO DE TITANIO PROMUEVEN MARCADORES
ANGIOGÉNICOS, DE TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA E INESTABILIDAD
GENÓMICA EN CÉLULAS PULMONARES CONDUCIENDO A LA FORMACIÓN DE
TUMORES FIBRÓTICOS Y DESDIFERENCIADOS EN UN MODELO DE
XENOTRASPLANTE

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ESTEFANY INGRID MEDINA REYES

DIRECTOR DE TESIS
DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
FACULTAD DE QUÍMICA
DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2019



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.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el laboratorio 10 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala bajo la dirección de la Dra. Yolanda Irasema Chirino López.

Gracias a los recursos otorgados por la Universidad Nacional Autónoma de México y su dependencia DGAPA por el apoyo PAPIIT (IN218015).

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con el número de becario 576227 y CVU 579881.

Todas las imágenes de microscopía confocal se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP8 X otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 268769).

Gracias al comité tutor conformado por el Dr. José Pedraza Chaverri y el Dr. Federico Ávila Moreno que contribuyó con mi formación académica durante todo el doctorado.

Gracias al Dr. Rogelio Hernández Pando por la determinación de la histopatología y al Dr. Jorge Barrios por la asistencia en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Gracias al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por la beca otorgada para la realización de una estancia de dos meses en el *“National Institute for Public Health and the Environment”* en Países Bajos.

RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
Capítulo 1	
Nanopartículas: clasificación, beneficios, producción y ganancias	14
1.1 Nanotecnología, nanomateriales y clasificación de las nanopartículas.....	15
1.2 Aplicaciones, beneficios y toxicidad de las nanopartículas en general.....	22
1.3 Nanopartículas más producidas a nivel mundial y ganancias anuales: Dióxido de titanio.....	31
Capítulo 2	
Toxicidad inducida por el dióxido de titanio	36
2.1 La toxicidad depende de la forma, el tamaño, la proteína corona y el órgano con el que entre en contacto.....	37
2.2 Vías de exposición: Dérmica y oral.....	39
2.2.1 Vías de exposición: Inhalatoria.....	43
2.3 Regulación de las nanopartículas.....	48
Capítulo 3	
Fibras: Su impacto en el mercado, beneficios, toxicidad y su implicación en procesos como la transición epitelio mesénquima, fibrosis y angiogénesis	49
3.1 Fibras: Usos, ganancias y toxicidad de las nanofibras.....	50
3.2 Toxicidad de nanofibras de dióxido de titanio.....	51
2. HIPÓTESIS.....	54
3. OBJETIVO.....	55
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
4.1 Síntesis y caracterización de las nanofibras de TiO ₂	56
4.1.1 Síntesis.....	56
4.1.2 Estructura cristalina.....	56
4.1.3 Tamaño y morfología de las nanofibras de TiO ₂	57
4.1.4 Potencial eléctrico de las nanofibras de TiO ₂ y tamaño de aglomerados en medio F12K.....	57
4.2 Modelo <i>in vitro</i> : células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂	57
4.2.1 Cultivo celular y exposición a nanofibras de TiO ₂	57

4.2.2	Internalización de las nanofibras de TiO ₂	57
4.2.3	Citotoxicidad y proliferación de las células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂	58
4.2.4	Marcadores de angiogénesis y fibrosis en cultivo celular después de la exposición a nanofibras de TiO ₂	60
4.2.5	Inestabilidad genómica por la exposición a nanofibras de TiO ₂	61
4.3	Modelo de Xenotrasplante de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂ y trasplantadas en ratones inmunosuprimidos.....	62
4.3.1	Mantenimiento de los ratones.....	62
4.3.2	Xenoinjerto subcutáneo de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂ en ratones inmunosuprimidos.....	62
4.3.3	Histología, conteo de eritrocitos y forma de los tumores formados a partir de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂	64
4.3.4	Expresión de marcadores de angiogénesis, proliferación, muerte celular y transición epitelio mesénquima en los tumores formados a partir de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂	64
4.3.5	Cuantificación del contenido de colágeno en los tumores formados a partir de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂	65
4.4	Diferencias en el ciclo celular y la sensibilidad a cisplatino entre el modelo de cultivo <i>in vitro</i> y el modelo de tumores por xenotrasplante.....	66
4.5	Análisis estadísticos.....	67
5.	RESULTADOS.....	68
5.1	Modelo <i>in vitro</i>	68
5.1.1	Caracterización de las nanofibras de TiO ₂	68
5.1.2	Las nanofibras de TiO ₂ son internalizadas por las células epiteliales de pulmón sin modificar la morfología celular.....	69
5.1.3	La exposición a nanofibras de TiO ₂ induce liberación de LDH como marcador de citotoxicidad y disminución de Ki67 como marcador de proliferación.....	71
5.1.4	Células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂ sobreexpresan marcadores de angiogénesis.....	72
5.1.5	La exposición a nanofibras de TiO ₂ induce sobreexpresión de marcadores profibróticos en células epiteliales de pulmón.....	74
5.1.6	La inestabilidad genómica incrementa en células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO ₂	76

5.2	Modelo de xenotrasplante en ratones inmunosuprimidos.....	77
5.2.1	El desarrollo de los tumores no modifica el consumo de alimento, agua o peso de los ratones.....	77
5.2.2	La exposición a nanofibras de TiO ₂ induce tumores de forma irregular, con mayor filtración de eritrocitos, desdiferenciación e incrementada expresión de HIF-1α.....	78
5.2.3	Las células expuestas a nanofibras de TiO ₂ desarrollan tumores con mayor proliferación, menor muerte celular y mayor fibrosis.....	81
5.2.4	Los tumores desarrollados a partir de células expuestas a TiO ₂ sobreexpresan marcadores de transición epitelio mesénquima.....	83
5.2.5	La exposición a nanofibras de TiO ₂ no induce cambios en el ciclo celular sin embargo disminuye la sensibilidad al cisplatino.....	86
6.	DISCUSIÓN.....	89
7.	CONCLUSIÓN.....	97
8.	PERSPECTIVAS.....	98
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	99
10.	Proyecto realizado durante la estancia de investigación en el “<i>National Institute for Public Health and the Environment</i>” en Países Bajos.	111
	 “El modelo de interface aire-líquido es más sensible que el modelo sumergido para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de nanofibras de TiO₂ pero no de nanoesferas de TiO₂”	
10.1	INTRODUCCIÓN.....	112
10.2	HIPÓTESIS.....	114
10.3	OBJETIVO.....	115
10.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	116
10.4.1	Caracterización de las nanopartículas.....	116
10.4.2	Potencial eléctrico de las nanofibras de TiO ₂ en suspensión.....	116
10.4.3	Cultivo de células de adenocarcinoma pulmonar.....	116
10.4.4	Determinación de especies reactivas de oxígeno en cultivos expuestos a nanofibras y nanoesferas de TiO ₂	116
10.4.5	Cuantificación de muerte celular en cultivos expuestos a nanofibras y nanoesferas de TiO ₂	117

10.4.6	Cuantificación de marcadores de genotoxicidad en células expuestas a nanofibras y nanoesferas de TiO ₂	117
10.4.7	Internalización de nanofibras y nanoesferas de TiO ₂ en el núcleo celular de células epiteliales de pulmón.....	118
10.4.8	Análisis estadísticos.....	118
10.5	RESULTADOS.....	119
10.5.1	Cantidad y tamaño de nanopartículas, capacidad oxidante y propiedades fisicoquímicas de las nanofibras y nanoesferas de TiO ₂	119
10.5.2	Las nanofibras de TiO ₂ inducen mayor producción de ROS que las nanoesferas de TiO ₂ en los cultivos celulares sumergidos.....	120
10.5.3	La citotoxicidad en el cultivo de interface aire-líquido es más evidente que en el cultivo celular sumergido para las nanofibras pero más atenuante para las nanoesferas de TiO ₂	121
10.5.4	La genotoxicidad en células expuestas a nanofibras de TiO ₂ es mayor en el cultivo de interface aire-líquido que en el cultivo celular sumergido.....	124
10.5.5	La genotoxicidad en células expuestas a nanoesferas de TiO ₂ es menor en el cultivo de interface aire-líquido que en el cultivo celular sumergido.....	130
10.5.6	En el cultivo celular sumergido y en el cultivo celular de interface aire-líquido las nanofibras de TiO ₂ logran entrar al núcleo celular.....	136
10.6	DISCUSIÓN.....	140
10.7	CONCLUSIÓN.....	143
10.8	PERSPECTIVAS.....	144
10.9	BIBLIOGRAFÍA.....	145
11.	ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	146
11.1	Artículo de titulación: Environ. Sci.: Nano, 2019 ; 6:286-304. Factor de impacto: 6.08. Primer autor.....	147
11.2	Investigational New Drugs. 2019 Jun 8. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s10637-019-00789-1. Factor de impacto 3.5. Primer autor.....	149
11.3	Colloids Surf B Biointerfaces. 2018 ;162:193-201. Factor de impacto 3.99. Segundo autor.....	151

11.4	Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems. 2017 ;34(1):35-61. Factor de impacto 3.3. Primer autor.....	153
11.5	Mol Reprod Dev. 2016 ;83(10):927-937. Factor de impacto 3.1. Quinto autor.....	155
11.6	J Appl Toxicol. 2015 ;35(10):1073-85. Factor de impacto 2.9. Tercer autor.....	157
12.	ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN O BAJO REVISIÓN	159
12.1	Comparison of liquid and solid administration of food-grade titanium dioxide (E171) on testicle of mice. Bajo revisión en Journal of Applied Toxicology. Factor de impacto 2.9. Primer autor.....	160
12.2	Comparison of Air-Liquid Interface culture and submerged cell culture on DNA damage of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanofibers and nanospheres. En preparación. Primer autor.....	--

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vitral de arte islámico hecho con nanopartículas de cloruro de oro y de óxidos metálicos.....	19
Figura 2.	Número de publicaciones anuales sobre nanotecnología registradas en la base de datos de NCBI pubmed desde el año 2000 hasta el 2018.....	20
Figura 3.	Clasificación de las nanopartículas de acuerdo a su composición y forma.....	22
Figura 4.	Número de compañías productoras o distribuidoras de las diferentes formas de nanopartículas por continente.....	32
Figura 5.	Porcentaje de TiO ₂ utilizado en cada una de sus aplicaciones.....	33
Figura 6.	Distribución del TiO ₂ en el tracto respiratorio de acuerdo al tamaño de las partículas.....	44
Figura 7.	Distribución del TiO ₂ en el cuerpo después de estar expuesto a él por diferentes vías.....	46
Figura 8.	Sitio del xenotrasplante de células epiteliales de adenocarcinoma pulmonar de humano en los ratones inmunosuprimidos.....	63
Figura 9.	Caracterización de las nanofibras de TiO ₂	68
Figura 10.	Internalización de las nanofibras de TiO ₂ después de 7 días de exposición.....	70
Figura 11.	Toxicidad celular inducida por la exposición a nanofibras de TiO ₂	71
Figura 12.	Sobreexpresión de marcadores angiogénicos después de la exposición a nanofibras de TiO ₂	73
Figura 13.	Sobreexpresión de TGF-β y N-cadherina como marcadores de transición epitelio mesénquima después de la exposición a nanofibras de TiO ₂	75
Figura 14.	Concentración intracelular de hidroxiprolina como marcador profibrótico después de la exposición a nanofibras de TiO ₂	75
Figura 15.	Inestabilidad genómica inducida por la exposición a nanofibras de TiO ₂	77
Figura 16.	Monitoreo de los ratones durante las 11 semanas del desarrollo de los tumores.....	78
Figura 17.	Imágenes representativas de los ratones con tumores formados por xenotrasplante.....	79
Figura 18.	Histología de los tumores, cuantificación de eritrocitos infiltrados y expresión de HIF-1α como marcador de angiogénesis.....	80

Figura 19.	Expresión de Ki67 y caspasa 3 como marcadores de proliferación y muerte celular.....	81
Figura 20.	Cuantificación de tejido conectivo y colágeno tipo I como marcadores de fibrosis.....	83
Figura 21.	Cuantificación de marcadores de transición epitelio mesénquima en los tumores.....	85
Figura 22.	Distribución del ciclo celular y sensibilidad al cisplatino tanto en células cultivadas en monocapa como en células aisladas de los tumores desarrollados en xenotrasplante.....	88
Figura 23.	Modelos de cultivo celular sumergido y de interface aire-líquido.....	113
Figura 24.	Número de partículas, distribución de tamaño y capacidad oxidante de las nanofibras y nanoesferas de TiO ₂	119
Figura 25.	Las nanofibras de TiO ₂ inducen mayor producción de ROS que las nanoesferas de TiO ₂	121
Figura 26.	Las nanofibras de TiO ₂ inducen mayor muerte celular que las nanoesferas de TiO ₂ tanto en modelo sumergido como en el modelo de interface aire-líquido....	123
Figura 27.	El cultivo celular de interface aire-líquido muestra mayor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 24 h a nanofibras de TiO ₂	125
Figura 28.	El cultivo celular de interface aire-líquido muestra mayor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 48 h a nanofibras de TiO ₂	127
Figura 29.	El cultivo celular de interface aire-líquido muestra mayor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 72 h a nanofibras de TiO ₂	129
Figura 30.	El cultivo celular de interface aire-líquido muestra menor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 24 h a nanoesferas de TiO ₂	131
Figura 31.	El cultivo celular de interface aire-líquido muestra menor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 48 h a nanoesferas de TiO ₂	133
Figura 32.	El cultivo celular de interface aire-líquido muestra menor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 72 h a nanoesferas de TiO ₂	136

Figura 33.	El modelo de interface aire-líquido muestra menor localización de ambas nanopartículas en el núcleo.....	137
Figura 34.	Tanto en el modelo de interface aire-líquido como en el sumergido las nanofibras de TiO ₂ logran entrar en el núcleo.....	139

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Definición de nanomaterial (NM) y nanomateriales manufacturados.....	16
Tabla 2.	Nanomedicinas aprobadas por la FDA con base lipídica.....	29
Tabla 3.	Propiedades fisicoquímicas de las nanofibras de TiO ₂	68
Tabla 4.	Características fisicoquímicas de las nanofibras y las nanoesferas de TiO ₂ suspendidas en medio de cultivo celular y agua ultrapura.....	120

RESUMEN

Introducción: El dióxido de titanio (TiO₂) se ha sintetizado desde la década de los años 30 en tamaño micrométrico, sin embargo por los años 60 comenzó a sintetizarse en tamaño nanométricos, lo cual cambia sus propiedades físicas y químicas así como su toxicidad. Durante décadas el TiO₂ se ha sintetizado en forma de esferas, cuya toxicidad ha sido bien descrita, sin embargo hace apenas unos cinco años comenzó a sintetizarse en forma de nanofibras de las cuales hay muy poca evidencia sobre su toxicidad, lo cual es importante ya que actualmente se busca reemplazar al TiO₂ en forma de esferas por las nanofibras en aplicaciones como el tratamiento de aguas residuales y los paneles solares. Los ambientes ocupacionales, es decir donde estas nanopartículas son sintetizadas representan el principal lugar de exposición por la vía inhalatoria y hay preocupación sobre los efectos tóxicos que pueden inducir, especialmente en el pulmón. En el año 2010, se clasificó al TiO₂ en el grupo 2B como posible carcinógeno para humanos por la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) cuando se está expuesto por vía inhalatoria. Aunque hay apenas una decena de publicaciones sobre la toxicidad de las nanofibras de TiO₂ y dos centenares sobre sus aplicaciones, se sabe que las nanofibras de TiO₂ pueden incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno, liberación de la enzima lactato deshidrogenasa, ruptura de los fagolisosomas, activar de manera constante del inflammasoma NLRP3 en ratones expuestos por aspiración faríngea y promover la capacidad invasiva de células expuestas. Sin embargo, todos esos hallazgos sobre su toxicidad aún no responden al cuestionamiento de si la exposición a estas nanofibras puede potenciar las características tumorales de las células.

Objetivo: En esta tesis se buscó determinar si la exposición de células epiteliales de pulmón a nanofibras de TiO₂ por 7 días induce sobreexpresión de los marcadores de angiogénesis (HIF-1 α , VEGF) y de transición epitelio mesénquima (TGF- β , N-cadherina, E-cadherina, y vimentina) en un modelo *in vitro*; y si dicha exposición incrementa la inestabilidad genómica y la proliferación celular. Por otro lado, determinar si los daños observados en las células epiteliales de pulmón expuestas *in vitro* durante 7 días pueden conducir a la formación de tumores de mayor volumen, con un fenotipo más agresivo y con menor sensibilidad al antineoplásico cisplatino.

Materiales y métodos: Para lo anterior, se sintetizaron nanofibras de TiO₂ para posteriormente exponer en un modelo *in vitro* células epiteliales de pulmón a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO₂ durante 7 días y determinar en estas células la inestabilidad genómica

y la expresión de marcadores de angiogénesis, fibrosis, transición epitelio mesénquima así como su sensibilidad a diferentes concentraciones de cisplatino. Por otro lado, en un modelo *in vivo* con ratones inmunosuprimidos se realizó un xenotrasplante con las células que habían sido expuestas por 7 días. Se inyectaron 3×10^6 células en la subdermis de los ratones y durante 11 semanas se monitoreó el crecimiento de los tumores. Posteriormente, se recuperaron los tumores y por medio de histologías se hicieron determinaciones sobre la expresión de marcadores angiogénicos, de fibrosis y de transición epitelio mesénquima mientras que con un cultivo celular de estas células provenientes de los tumores se determinó la sensibilidad a cisplatino.

Resultados: Los hallazgos fueron que en el modelo *in vitro*, las nanofibras de TiO_2 inducen la sobreexpresión de marcadores angiogénicos, fibróticos y de transición epitelio mesénquima, inestabilidad genómica y pérdida de sensibilidad al cisplatino. En el modelo *in vivo*, los tumores no mostraron cambios en el volumen pero aquellos que se formaron a partir de células expuestas a nanofibras de TiO_2 mostraron incremento en los mismos marcadores que se evaluaron *in vitro*, además de que presentaron considerable pérdida de diferenciación celular, con una menor sensibilidad al cisplatino.

Conclusión: Con estos resultados se concluye que la exposición a nanofibras de TiO_2 sobreexpresa marcadores de angiogénesis, transición epitelio mesénquima y fibrosis en células epiteliales de pulmón en un modelo *in vitro*, lo que conduce a la formación de tumores menos diferenciados, con un fenotipo más agresivo y con pérdida de sensibilidad al cisplatino.

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

Nanopartículas: clasificación, beneficios, producción y ganancias anuales

1.1 Nanotecnología, nanomateriales y clasificación de las nanopartículas

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

El primero en hacer referencia al concepto de nanotecnología fue el físico estadounidense y ganador del Premio Nobel de física en 1965, Richard Feynman en una conferencia titulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” en el congreso de la “*American Physical Society*” llevado a cabo en “*California Institute of Technology (CalTech)*” en diciembre de 1959. Feynman hizo referencia al proceso de manipular y controlar átomos de manera individual sin embargo aún no se le conocía a esto como nanotecnología. Fue hasta unos años después que Norio Taniguchi acuñó el término nanotecnología y años después Harold Walter Kroto descubrió los fulerenos, un tipo de nanopartículas de carbón, que lo llevó a merecer el Premio Nobel en 1996.

La nanotecnología hace uso de los nanomateriales que se definen como cualquier material natural, incidental o manufacturado que contenga al menos 50% de nanopartículas libres, agregadas o aglomeradas. A su vez, una nanopartícula es definida como cualquier partícula con un tamaño entre 1 y 100 nm en, al menos, una de sus dimensiones (Unión Europea, 2011). Existen alrededor de 10 definiciones para nanomateriales y nanopartículas emitidas por diferentes organizaciones de varios países, por ejemplo *American Chemistry Council* de Estados Unidos de América, *National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme* de Australia, *Health Canada* entre otras (Tabla 1). Esencialmente todas las definiciones coinciden en que el tamaño de una nanopartículas debe ser entre 1-100 nm y que la cantidad de nanopartículas que un material debe contener para considerarse nanomaterial es de, al menos, el 50%.

Tabla 1. Definición de nanomaterial (NM) y nanomateriales manufacturados

Organización	Definición de nanomaterial	Año
<p>Royal Society & the Royal Academy of Engineering of the United Kingdom (Reino Unido)</p>	<p>Those which have structured components with at least one dimension less than 100 nm. Materials that have one dimension in the nanoscale and are extended in the other two dimensions, such as a thin films or surface coatings. Some of the features on computer chips come in this category. Materials that are nanoscale in two dimensions (and extended in one dimension) include nanowires and nanotubes. Materials that are nanoscale in three dimensions are particles, for example precipitates, colloids and quantum dots (tiny particles of semiconductor materials). Nanocrystalline materials, made up of nanometer-sized grains, also fall into this category.</p>	<p>2004</p>
<p>Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR; Unión Europea)</p>	<p>Any form of a material that is composed of discrete functional parts, many of which have one or more dimensions of the order of 100 nm or less.</p>	<p>2007</p>
<p>Cosmetic Regulation (Unión Europea)</p>	<p>Insoluble or biopersistent and intentionally manufactured material with one or more external dimensions, or an internal structure, on the scale from 1 to 100 nm.</p>	<p>2009</p>
<p>National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS; Australia)</p>	<p>Industrial materials intentionally produced, manufactured or engineered to have unique properties or specific composition at the nanoscale that is a size range typically between 1 nm and 100 nm, and is either a nano-object (i.e. that is confined in one, two or three dimensions at the nanoscale) or is nanostructured (i.e. having an internal or surface structure at the nanoscale).</p>	<p>2009</p>
<p>International organization for standardization (ISO)</p>	<p>Material with any external dimension in the nanoscale or having internal or surface structure in the nanoscale.</p>	<p>2010</p>

Health Canada (Canadá)	Manufactured substance or product, and any component material, ingredient, device, or structure to be nanomaterial if it is at or within the nanoscale in at least one external dimension, or has internal or surface structure at the nanoscale, or if it is smaller or larger than the nanoscale in all dimensions and exhibits one or more nanoscale properties/phenomena.	2011
Unión Europea	Natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm-100 nm. In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety or competitiveness, the number size distribution threshold of 50 % may be replaced by a threshold between 1 and 50%.	2011
Chemicals Watch (Unión Europea)	Nanomaterial' means a natural or manufactured active substance or non-active substance containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1-100 nm. Fullerenes, graphene flakes and single-wall carbon nanotubes with one or more external dimensions below 1 nm shall be considered as nanomaterials.	2011
The French decree on Nano (Francia)	Intentionally manufactured to a nanometric scale and containing particles in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for a minimum proportion threshold of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1-100 nm. In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety or competitiveness the minimum proportion of number size distribution threshold can be reduced.	2012

Organización	Definición de nanomaterial manufacturado	Año
Environmental Protection Agency (EPA; Estados Unidos de América)	Any particle, substance, or material that has been engineered to have one or more dimensions in the nanoscale. The term "engineered" is intended to mean that the material is 1) purposefully produced and 2) purposefully designed to be a nanoscale material.	2007
Cosmetics Regulation (Unión Europea)	Any intentionally produced material that has one or more dimensions of the order of 100 nm or is composed of discrete functional parts, either internally or at the surface, many of which have one or more dimensions of the order of 100 nm or less, including structures, agglomerates or aggregates, which may have a size above the order of 100 nm but retain properties that are characteristic to the nanoscale.	2009
International organization for standardization (ISO)	Nanomaterial designed for specific purpose or function.	2012
American Chemistry Council's (ACC's; Estados Unidos de América)	Any intentionally produced material that has a size in 1, 2 or 3 dimensions of typically between 1-100 nanometers. It is noted that neither 1 nm nor 100 nm is a 'bright line' and data available for materials outside of this range may be valuable.	2013

Feynman no se equivocó al pensar que el proceso de manipulación a escala nanométrica era parte de las futuras investigaciones, pues el crecimiento de esta disciplina ha ido en aumento desde entonces y en las últimas 3 décadas ha tenido un gran auge.

Sin embargo, hay que mencionar que los nanomateriales y las nanopartículas naturales son todas aquellas que existen *per se* tanto en los seres vivos como en algunos cuerpos abióticos como el agua y el suelo. Por ejemplo, el suelo es el principal productor de nanopartículas del planeta a través de procesos de intemperismo, en segundo lugar los ríos y en menor medida los glaciares que aportan del 0.1% al 0.01% del reservorio de nanomateriales continentales de la Tierra. De todos los nanomateriales naturales producidos en la Tierra, solo el 1.5% llega a la zona mesopelágica de los océanos (200-1000 m de profundidad) debido a que la mayor parte de las nanopartículas naturales se agregan con el Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ y SO_4^{2-} de las aguas superficiales (Hochella et al., 2012). Por otro lado, los nanomateriales también han sido utilizados por el hombre desde hace miles de años sin que lo supieran; por ejemplo del siglo VII al XIX hubo esmaltes de cerámica utilizados en el mundo islámico, y más tarde en Europa, que contenían nanopartículas de plata, cobre o estaño. También del siglo VI al XV la vidriería de las catedrales debía sus colores gracias a nanopartículas de cloruro de oro y de óxidos metálicos (Figura 1).

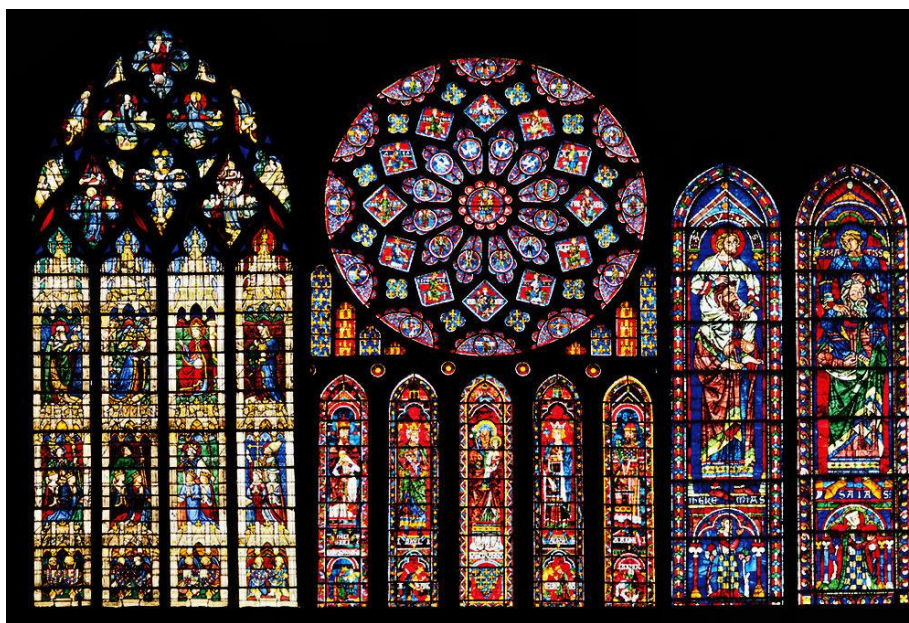


Figura 1. Vitral de arte islámico hecho con nanopartículas de cloruro de oro y de óxidos metálicos. El vitral se encuentra en la ventana sur de la Catedral de *Notre Dame*.

Con respecto a los nanomateriales incidentales, que son todos aquellos productos de algún proceso o combustión no intencionada, tenemos como ejemplo la producción de DEPs (del inglés Diesel Exhaust Particles) que son partículas liberadas después de la combustión de diesel, estas partículas han sido clasificadas como carcinógenas por la Organización Mundial de la Salud y en su mayoría son partículas de carbón, las cuales son la segunda razón, después del CO₂, del calentamiento global. De acuerdo con la Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México (SEDEMA), el transporte (camiones, Vans y automóviles) es el responsable del 46% de la contaminación en la ciudad y el área metropolitana ya que todos ellos llevan a cabo combustión de gasolina. Sin embargo, esta tesis está enfocada en los nanomateriales manufacturados que son aquellos sintetizados de manera intencional por el humano, con un tamaño, forma y composición química definida y que le han dado un gran salto a la nanotecnología y a la mayoría de los productos nanotecnológicos en el actual mercado.

Actualmente, la nanotecnología es aplicable en medicina, química, física, informática, ingeniería y biología y ha tenido un fuerte desarrollo en la investigación científica en los últimos 18 años, ejemplo de ello es el incremento de artículos científicos publicados relacionados a la nanotecnología que del año 2000 al año 2018 incrementó de 52 publicaciones a 8,216 (Figura 2, datos obtenidos de la base de datos NCBI PubMed disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=nanotechnology>). Como consecuencia del incremento en la investigación científica de los nanomateriales y en la aplicación, la producción a nivel industrial también incrementa año tras año.

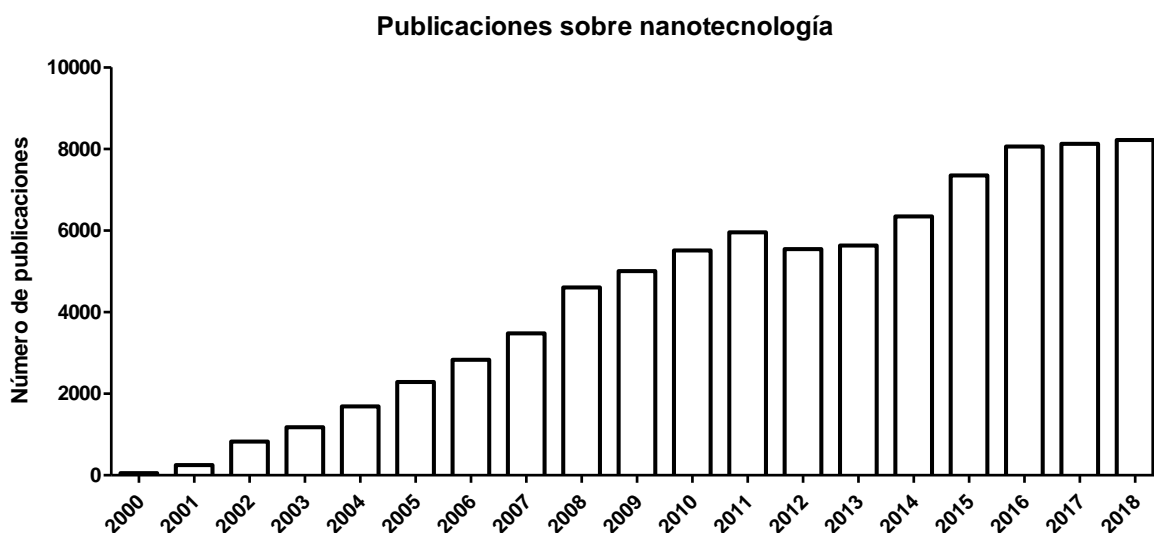


Figura 2. Número de publicaciones anuales sobre nanotecnología registradas en la base de datos de NCBI pubmed desde el año 2000 hasta el 2018.

¿Por qué tanto interés en las nanopartículas?

El éxito que ha tenido la nanotecnología ha sido por el uso de las nanopartículas. El tamaño nanométrico le proporciona a las partículas características especiales que en su tamaño micrométrico no tendrían por ejemplo, al reducir el tamaño de las partículas el área superficial incrementa lo cual permite que haya más superficie de contacto y esto consecuentemente aumenta la conductividad térmica y eléctrica de las partículas (Zulkarnain et al., 2017; Ding et al., 2016). Por otro lado, el tamaño nanométrico de las partículas también mejora su maleabilidad, durabilidad y flexibilidad (Zulkarnain et al., 2017; Ding et al., 2016).

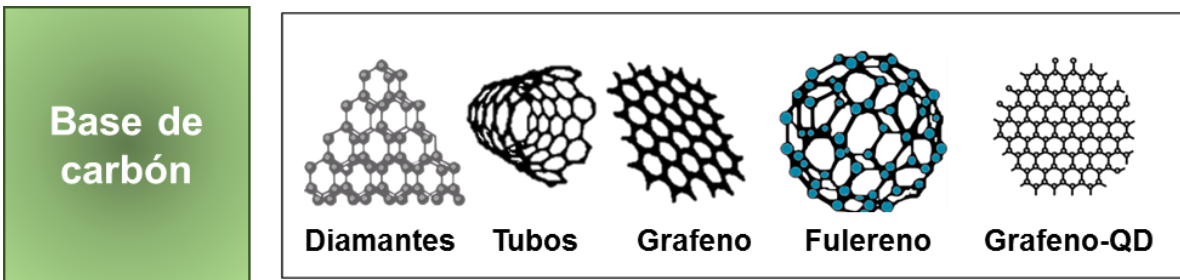
Como consecuencia, el uso de las nanopartículas en los productos mejora sus propiedades, por ejemplo las organolépticas de los productos alimenticios haciéndolos más atractivos para el consumidor, pero no solo eso, en algunos medicamentos se utilizan las nanopartículas porque pueden llegar a zonas del cuerpo que normalmente no se alcanzarían con micropartículas, como el cerebro ya que algunas nanopartículas tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. En cerámica mejora la calidad de los colores; en microscopía mejora la resolución de las imágenes; en el tratamiento de aguas residuales las nanopartículas son más fotocatalíticas que las micropartículas lo cual hace más eficiente la remoción de contaminantes y microorganismos e incluso se requiere menos material para lograr el objetivo lo cual resulta también ventajoso económicamente para las empresas.

Sin embargo, no solo el tamaño es importante cuando hablamos de nanopartículas, la forma y la composición química de estas también determinan muchas de sus propiedades, es por ello que incluso se han hecho dos grandes clasificaciones de las nanopartículas, la primera está basada en su composición química y la segunda está basada en su forma.

De acuerdo a su composición, pueden ser clasificadas con base de carbón, base de un metal o un óxido metálico, puntos cuánticos (*Quantum dots*), poliméricas (dendrimeros), base lipídica, de DNA y péptidos (Figura 3). Por su forma, las nanopartículas de base metálica u óxido metálico pueden ser clasificadas en nanotubos, nanoflores, nanocubos, nanohojas, nanoesferas, nanofibras entre otras (Figura 3), mientras que las de base de carbón se pueden clasificar en grafenos, nanodiamantes, fullerenos o nanotubos o los polímeros se pueden clasificar según el número de ramificaciones en generación 0 (G0), G1 o G2 (Figura 3).

1.2 Aplicaciones, beneficios y toxicidad de las nanopartículas en general

El uso de las nanopartículas tiene un espectro muy amplio, va desde la biología para regeneración de tejidos, implantes y teranóstica, en química para el desarrollo de nuevos medicamentos, excipientes y liberadores de fármacos que los lleven a lugares específicos, en pinturas de revestimiento, aditivos alimenticios, en informática, física e ingeniería para mejorar la calidad de las imágenes microscópicas, resonancias magnéticas, para la generación de baterías de larga duración, chips de computadoras y celulares, purificadores de agua entre otros. Dado que el espectro es muy amplio, describiré cada tipo de nanopartícula, mencionando en cada tipo algunos beneficios que estas nanopartículas han ofrecido en el área médica y también algunos de sus efectos tóxicos ya descritos.



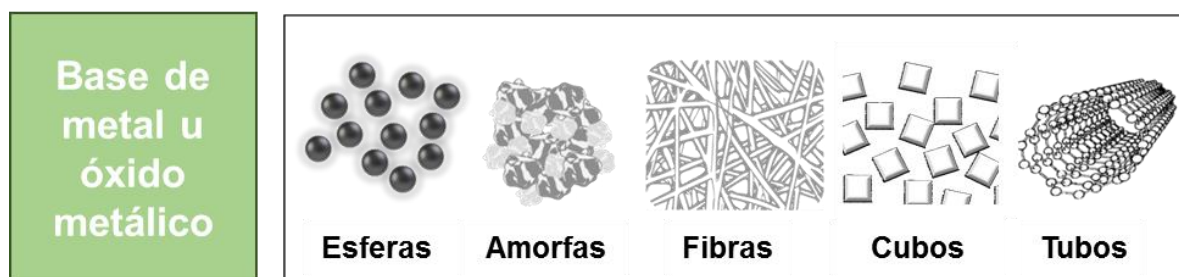
Nanopartículas de carbón

Beneficios: La imagenología de manera inherente tiene una resolución muy pobre como es el caso de la resonancia magnética y el uso de nanotubos de carbón incrementa esta resolución hasta cinco órdenes de magnitud permitiendo así localizar tumores (Liu et al., 2012). Por su forma, las fibras de carbón han servido como andamiajes para la regeneración neuronal (Singh et al., 2016). Los nanodiamantes se usan para la liberación de fármacos, en especial aquellos que no son solubles en agua y también han sido usados en imagenología debido a su bajo coeficiente de fricción, alta conductividad térmica y su fluorescencia cuando son excitados por UV (Monaco et al., 2014). También los nanotubos de carbón logran incrementar la efectividad de fármacos, como es el caso del paclitaxel que combinado con albúmina y los nanotubos de carbón son endocitados por células MCF7 lo que reduce la viabilidad 10% más que solo la albúmina mezclada con el paclitaxel (Shao et al., 2015). Estos mismos nanotubos de carbón han mostrado más eficiencia que los grafenos y que los quantum dots para unirse a la telomerasa e inhibir su actividad, esto es importante porque alrededor del 90% de los cánceres muestran sobreexpresión de la enzima telomerasa que le permite a las células dividirse de manera ilimitada. Adicionalmente, los fullerenos tienen

actividad antiviral específicamente contra el HIV y este efecto se le atribuye a la capacidad que tienen los fulerenos de inhibir la actividad de la retrotranscriptasa viral (Yasuno et al., 2015).

Toxicidad: Algunos nanotubos de carbón como los MWCNT-7 han sido clasificados en el grupo 2B por la IARC como posibles carcinógenos para los humanos desde el año 2017. Se sabe que la exposición a MWCNT induce la pérdida de las uniones estrechas célula-célula en células de fibrosarcoma (Arnoldussen et al., 2016). Estas uniones son importantes ya que participan en la comunicación celular, el crecimiento y la diferenciación celular así como durante el proceso de apoptosis, además de que la disminución de estas uniones entre célula-célula está relacionada con la patogénesis del cáncer (Aftab et al., 2015).

Tanto los nanotubos de carbón como los fulerenos incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que conlleva al estrés oxidante que eventualmente causa daño en las biomoléculas como el DNA en donde induce cambios en el intercambio de cromátidas hermanas o daño cromosómico como la formación de micronúcleos entre otros. Esto se ha observado tanto en queratinocitos como en líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y fibroblastos (Siegrist et al., 2014). Además, la expresión de p53, Rad1 y 8-oxoguanina glicosilasa aumentan después de la exposición al grafeno, lo que sugiere daño en el DNA.



Nanopartículas metálicas u óxido metálicas

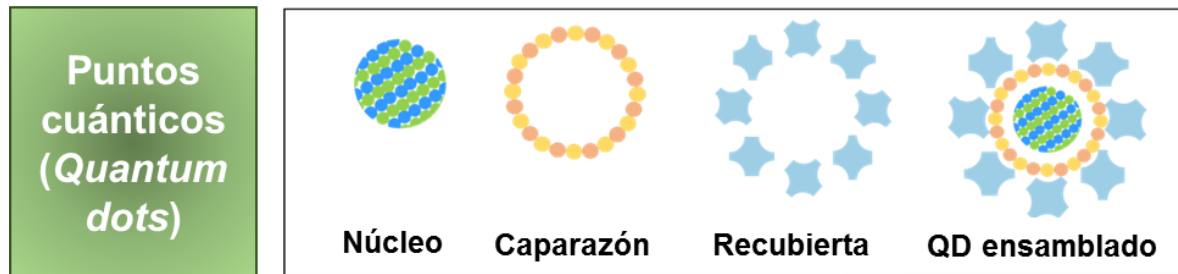
Las nanopartículas de oro y plata son las principales nanopartículas metálicas mientras que el dióxido de titanio, dióxido de zinc y óxido de aluminio son las nanopartículas más comunes de óxidos metálicos. Además, de silicio que no es propiamente un metal si no un metaloide se ha incluido en esta sección ya que las nanopartículas de dióxido de silicio también, al igual que las de dióxido de titanio dominan el mercado a nivel internacional.

Beneficios: Las nanopartículas de oro tienen afinidad por los grupos amino y los grupos tiol lo cual modifica la superficie de estas nanopartículas y ofrece un mejor rendimiento,

estabilidad y solubilidad en el análisis a través de las resonancias magnéticas y lo cual, además, disminuye su toxicidad (Zeng et al., 2014). Cuando las nanopartículas de oro son funcionalizadas con un péptido de cinco aminoácidos (cisteína-arginina-glutamina-ácido aspártico-lisina) se internalizan mejor en las células de cáncer de mama (Kapse-Mistry et al., 2014) y una vez ahí pueden liberar fármacos, péptidos y sacáridos. Por otro lado, los tumores cerebrales y otras enfermedades relacionadas con el cerebro plantean difíciles desafíos de tratamiento debido a la barrera hematoencefálica altamente selectiva, que separa la sangre circulante del líquido extracelular en el sistema nervioso central. Algunas nanopartículas como las de dióxido de zinc, dióxido de hierro y dióxido de titanio tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, razón por la cual se han implementado en algunos sistemas de liberación de fármacos en el cerebro. Por otro lado, los nanotubos de dióxido de titanio se utilizan en implantes ortopédicos para la regeneración ósea y la mineralización de los osteoblastos (Brammer et al., 2012). Las nanopartículas de dióxido de silicio se han usado ampliamente en el mercado de productos alimenticios, y recientemente se propone usarlas para la terapia en humanos ya que su porosidad es ideal para cargarlas con fármacos, péptidos, polímeros u oligosacáridos y el hecho de que sus poros se encuentren conectados hace que la liberación de lo que se le haya cargado sea más rápida y eficiente que la liberación en nanopartículas cuyos poros no están conectados. Se ha desarrollado un sistema con nanopartículas de dióxido de silicio recubiertas con varias capas de la enzima glucosa oxidasa y la enzima catalasa, este sistema permite la liberación controlada de insulina y con esto se pretende reemplazar al sistema tradicional de la inyección de insulina (Zhao et al., 2011).

Toxicidad: Tanto las nanopartículas metálicas como las de óxidos metálicos aumentan la producción de ROS e inducen daño en las mitocondrias así como en el retículo endoplásmico. Además, este tipo de nanopartículas también inducen autofagia, apoptosis y necrosis y en el caso de las nanopartículas de plata, estas logran atravesar el poro nuclear causando rupturas en las cadenas de DNA y daño cromosómico así como modificar la expresión génica relacionada con el metabolismo energético y el transporte del oxígeno (Chairuangkitti et al., 2013). Por otro lado, la administración del dióxido de titanio grado alimenticio, codificado como E171 por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés), durante 10 semanas incrementa la formación de tumores en el colon de ratones con colitis previa (Kairdolf et al., 2013). La mayoría de las nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos se acumulan en órganos como el hígado, el bazo, los

riñones, los pulmones e incluso el cerebro y los testículos, a pesar de que estos dos últimos órganos cuentan con barreras hematotisulares.



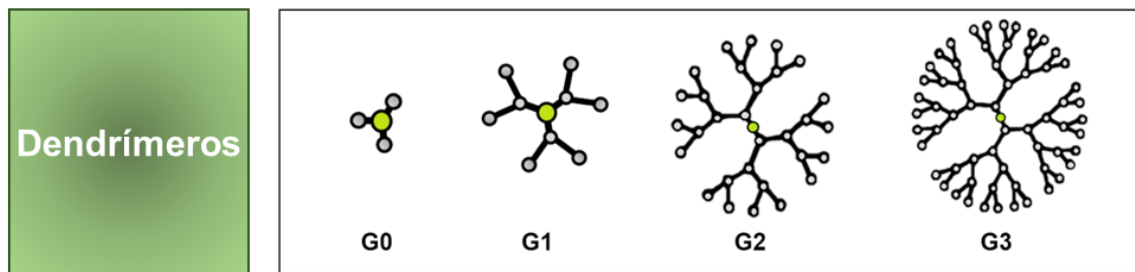
Quantum dots

Los quantum dots son cristales de tamaño nanométrico, entre 2 y 10 nm que tienen un núcleo y una capa externa a veces llamada caparazón y ambos son semiconductores. El núcleo normalmente está formado de dos elementos los cuales casi siempre son del grupo III y V de la tabla periódica.

Beneficios: Los quantum dots han proporcionado grandes avances en la teranóstica así como en la identificación de los grupos sanguíneos, el diagnóstico médico y la terapia. En terapia por ejemplo, se ha unido el anticuerpo Fab a la superficie de los quantum dots. Este anticuerpo Fab se usa para la detección de una célula en particular, por ejemplo para reconocer el epítipo de citoqueratina-10 intracelular presente en las células de cáncer de mama. El hecho de que los quantum dots estén recubiertos con un anticuerpo reduce su toxicidad y aumenta la especificidad de la terapia, la biocompatibilidad, y evita la respuesta inmune (Silva et al., 2016).

Toxicidad: Muchos estudios sobre la toxicidad de los quantum dots muestran que la toxicidad de estos se debe a la degradación de la capa externa, o caparazón lo cual conlleva a la liberación de los metales en el núcleo de los quantum dots. Por otro lado, la internalización de los quantum dots desencadena la producción de ROS, la ruptura de la membrana interna y la oxidación lipídica de las mitocondrias aisladas de hígado de rata (Lai et al., 2015) y el daño mitocondrial también se ha asociado con necrosis en las células renales embrionarias humanas (Bugno et al., 2016). La necrosis también puede ser inducida por la degradación de los quantum dots en los lisosomas, lo que desencadena la desestabilización lisosomal (Bugno et al., 2016). Algo que es sumamente importante mencionar es que los quantum dots desestabilizan muchas proteínas, por ejemplo se unen a la albúmina y afectan su estructura y función. Esto se confirmó con un estudio que

demonstró que los quantum dots de ZnO, uno de los más utilizados, inducen el despliegue de proteínas, incluido el péptido de insulina. Es importante destacar que estas modificaciones no son generalmente analizadas en estudios toxicológicos.

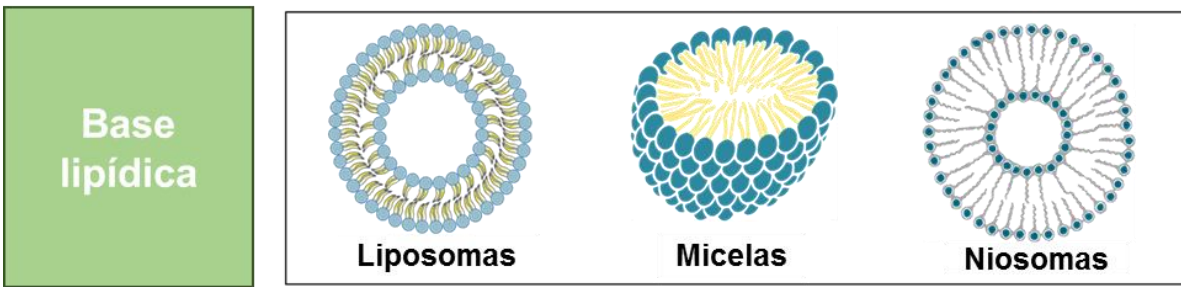


Dendrimeros

Los dendrímeros son polímeros con cadenas laterales únicas y repetitivas que forman una estructura similar a la de un árbol sin cruzar sus ramas. Están formados de un núcleo, ramas y grupos funcionales al final de las ramas. Las cavidades que se forman entre las ramas de estos dendrímeros se usan para cargar moléculas o fármacos hidrófobos.

Beneficios: Gracias a su arquitectura, los dendrímeros permiten la unión covalente con algunos agentes terapéuticos, lo cual los hace ideales como acarreadores de fármacos. Los dendrímeros hechos de poliamidoamina (PANAM) se difunden por la matriz extracelular y de manera dependiente al tamaño de los dendrímeros, estos penetran las masas tridimensionales de los tumores llegando hasta el centro de estos, lo cual es una estrategia útil para tratar el cáncer (Yang et al., 2015). La enfermedad causada por los priones podría también ser tratada con dendrímeros PANAM ya que se ha visto que estos logran llevar a los priones a la degradación lisosomal dentro de las células infectadas (Cohen et al., 2011). Actualmente, hay un gel en el mercado (gel SPL7013) que contiene dendrímeros con actividad antiviral contra el HIV humano y el virus del herpes simple (Ledall et al., 2015).

Toxicidad: Algunos dendrímeros con carga positiva en la superficie rompen las membranas celulares y se ha visto que algunos dendrímeros liberan fácilmente los fármacos que acarrea, incluso antes de llegar al órgano blanco. La viabilidad de células mononucleares de sangre periférica es disminuida por la exposición a dendrímeros con grupos terminales carboxilados (Moscicki et al., 2012). A pesar de la efectividad del gel SPL7013 contra el virus del HIV y el virus del herpes, también incrementa la inflamación y el daño epitelial, lo cual también podría aumentar el riesgo de otras infecciones de la piel.



Nanopartículas lipídicas

Las nanopartículas de base lipídica son vesículas formadas por una o varias capas de lípidos y se clasifican según el arreglo de los lípidos así como la cantidad de capas lipídicas que contengan.

Beneficios: Las nanopartículas lipídicas se usan para encapsular en el centro moléculas hidrofílicas y así protegerlas de la degradación y reducir los efectos secundarios. Se ha demostrado que los fármacos libres inducen mayor toxicidad que cuando estos están encapsulados en las vesículas lipídicas (Benesch y Urban, 2008). El hecho de que las vesículas lipídicas tengan gran similitud con las membranas celulares hace que los efectos tóxicos disminuyan y que sean más fáciles de incorporar a las células, para así liberar el fármaco. Los ejemplos más recientes de fármacos antineoplásicos encapsulados en liposomas (uno de los varios tipos de vesículas lipídicas) son Marqibo®, una formulación que contiene sulfato de vincristina, y DepoCyte®, una formulación para la liberación controlada de agentes quimioterapéuticos dirigidos a tumores líquidos, incluida la leucemia (Al-Ahmady et al., 2015).

Por otro lado, se han logrado silenciar varios genes en células de adenocarcinoma de pulmón humano gracias a la liberación de siRNAs que son acarreados por vesículas lipídicas (Deshpande et al., 2013). Los etosomas que están hechos de una bicapa de fosfolípidos, agua y etanol penetran con facilidad la piel, permitiendo la liberación de fármacos en capas más profundas alcanzando incluso la circulación sistémica. Un ejemplo es el tratamiento tópico basado en etosomas cargados con paclitaxel que penetra en la piel y se usa para el tratamiento del carcinoma de células escamosas (Mishra et al., 2013). Es de suma importancia mencionar que la mayoría de las nanomedicinas aprobadas por la FDA son de base lipídica, específicamente liposomas (Tabla 2).

Toxicidad: La mayoría de los artículos científicos que muestran toxicidad de las nanopartículas de base lipídica se realizaron entre 1980 y 1995, y los estudios recientes

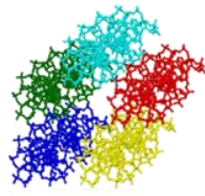
muestran que este tipo de nanopartículas tienen baja toxicidad (Moreno et al., 2015; Knudsen et al., 2015). En ocasiones los liposomas inducen hipersensibilidad, y sus principales problemas tienen que ver con su baja estabilidad y baja reproducibilidad de síntesis, dificultad para esterilizarlos y la baja concentración que pueden acarrearse de un fármaco (Akbarzadeh et al., 2013). Se ha visto que también en algunos casos los liposomas y las micelas pueden inducir daño a DNA y la expresión de citocinas inflamatorias. En general, hay poca evidencia sobre la toxicidad de este tipo de nanopartículas.

Tabla 2. Nanomedicinas aprobadas por la FDA con base lipídica

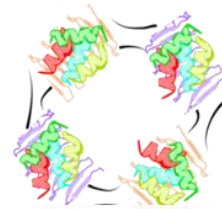
Nanopartícula		Nanomedicina	Vía de administración	Aplicación	Aprobación
Base lipídica	Liposoma	Abelcet® (Anfotericina B)	Intravenosa y nebulización	Infecciones fúngicas invasivas en pacientes que tienen dificultades con la terapia convencional con anfotericina B	FDA ✓
	Liposoma (80-90 nm)	Caelyx® Doxil® (Pegilado de doxorubicina)	Intravenosa	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, melanoma, cáncer de ovario y de mama	FDA ✓
	Liposoma (45 nm)	DaunoXome® (daunorubicina)	Intravenosa	HIV relacionado con el sarcoma de Kaposi	FDA ✓
	Liposoma	Marqibo® (sulfato de vincristina)	Intravenosa	Leucemia linfóide aguda con cromosoma Filadelfia negativo, recidivante o progresiva	FDA ✓
	Liposoma	Amphotec® (Anfotericina B)	Subcutánea	Aspergilosis invasiva	FDA ✓
	Liposoma	AmBisome® (Anfotericina B)	Intravenosa	Infecciones fúngicas sistémicas como la meningitis criptocócica en pacientes con SIDA	FDA ✓
	Liposoma	DepoCyt® (Citarabina)	Intralumbar o intraventricular	Meningitis maligna linfomatosa	FDA ✓ Comisión Europea ✓
	Liposoma	DepoDur® (sulfato de morfina)	Epidural	Analgésico para el tratamiento del dolor tras cirugía mayor	FDA ✓
	Liposoma (22 nm)	Diprivan® (propofol)	Intravenosa	Anestesia	FDA ✓
	Liposoma	Mepact® (mifamurtide)	Intravenosa	Osteosarcoma no metastásico en niños, adolescentes y adultos jóvenes (entre 2 y 30 años). Se utiliza después de la cirugía junto con quimioterapia	Europa ✓ FDA X
	Liposoma (180 nm)	Myocet® (doxorubicina)	Intravenosa	Tratamiento de primera línea del cáncer de mama metastásico	Comisión Europea ✓ Canadá ✓
	Liposoma	Visudyne® (verteporfina)	Intravenosa	Terapia fotodinámica para la degeneración muscular relacionada con la edad, miopía patológica y síndrome de histoplasmosis ocular	FDA ✓ Comisión Europea ✓
	Liposoma	ThermoDox® (doxorubicina)	Intravenosa	Carcinoma hepatocelular	FDA ✓
	Micela	Estrasorb (Estrogeno)	Transdermal	Reducción de los síntomas vasomotores, como los sofocos y la sudoración nocturna en la menopausia.	FDA ✓

Tabla tomada y modificada de Medina-Reyes EI et al., 2015.

Base de
DNA y
péptidos



Origami de DNA



Colas súper enrolladas de péptidos

Nanopartículas de DNA o péptidos

Las nanopartículas hechas de DNA y péptidos son unas de las más innovadoras, pues requieren de un alto nivel de diseño y se busca tengan alto impacto en la nanomedicina.

Beneficios: Se han hecho nanotubos de DNA con hasta 62 secuencias de CpG no metiladas, las cuales son específicas de bacterias. Esto estimula el sistema inmunológico a través del receptor Toll like 9 (TLR9) y se han propuesto como adyuvantes en la vacunación o para superar la inmunosupresión asociada a tumores (Mastorakos et al., 2015). Esto ha sido exitoso en estudios *in vivo* ya que han logrado incrementar la liberación de IL-6 y sobre expresar CD69 en células del sistema inmune que es un marcador temprano de activación (Mastorakos et al., 2015). Además, para la teranóstica se ha sintetizado un tetraedro de DNA que es capaz de detectar RNA del virus HIV de una manera ultrasensible, detectando incluso 1 fM de RNA. La forma en que lo detecta es hibridando por lo que además no le permite replicarse, hecho que le da relevancia en el tratamiento contra el HIV (Demidov et al., 1994).

Toxicidad: No se han descrito efectos tóxicos de este tipo de nanopartículas aún, sin embargo aún hay otros objetivos que resolver primero, por ejemplo lograr su estabilidad ya que la principal desventaja de este tipo de nanopartículas es que son diseñadas para tener estabilidad en un medio, por ejemplo medio de cultivo para realizar estudios *in vitro*, pero una vez que se hacen ensayos en animales no son estables en el torrente sanguíneo, en el tracto gastrointestinal o en solución salina.

1.3 Nanopartículas más producidas a nivel mundial y ganancias anuales: Dióxido de titanio

Alrededor del mundo hay aproximadamente 216 compañías registradas que se encargan de producir algún tipo de nanomaterial. Estas empresas están distribuidas de la siguiente manera: Asia tiene 79 compañías de las cuales China cuenta con el 34.1%; Norte y Sudamérica tienen 77 compañías de las cuales el 89.6% están en EE.UU.; Europa tiene 52 compañías con 26.9% en Alemania; Oceanía tiene 6 compañías con el 83.3% en Australia y finalmente África tiene 2 compañías en Sudáfrica (Garduño-Balderas et al., 2015). Sin embargo, existen muchas más compañías que no están registradas en las bases de datos y que incluso no declaran la producción de nanomateriales.

En México no hay registro oficial de ninguna empresa que produzca nanopartículas, sin embargo hay más de 32 empresas que las distribuyen o que distribuyen productos que contienen nanopartículas, por ejemplo *Comercializadora Reyman, Química Morales, Deiman, Materiales NanoEstructurados*, entre otras.

Las nanopartículas más producidas a nivel mundial por estas empresas son el **dióxido de titanio** (TiO_2) en primer lugar, óxido de zinc (ZnO), óxido de hierro (Fe_3O_2), dióxido de silicio (SiO_2), óxido de aluminio (AlO_2), óxido de cerio (CeO_2), nanotubos de carbón de pared simple (SWCNT) y múltiple (MWCNT), así como nanopartículas de plata y oro (Garduño-Balderas et al., 2015). En cuanto a la producción de nanopartículas clasificadas por su forma, las más producidas son las nanoesferas, seguidas de los nanotubos, el grafeno y las nanofibras (Figura 4).

.

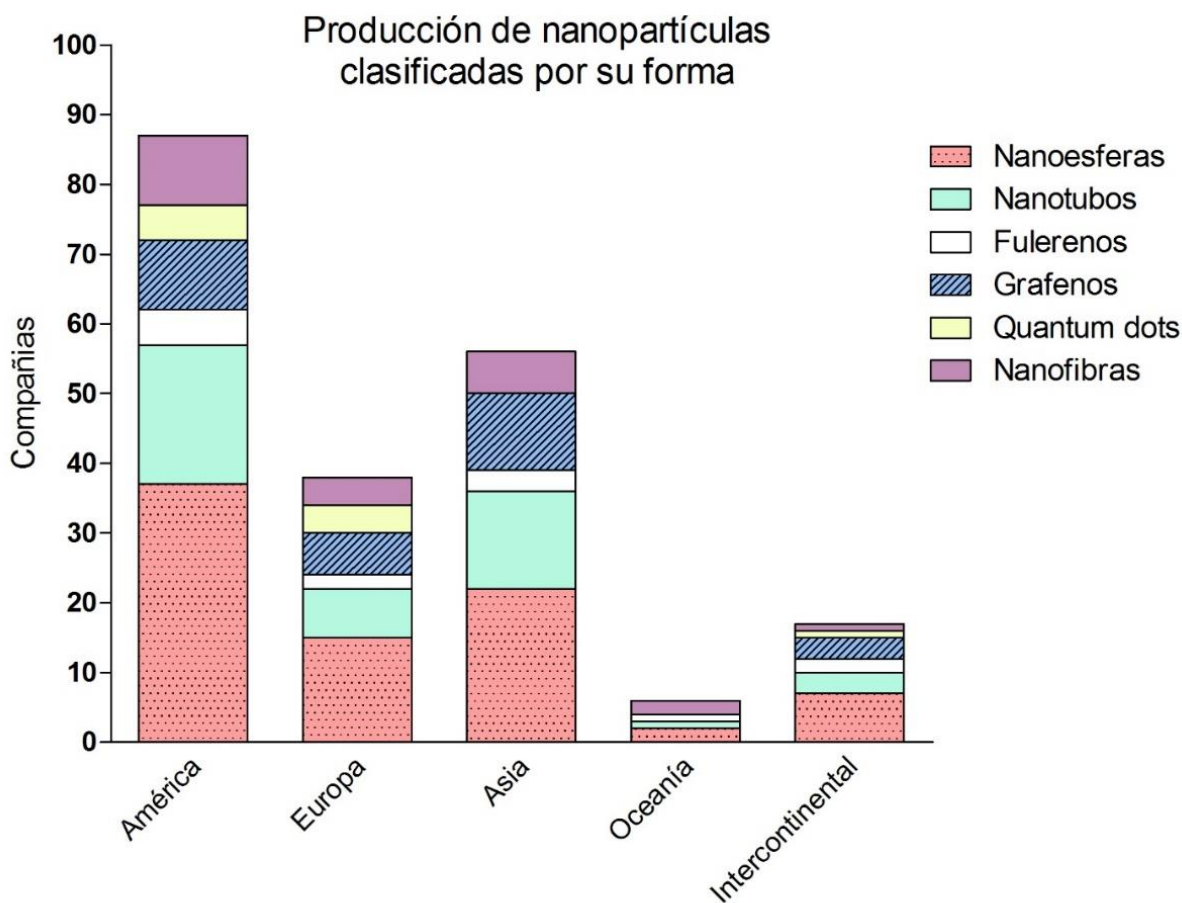


Figura 4. Número de compañías productoras o distribuidoras de las diferentes formas de nanopartículas por continente. Gráfica tomada y modificada de Garduño-Balderas et al., 2015.

Pese a conocer un número considerable de compañías productoras de nanopartículas, estimar la producción de las mismas ha resultado sumamente complicado y esto es debido a la falta de información disponible por parte de las empresas sobre la cantidad que sintetizan anualmente. El método para estimar las toneladas anuales de producción de nanopartículas ha sido basado en encuestas, información colectada por publicaciones científicas, sitios web, número de patentes, y en algunos casos aislados debido a la información otorgada por líderes de las empresas (Templeton et al., 2006; Thompson 2007; Schmid y Riediker 2008; Hendren et al., 2011; Piccinno et al., 2012).

Por otro lado, hay reportes confiables como los realizados por las empresa llamadas *BCCResearch*, *Grand View Research*, en donde se muestra la producción anual, los productos donde se usan y las ganancias monetarias por año entre otras estadísticas sin embargo, estos reportes tienen un costo de aproximadamente \$4,000 USD.

Dado que el TiO_2 es el más producido anualmente y es el nanomaterial en el que esta tesis se enfoca, hablaremos más a detalle sobre su producción y las ganancias económicas que genera.

Anualmente se producen 5.7 millones de toneladas de TiO_2 en todo el mundo, de las cuales China produce 2.7 millones de toneladas, Estados Unidos de América 1.3 y Europa 1.3 millones de toneladas, de las cuales Alemania produce cerca del 30% de acuerdo con datos del 2016 (<http://www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/titanium-dioxide.html>). De esa producción, el 53% es usado en pinturas y revestimientos de exteriores, el 22% es usado para la producción de plástico, el 12% es usado en papel, el 8% es usado en cosméticos y el 5% es usado en alimentos (Figura 5) (*Grand View Research report, 2015*).

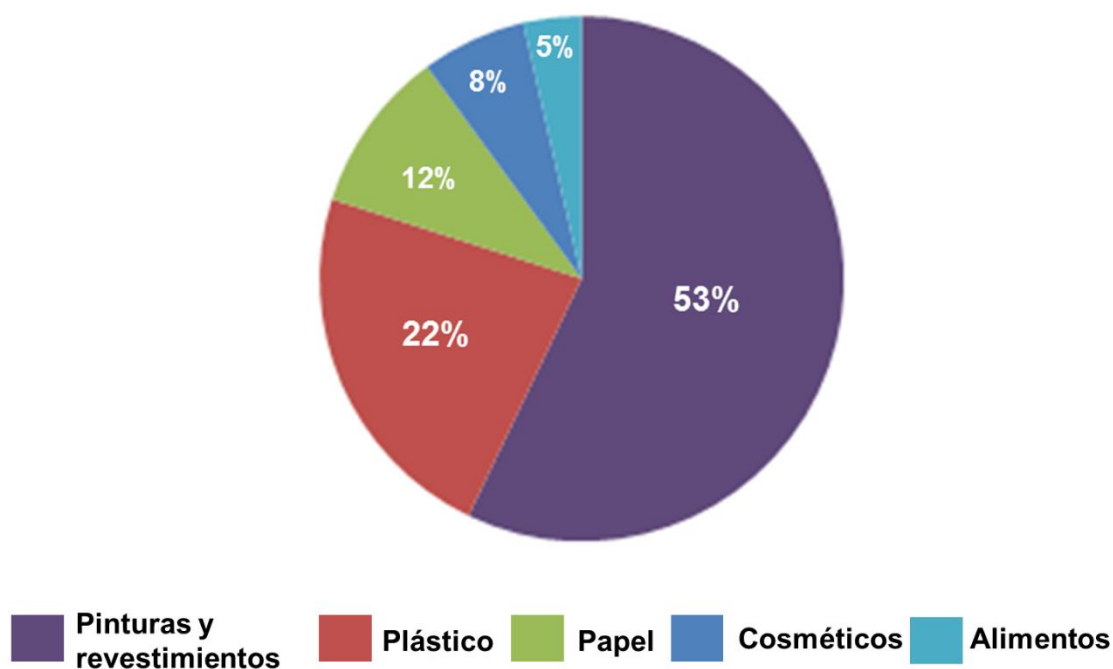


Figura 5. Porcentaje de TiO_2 utilizado en cada una de sus aplicaciones.

La gran variedad de usos de este nanomaterial es principalmente por su intenso color blanco y la opacidad que le puede ofrecer a los productos, es muy estable, tiene un alto índice de refracción, capacidad fotocatalítica, es semiconductor, y es resistente a la radiación UV. Europa es el continente que cuenta con la mejor información sobre las ganancias anuales que el TiO_2 genera, el número de trabajadores, el número de empresas entre otros datos. De las 52 empresas registradas en Europa que producen algún nanomaterial, 18 producen

entre 1.1 y 1.3 millones de toneladas de TiO_2 . En estas 18 empresas hay 8,150 trabajadores y las ganancias que esa producción genera es aproximadamente de 3 mil millones de euros. Este es tan solo el mercado directo del TiO_2 , sin embargo ahí no terminan las ganancias. El mercado de pinturas y revestimientos con productos que contienen TiO_2 se estimó en 27.2 mil millones de euros en el 2017, esto es importante ya que Europa es el segundo productor más importante de pinturas en el mundo con 23% del mercado y se estima que hay aproximadamente 1 millón de trabajadores que se dedican a aplicar pinturas con pulverizadores. En cuanto a la industria del plástico con TiO_2 , Europa cuenta con 60,000 compañías, 1.5 millones de trabajadores en este sector y las ganancias anuales son de 350 mil millones de euros. Referente a la producción de papel, Europa tiene 21,000 empresas con 647,000 trabajadores y ganancias anuales de 180 mil millones de euros. Además, Europa tiene por lo menos 22,000 productos cosméticos en el mercado que contienen TiO_2 , lo que genera retribuciones económicas de 77 mil millones anuales con tan solo 4,600 compañías productoras de los mismos. A pesar de que se estima que solo el 5% del TiO_2 que se produce en el mundo es destinado para la industria alimentaria, este sector cuenta con 289,000 compañías en Europa, con 4.25 millones de trabajadores y genera 1,089 mil millones de euros al año (Titanium Dioxide Manufacturers Association: <https://tdma.info/resource/page/3/>). La historia no debe ser muy diferente en Estados Unidos de América o México, la diferencia es que no existen este tipo de reportes en estos países.

En México, quien debería emitir algún tipo de regulación es la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) sin embargo no cuenta con ningún tipo de información acerca de su toxicidad. De hecho, si se realiza la búsqueda de “dióxido de titanio” en su página web oficial, todos los resultados están asociados a dos tipos de artículos: 1) los acuerdos anuales publicados en el Diario Oficial de la Federación donde se muestran las exportaciones de México a Brasil de TiO_2 en donde, por ejemplo en el 2004, 2005 y 2006 se exportaron 35,000 toneladas al año de las cuales especifica que 20,000, son de un tamaño superior o igual a $6 \mu\text{m}$, mientras que las otras 15,000 toneladas son de pigmentos y preparaciones con un contenido de TiO_2 superior o igual al 80% en peso, calculado sobre materia seca. El código que usa la COFEPRIS para el TiO_2 es 3206.11 mientras que para los pigmentos que contienen TiO_2 es 3206.11.01. Además, se menciona que la exportación de este material tiene una preferencia arancelaria del 50% de descuento que se estableció en el ACUERDO DE COMPLEMENTACIÓN ECONÓMICA NO. 53. (<https://www.gob.mx/busqueda?utf8=%E2%9C%93&site=cofepris&q=di%C3%B3xido+de+titanio>).

Lo segundo que aparece en este sitio web después de la búsqueda “dióxido de titanio” son las notas periodísticas en donde se pondera el uso del TiO_2 por ejemplo en el edificio del Hospital General “Manuel Gea González” de la Secretaría de Salud que se instaló en el año 2012. La fachada de este edificio de 2,500 m² está recubierta con TiO_2 que gracias a su actividad fotocatalítica ayuda a eliminar la polución de hasta mil vehículos diariamente (<https://www.gob.mx/salud/prensa/primer-edificio-inteligente-de-la-secretaria-de-salud-que-neutraliza-contaminantes>).

En mi opinión, el uso del TiO_2 en este tipo de tecnologías en donde se lleva a cabo la eliminación de la contaminación ambiental nos favorece y debe ser incentivada, sin embargo, el problema es que la COFEPRIS no emita medidas de regulación del uso del TiO_2 en ambientes ocupacionales, incluso cuando se encarga de su exportación.

Capítulo 2

Toxicidad inducida por el dióxido de titanio

2.1 La toxicidad depende de la forma, el tamaño, la proteína corona y el órgano con el que entre en contacto

La toxicidad de todas las nanopartículas depende de muchos factores como la composición química, la fase cristalina, el tamaño de las nanopartículas, la forma (nanoesferas, nanofibras, dendriméricas, nanotubos etc), el potencial Z que es el potencial eléctrico de las nanopartículas en suspensión y de la proteína corona que es un revestimiento que se forma alrededor de las nanopartículas cuando estas entran en contacto con algún medio acuoso. En cuanto al tamaño, se ha visto que las nanopartículas de menor tamaño inducen mayor toxicidad que las nanopartículas más grandes. Esto puede ser explicado debido a que conforme el tamaño de las nanopartículas disminuye incrementa el área superficial y así el área de contacto, por lo que aumenta su toxicidad (Xiong et al., 2013). Por ejemplo, nanopartículas de TiO_2 de 5 nm de diámetro disminuyen 30% más la viabilidad de células epiteliales de pulmón que las nanopartículas de TiO_2 de 200 nm (Wei et al., 2014). No obstante, el tamaño no solo cambia el área superficial, también incrementa la conductividad, la maleabilidad y la durabilidad en las partículas más pequeñas. Por eso es que con el paso del tiempo se ha preferido el uso de nanopartículas en vez de las partículas micrométricas.

Por otro lado, la forma también modifica la toxicidad, se ha visto que las formas fibrosas pueden inducir mayor toxicidad que las formas esféricas (Hamilton et al., 2009; Ma et al., 2017). Por ejemplo, en el lavado bronquioalveolar de ratones instilados con 30 μg de TiO_2 en forma de esfera o en forma de fibras se observó que con nanoesferas no incrementó la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como marcador de muerte celular ni de albúmina, como marcador de pérdida de la integridad de la membrana alveolo-capilar mientras que en el lavado bronquioalveolar de ratones expuestos a nanofibras presentaron en promedio 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albúmina y 150 unidades/L de LDH, que representan el doble y el triple que en los ratones controles, respectivamente (Porter et al., 2013).

Aunque en principio el incremento de la toxicidad también se debe al incremento del área superficial por la forma fibrosa, hay otros factores como el hecho de que para las células es más fácil endocitar una nanopartícula esférica en vesículas que una fibra.

La proteína corona, es como se le ha llamado al conjunto de proteínas y otras moléculas (como lípidos, hormonas, carbohidratos) que se asocian a la superficie de una nanopartícula. La proteína corona que se forma va a depender de la composición química y la carga de las

nanopartículas, de su tamaño y de la composición del fluido con el que estén en contacto. Por ejemplo, nanopartículas de sulfato de Bario (BaSO_4) que se incubaron con fluido pulmonar captaron alrededor de 50% más cantidad de proteína en la superficie que partículas de Cerio (CeO_2) incubadas bajo las mismas condiciones. Además, identificaron a las 9 proteínas más variables en la superficie de estas dos nanopartículas, entre las cuales la albúmina, transferrina y antitripsina α -1 fueron las más abundantes en la corona de las nanopartículas de BaSO_4 . Por último en este estudio, las nanopartículas BaSO_4 fueron menos en las células que las de CeO_2 , lo cual indujo menos toxicidad (Konduru et al., 2017).

Debido a que la toxicidad depende de múltiples factores es importante realizar una caracterización de las nanopartículas en cada estudio, en donde se describa su composición, la fase cristalina, el tamaño de las partículas y el tamaño de las partículas en suspensión, el potencial Z y el área superficial.

Otro factor que influye en la toxicidad es el tejido, por eso también es importante evaluar la toxicidad en las tres diferentes vías de exposición, la dérmica, la oral y la inhalatoria, ya que las nanopartículas no tendrán el mismo comportamiento por ejemplo en un bloqueador solar al entrar en contacto con la piel que en un producto alimenticio que entra en contacto con los fluidos gástricos.

2.2 Vías de exposición: Dérmica y oral

La mayor cantidad de evidencia que se tiene de la toxicidad del dióxido de titanio es en su forma de esferas y dados los hallazgos se han abierto interrogantes con otras formas, como las nanofibras ya que además están siendo cada vez más usadas e incluso se ha propuesto reemplazar las nanoesferas por las nanofibras de TiO_2 en el uso de paneles solares y el tratamiento de aguas residuales.

Vía dérmica

El TiO_2 se usa en una amplia cantidad de productos cosméticos, como bloqueadores solares, maquillajes, cremas faciales, lociones corporales entre otros lo cual, como se menciona arriba, genera grandes ganancias anuales. Cabe mencionar que aproximadamente 33 millones de personas en el continente americano, usan algún tipo de bloqueador solar todos los días y 177 millones lo usan ocasionalmente (Weir *et al.*, 2012). La investigación sobre la toxicidad del TiO_2 en la piel ha estado enfocada en describir si las nanopartículas tienen la capacidad de atravesar la piel o no. Normalmente, los cosméticos se aplican sobre piel sana, sin embargo ciertas condiciones como las quemaduras solares pueden inducir lesiones leves en la piel. Los estudios sobre la toxicidad del TiO_2 se han realizado tanto en modelos de piel intacta como de piel lesionada. Dado que la capa más externa de la piel llamada estrato córneo es muy dura y difícil de atravesar, la mayoría han concluido en que el TiO_2 no logra atravesar la piel, por ejemplo un bloqueador solar que contenía 5% de TiO_2 del peso del producto se le aplicó 2 mg/cm^2 por vía tópica a mini cerdos 4 veces al día por 5 días durante 4 semanas, y se observó que las nanopartículas no lograban atravesar el estrato córneo (Sadrieh *et al.*, 2010). Sin embargo hay algunas pocas investigaciones que aseguran que sí lo logran pero es importante mencionar que en esos casos, las emulsiones eran lipídicas, lo cual favorece mucho la penetración a través de la piel (Miquel-Jeanjean *et al.*, 2012, Senzui *et al.*, 2010). Hasta ahora se sabe que la toxicidad inducida por las nanopartículas de TiO_2 en la piel es bastante sutil y que de hecho estos efectos son menores a los que causa la radiación UV por sí sola, sugiriendo que es preferible usar los protectores solares a estar expuestos directamente a la radiación solar. Por ejemplo, en un estudio realizado con nanopartículas de TiO_2 se observó que los queratinocitos incrementan la producción de ROS, caspasa 8 y 9 así como también hubo incremento de la apoptosis en estas células (Wright *et al.*, 2017). Esto es bueno hasta cierto punto, ya que es preferible que una célula con algún tipo de daño se vaya a apoptosis a que continúe replicándose con esos daños. Si bien hay datos que sugieren que la exposición a la radiación UV puede

incrementar los efectos tóxicos del TiO₂, en este estudio no se observó ningún incremento en la toxicidad del TiO₂ cuando este se expuso a la radiación UV-C (Wright et al., 2017). Estos queratinocitos expuestos al TiO₂ tampoco mostraron efectos sobre la regulación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ni la vía de señalización de Wnt, por lo que se sugiere que no hay un efecto potencial sobre la angiogénesis ni sobre la transformación celular. Sin embargo, en fibroblastos que también son muy importantes para la piel no muestran pérdida en la viabilidad, pero tampoco ningún tipo de toxicidad lo cual podría deberse a que este tipo celular es más resistente al estrés oxidativo ya que mantiene mejor su coeficiente de GSH/GSSG comparado con otras líneas celulares como las HUVEC o las A549, y este efecto se observa incluso después de la exposición a TiO₂ (Kuku et al., 2017).

Vía oral

Debido a la evidencia de la toxicidad del TiO₂ por vía inhalatoria, de la cual hablaré más adelante se abrió la puerta para investigar otras vías. La vía de administración dérmica, no ha mostrado graves efectos tóxicos, sin embargo la vía de administración oral ha mostrado todo lo contrario. La investigación sobre esta vía ha tomado fuerza en los últimos 5 años debido al incremento en la evidencia toxicológica.

El TiO₂ ha sido aceptado por la FDA para ser usado en productos de consumo alimenticio desde 1969 y se clasificó desde entonces como “*Generally recognized as safe*”, es decir como seguro. En un principio el TiO₂ de grado alimenticio consistía de micropartículas, sin embargo actualmente el promedio del tamaño de las partículas que lo componen es de 110 nm con al menos 36% de nanopartículas y 64% de partículas entre 100-400 nm (Weir et al, 2012; Yang et al. 2014). La *European Food Safety Authority* (EFSA) en la Unión Europea se refiere al TiO₂ de grado alimenticio como E171 y así es como se etiqueta en algunos productos en Europa. El espectro de productos que contienen E171 es muy amplio, va desde los lácteos como leche y yogurt, dulces confitados como chicles y chocolates, pastas dentales, sustitutos de crema para el café. Estos productos pueden contener desde 1 hasta 5 mg Ti/ kg de producto (Weir et al, 2012) y en México el E171 es utilizado para la elaboración de harinas, tortillas, tostadas, helados, quesos frescos y procesados, dulces a base de leche y todo tipo de cremas (NOM-243-SSA1-2010). En lugares como Estados Unidos de América, Países Bajos y Reino Unido se ha estimado que la ingesta diaria de TiO₂ es de 1.8-10.4 mg/Kg de peso corporal en niños (3-9 años) y de 0.6-6.8 mg/kg de peso corporal en adultos (18-64 años; EFSA, 2016, Rompelberg et al, 2016). En México el consumo podría incluso

ser mayor debido a la dieta alta en harinas y sobretodo tortillas sin embargo ningún estudio se ha realizado al respecto.

En Estados Unidos de América la FDA permite que los alimentos contengan hasta el 1% de TiO_2 del peso del producto, mientras que la Unión Europea y México permiten las buenas prácticas de manufactura, es decir, la cantidad (la que sea) mínima necesaria para alcanzar las propiedades deseadas en el producto (NOM-243-SSA1-2010).

La mayoría de los estudios de toxicidad por vía oral han sido realizados con TiO_2 y no con E171 lo cual sesga la evidencia de la toxicidad por esta vía. Sin embargo, los aproximadamente 12 estudios que hay con E171 son muy consistentes. En un estudio *in vivo* realizado con ratones que padecían o no colitis y que se administraron con 5 mg/kg de E171 por vía intragástrica 5 días a la semana por 10 semanas incrementó el número de tumores en el colon de ratones con colitis, mientras que los ratones sin colitis y administrados con E171 no desarrollaron tumores pero presentaron daño histológico como hiperplasia, criptas aberrantes y lesiones pre-carcinogénicas (Urrutia-Ortega et al., 2016). En otro estudio *in vitro* realizado con E171 se mostró que este tiene la capacidad de incrementar la producción de ROS y de generar aberraciones cromosómicas al incrementar la frecuencia de micronúcleos en células cancerosas de colon de la línea HCT-116 (Proquin et al., 2017). También se analizó mediante un estudio del transcriptoma los genes que estaban activados en el colon de ratones expuestos a E171 5 mg/kg de peso corporal por vía intragástrica durante 2, 7, 14, y 21 días. Se observó que genes relacionados con el sistema inmune innato y adaptativo presentaban una expresión disminuida, lo que sugiere un deterioro de este sistema. Además, con el tiempo, se incrementó la expresión de genes involucrados en la señalización del cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer así como genes asociados con el estrés y la producción de antioxidantes (Proquin et al., 2018).

Después de ser ingerido el E171 una parte es acumulada en el colon y en las placas de Peyer, y otra fracción importante llega a torrente sanguíneo para así traslocarse y se depositarse en otros órganos como el hígado y el bazo. En el 2014, un grupo de investigadores en Países Bajos tomaron biopsias de niños de entre 3 y 18 años con enfermedad inflamatoria del intestino. En esas biopsias se hallaron cúmulos de pigmentos en las placas de Peyer compuestos principalmente de titanio y aluminosilicatos. Esos cúmulos eran proporcionales a la edad de los niños, lo cual indica que hay acumulación a través de los años (Hummel et al, 2014). En otro estudio, realizado con voluntarios en Reino Unido a los que se les administró 100 mg de TiO_2 y luego se les tomó muestra de sangre a

diferentes tiempos (desde 0.5 h hasta 10 h) se encontró que a las 2 h después de la ingesta ya había presencia de Ti en la sangre y que el pico máximo de absorción se da a las 6 h después de la ingesta. Este estudio sugiere que la absorción se da en la parte proximal del intestino delgado, es decir en el duodeno y el yeyuno y después en las placas de Peyer, en el intestino delgado distal, es decir el íleon (Pele et al, 2015). Para terminar con la evidencia de la vía oral, en otra investigación hecha con ratones a los cuales les administraron nanopartículas de TiO_2 por vía intragástrica, se halló que había regiones con una alta acumulación de TiO_2 en las vellosidades del íleon y en los nódulos linfáticos, además de que el TiO_2 aumentó la permeabilidad paracelular en el intestino disminuyendo además la expresión de genes relacionados con las uniones celulares. En este estudio se sugiere que la traslocación de las nanopartículas puede llevarse a cabo por la vía paracelular del íleon (Brun et al, 2014).

La investigación en la vía oral actualmente está en incremento y organizaciones como la EFSA ha solicitado a la comunidad científica más y mejores estudios, de hecho ha emitido guías en las que sugiere cómo realizar los estudios para que sean cercanos a la realidad y considerados para la regulación del uso del E171 en los productos.

2.2.1 Vías de exposición: Inhalatoria

Este tipo de exposición ocurre principalmente en ambientes ocupacionales, es decir, en las fábricas donde se está sintetizando, empaquetando y/o transportando el TiO_2 así como en las empresas que hacen uso de este nanomaterial para la generación de productos. El TiO_2 se sintetiza desde los años 30 en tamaño micrométrico, posteriormente, para los años 60 el TiO_2 comenzó a sintetizarse en tamaño nanométrico y las toneladas anuales que se producían comenzaron a incrementar. Para ese entonces el TiO_2 se consideraba inerte, y a pesar de que las primeras evidencias de toxicidad iniciaron por el año de 1985, todavía para el año 2000 había quien decía que era inerte. Desde 1985, la vía inhalatoria ha sido la más investigada y de la que más efectos tóxicos descritos se tienen, y a pesar de esto no se ha logrado llegar a una conclusión sobre su toxicidad en humanos ni se ha logrado regular su producción.

La exposición inhalatoria al TiO_2 ha sido clasificada en el grupo 2B como un posible carcinógeno para humanos por la IARC en el año 2010. Esta clasificación se realizó con base en estudios epidemiológicos, *in vivo* e *in vitro*.

Se estima que hay 8,150 trabajadores en plantas fabricando TiO_2 en Europa, mientras que en la síntesis del plástico donde se utiliza el TiO_2 hay 1.5 millones de trabajadores, 647,000 trabajadores en la síntesis de papel y 4.25 millones de trabajadores en la industria alimentaria. Estados Unidos de América emitió a través del *National Institute for Occupational Safe and Health* un boletín en el año 2011 donde se estimaba que tenían aproximadamente 4,300 trabajadores en fábricas productoras de TiO_2 , 68,000 trabajadores expuestos al TiO_2 por la manufactura de pinturas y revestimientos; 803,000 por la manufactura de plásticos, caucho y 138,000 que habían estado expuestos al TiO_2 en fábricas de molienda de papel y cartón (NIOSH, 2011).

Una vez que el TiO_2 es inhalado se deposita en diferentes regiones del tracto respiratorio, dependiendo del tamaño de las partículas. El tracto respiratorio se divide en dos, el tracto superior que consta de la nariz, cavidad nasal, senos paranasales y faringe; y el tracto respiratorio inferior que consta de la laringe, tráquea, bronquios y pulmones. En el tracto respiratorio superior es decir en la región nasofaríngea se queda el 90% de las partículas de 1 μm de diámetro mientras que en la región alveolar se deposita aproximadamente el 50% de las nanopartículas de entre 1-20 nm (Figura 6).

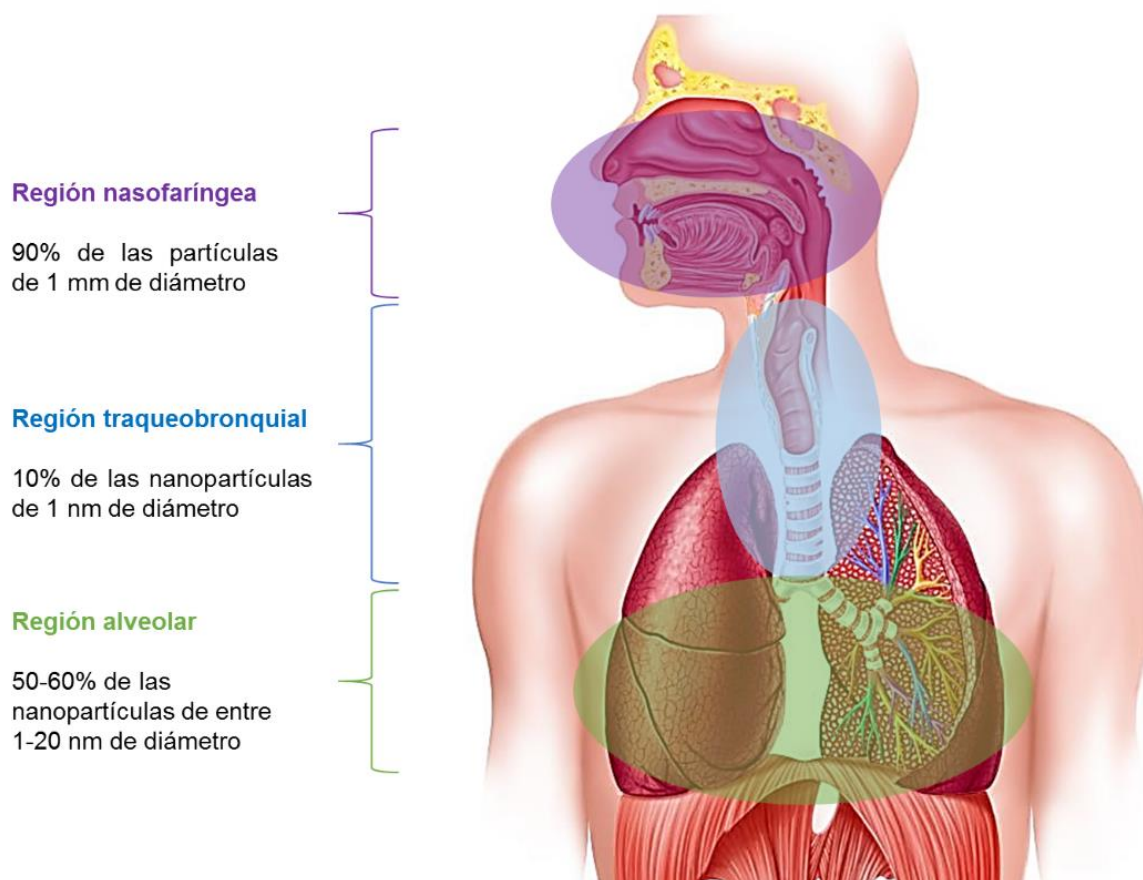


Figura 6. Distribución del TiO_2 en el tracto respiratorio de acuerdo al tamaño de las partículas.

El primer estudio de toxicidad por vía inhalatoria del que se tiene registro fue un estudio realizado en 1985 con ratas expuestas a 0, 10, 50 y 250 mg/m^3 de TiO_2 durante 6 horas al día, 5 días a la semana por 2 años y se observó que los animales presentaban incremento en la incidencia de neumonía, traqueítis y rinitis con metaplasia escamosa en la cavidad nasal anterior. Además, las ratas presentaban hiperplasia en neumocitos tipo II, proteinosis alveolar, pleuritis focal y deposición de TiO_2 en los ganglios linfáticos traqueobronquiales (Lee et al., 1985). Con la concentración más alta (250 mg/m^3), la cual es exagerada, se produjeron adenomas bronquioloalveolares y carcinomas de células escamosas queratinizantes, mientras que en las concentraciones de 10 y 50 mg/m^3 no se encontraron tumores pulmonares (Lee et al., 1985).

Desde entonces, la vía inhalatoria no ha dejado de investigarse. Se ha descrito tanto en experimentos *in vitro* con diferentes líneas celulares como en experimentos con ratones y ratas de múltiples cepas el incremento en la producción de ROS, estrés oxidativo,

lipoperoxidación, depleción de antioxidantes como el glutatión, ruptura de doble cadena en el DNA y de cadena sencilla, aberraciones cromosómicas como aneuploidias y formación de micronúcleos, arresto del ciclo celular en la fase G₂/M, activación sostenida del inflamasoma NLRP3 e inflamación crónica pulmonar, liberación de interleucinas como la IL-1 α , IL-1 β , IL-18, Interferón γ , TNF- α , TGF- β que se caracterizan por favorecer la inflamación, disminución en la cantidad de surfactante y el contenido proteico del BALF, aumento en la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar, hiperplasia del epitelio alveolar y del intersticio, alto infiltrado de macrófagos, neutrófilos y linfocitos, disminución de la función mitocondrial, aumento en la expresión de VEGF como marcador de angiogénesis, liberación de LDH y en mejor de los casos, disminución de la viabilidad celular y expresión de caspasas como la 3, la 8 y la 9 (Horváth et al., 2018; Kuku y Culha 2017; Shakeel et al., 2016; Chézeau et al., 2018; Medina-Reyes et al., 2015a, Medina-Reyes et al., 2015b). Y recientemente se ha documentado que bajo condiciones de estrés después de la exposición a TiO₂ los expresan las proteínas LC3 y Beclina-1 que participan en la autofagia y que además estos macrófagos muestran disminución en la tasa fagocítica (Dai et al., 2018).

Toxicocinética del TiO₂ por vía inhalatoria

Al igual que por la vía oral, una fracción del TiO₂ que se inhala es trasladado al torrente sanguíneo, alcanzando así otros órganos (Figura 7). Después del pulmón, los nódulos linfáticos, el hígado y los riñones son los principales órganos donde el TiO₂ se acumula después de su inhalación. Por esta razón han comenzado a realizarse estudios en sangre, hígado, bazo, riñones, cerebro e incluso testículos (Rodríguez-Escamilla et al., 2019). Sin embargo la toxicocinética del TiO₂ después de ser inhalado la fracción de TiO₂ que se trasloca al torrente sanguíneo no se tiene bien descrita, hacen falta estudios de absorción, distribución, metabolismo y eliminación. En un estudio muy bien realizado con ratas expuestas a TiO₂ durante 6 horas a 15 mg/m³ (que es una exposición muy realista) se le dio seguimiento al contenido de Ti en bulbo olfatorio, nódulos linfáticos, pulmones, sangre, hígado, riñones, bazo, timo, corazón, páncreas, cerebro, heces y orina durante 14 días. Los pulmones alcanzaron la concentración máxima de Ti a las 48 h con 3623 \pm 633 ng de Ti, pero con el paso del tiempo disminuyó hasta los 1794 \pm 1279 en el día 14, lo cual no es despreciable. En el hígado se encontró un pico máximo de 300 \pm 200 ng de Ti a las 48 h mientras que a los 14 días se encontró 120 \pm 30 ng de Ti. En los riñones se encontró el pico máximo a las 24 h con 150 \pm 30 ng de Ti mientras que en el día 14 se encontraron 100 \pm 25 ng de Ti. En el bazo se encontraron 63 \pm 35 ng de Ti. El timo, corazón, páncreas, cerebro mostraron una concentración de Ti de entre 50-150 ng durante los 14 días. Hay que hacer

énfasis que en sangre la concentración de Ti durante los 14 días fue de entre 200-300 ng, es decir, no hubo una disminución a través del tiempo. También es importante mencionar que a través de la orina y las heces se excreta gran cantidad de Ti, especialmente por las heces las cuales mostraron una cantidad de entre 2000-40000 ng de Ti durante todo el estudio mientras que por la orina se excretó entre 200-800 ng de Ti (Pujalté et al., 2017).

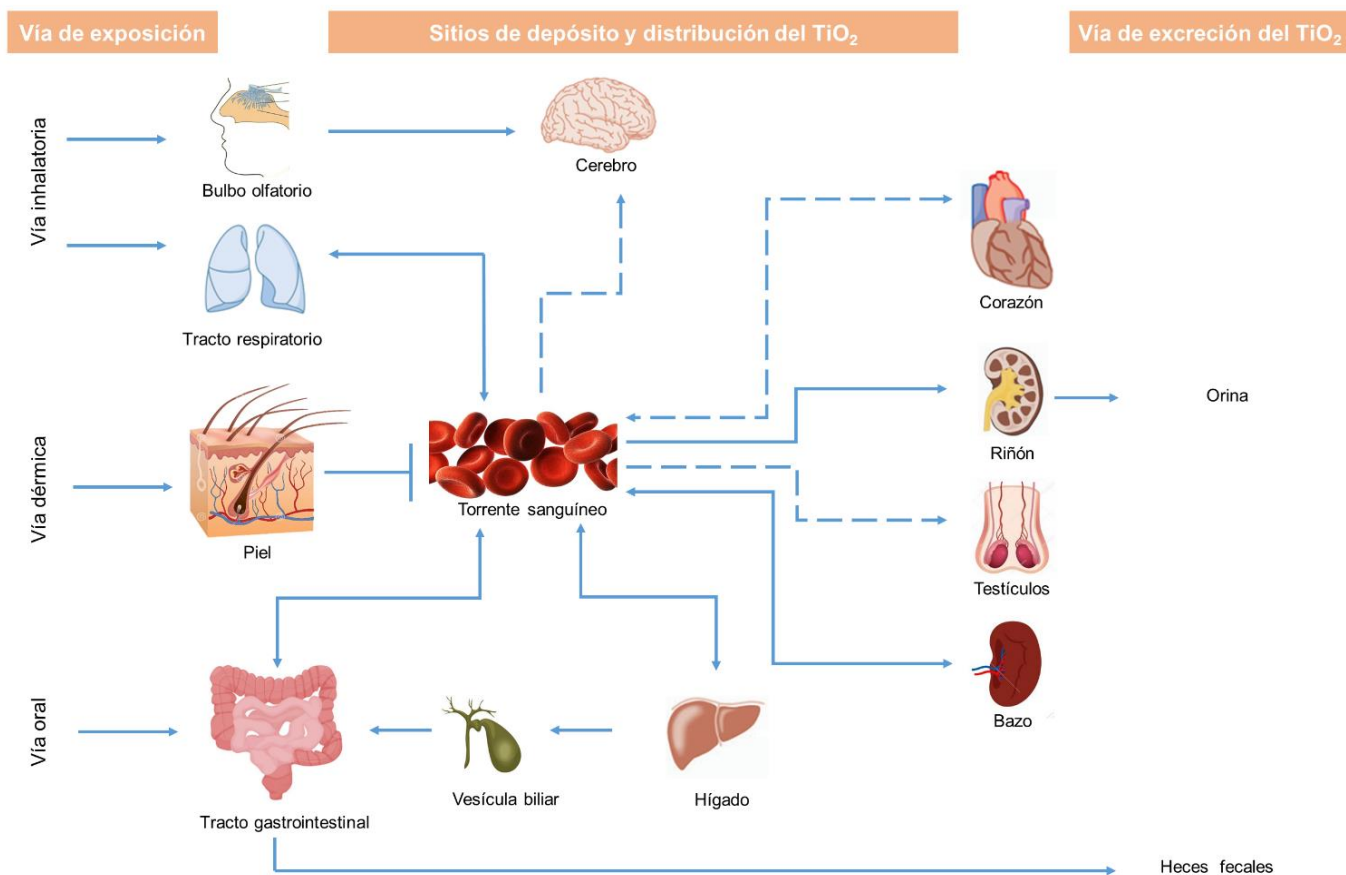


Figura 7. Distribución del TiO_2 en el cuerpo después de estar expuesto a él por las diferentes vías. Por vía inhalatoria el TiO_2 puede depositarse en el tracto respiratorio y por medio del bulbo olfatorio alcanzar el cerebro. Además, por medio del tracto respiratorio puede alcanzar el torrente sanguíneo. Por vía dérmica, el TiO_2 no logra atravesar la piel, por lo que los efectos tóxicos son solo limitados a la piel. Por vía oral, el TiO_2 alcanza a llegar al tracto gastrointestinal con el colon como principal órgano de depósito y de ahí se trasloca al torrente sanguíneo. Una vez en el torrente sanguíneo el TiO_2 es traslocado a otros órganos como el cerebro, hígado, corazón, riñones, testículos y bazo. Del hígado, puede pasar a vesícula biliar y regresar a intestinos. En cerebro, corazón y testículos el depósito es mínimo y pocos estudios han logrado demostrar depósito de TiO_2 aunque los efectos tóxicos son bastante claros. En hígado, bazo y riñones el depósito ha sido ampliamente demostrado y a partir de los riñones hay una mínima cantidad (0.01%) de TiO_2 que puede ser excretada por la orina mientras que por el tracto gastrointestinal se puede excretar el 90% del TiO_2 mediante las heces fecales.

Estudios epidemiológicos

Los pocos estudios epidemiológicos que hay han evidenciado que los trabajadores con más susceptibilidad al daño pulmonar inducido por el TiO_2 son los que se encargan del empaquetamiento del TiO_2 ya que en estas áreas el polvo se dispersa fácilmente a través del aire durante el embolsado (IARC, 2010). Un dato distinguido es el de un hombre de 53 años quien fue empacador de TiO_2 durante aproximadamente 13 años y quien presentó adenocarcinomas en el pulmón así como titanio difundido y depositado alrededor de bronquiolos (Yamadori et al., 1986).

En un estudio realizado en Montreal, Canadá se analizaron 857 casos de cáncer de pulmón en hombres de entre 35 y 70 años de edad que habían sido diagnosticados entre 1979-1985. De todos los casos analizados solo 33 habían estado expuestos a TiO_2 y se estimó que la exposición fue constante a concentraciones medias o altas durante, al menos, 5 años. La conclusión de este estudio fue que no había ninguna tendencia a desarrollar cáncer de pulmón según la frecuencia, el nivel o la duración estimados de la exposición (Boffetta et al., 2001). Otro estudio similar, también realizado en Montreal, Canadá se analizó el riesgo de cáncer de pulmón en relación con la exposición a TiO_2 ajustando algunos factores que podrían intervenir, incluido el tabaquismo y la conclusión fue que no había ningún riesgo detectable de cáncer de pulmón (Ramanakumar et al., 2008)

Otro estudio analizó a 20, 862 trabajadores de 7 países, y de 15 fábricas, 11 de ellas en Europa y 4 en Estados Unidos de América. Se observó un ligero incremento en la mortalidad por cáncer de pulmón en los trabajadores de Europa, pero no hubo cambios con los trabajadores de Estados Unidos de América. Las diferencias entre locaciones se asocian a que el TiO_2 no es del mismo tamaño (pero tampoco reportan el tamaño de cada una), además la información colectada en Europa era por trabajador mientras que en Estados Unidos de América era por fábrica, y además los métodos de síntesis son diferentes para los dos lugares. En conclusión, este estudio tampoco puede asociar de manera directa el incremento en la mortalidad por cáncer de pulmón con la exposición al TiO_2 (Hext et al., 2005).

2.3 Regulación de las nanopartículas

Lo que la nanotoxicología busca en cuanto a la regulación de los nanomateriales no es que se disminuya la producción de estos, porque de antemano es sabido el conflicto de interés que las empresas presentan, pues comprar TiO_2 y sintetizarlo representa un gasto económico muy mínimo. Un kilogramo de TiO_2 tiene en México un precio aproximado de 120 pesos mexicanos (MXN), incluyendo gastos de importación y como se desarrolló en secciones anteriores, las ganancias que representa son millonarias. Sin embargo, lo que se busca es que se regule su síntesis, que haya límites de exposición y sanciones a quienes no los cumplan. Que se desarrolle equipo adecuado, el cual no existe y condiciones de trabajo óptimas para los trabajadores. Por otro lado, que los productos de consumo alimenticio estén debidamente etiquetados y hacer concientización de su ingesta.

Con base en la evidencia toxicológica del TiO_2 , algunas instituciones de diferentes países han emitido recomendaciones acerca de los límites ocupacionales (*Recommended Exposure Limit*; REL) a los que deben estar expuestos los trabajadores, por ejemplo el NIOSH recomendó que la concentración máxima de exposición a nanopartículas de TiO_2 debe ser de 0.3 mg/m^3 por un tiempo máximo de 10 h laborales. La *New Energy and Industrial Technology Development Organization* (NEDO), recomienda que la concentración máxima de exposición sea de 0.6 mg/m^3 en una jornada laboral de 8 h. El *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* también de Japón ha establecido la recomendación de no estar expuesto a más de 0.61 mg/m^3 de TiO_2 en una jornada laboral de 8 h mientras que la *Japan Society for Occupational Health* (JSOH) recomienda como límite de exposición 1 mg/m^3 .

A pesar de las REL emitidas, la *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) que es la organización encargada de emitir los límites de exposición ocupacional (*Occupational exposure limits*; OELs) en los Estados Unidos de América permite que los ambientes ocupacionales tengan hasta 15 mg/m^3 , mientras que en México la Norma Oficial Mexicana-010 (NOM-010) permite 10 mg/m^3 en una jornada de 8 h al día o de 40 h a la semana, o también permite un límite máximo de 20 mg/m^3 si se está expuesto solo durante 15 minutos al día. Esto demuestra que a pesar de las recomendaciones y la evidencia toxicológica, aún la regulación es muy permisiva con los límites de exposición.

Capítulo 3

Fibras: Su impacto en el mercado, beneficios, toxicidad y su implicación en procesos como la transición epitelio mesénquima, fibrosis y angiogénesis.

3.1 Fibras: Usos, ganancias y toxicidad de las nanofibras

La síntesis y uso de las fibras ha ocurrido desde decenas de años atrás especialmente para la industria textil y como material de construcción. Actualmente, el mercado de las fibras es dominado por i) las fibras de polímeros sintéticos, como las fibras de poliamidas, poliésteres, poliacrilonitrilo o alcohol polivinílico, ii) fibras de carbón, iii) fibras de celulosa y las más recientemente iv) las fibras metálicas.

Sin embargo, históricamente las fibras han mostrado alta toxicidad ya que se depositan en el pulmón por impactación, sedimentación, precipitación electrostática, intercepción y difusión, que es muy diferente a la manera en que se depositan las partículas esféricas (difusión) y eliminarlas de las vías respiratorias es muy complicado.

Los asbestos por ejemplo, que son fibras de silicatos inducen mesotelioma y están clasificados por la IARC en el Grupo I como carcinógenos para humanos. Por esta razón desde 1990 la toxicología ha investigado si la forma de fibra con otras composiciones induce efectos similares y para eso los asbestos se han comparado con las fibras de vidrio o las fibras minerales (Lippmann, 1990a; Lippmann 1990b). Se demostró que para las fibras minerales tanto el largo como el ancho son críticos en los efectos tóxicos, lo cual es una similitud con los asbestos. Las fibras de 2 μm de largo inducen asbestosis, las de 5 μm inducen mesotelioma y las de 10 μm de largo inducen cáncer de pulmón. Además, en cuanto al ancho las fibras las de $<0.1 \mu\text{m}$ están asociadas a mesotelioma y las fibras de $>0.1 \mu\text{m}$ están asociadas a asbestosis y cáncer de pulmón. El hecho de que las fibras con diámetros más pequeños estén asociadas a mesoteliomas es porque son capaces de abandonar el pulmón y acumularse en la pleura y peritoneo donde el mesotelioma se puede desarrollar, mientras que las de diámetros más grandes permanecen en el pulmón e inician las patologías ahí.

Un ejemplo más claro de la toxicidad inducida por fibras minerales además de los asbestos es un estudio epidemiológico de 1987 donde se mostró que las personas que vivían en unas villas en Cappadocia, Turquía construidas con erionita, un tipo de zeolita natural que contiene fibras de aluminosilicatos, tenían mayor incidencia de mesotelioma (Baris et al., 1987). Cabe mencionar que tanto las fibras de vidrio como las de cerámica ya han sido clasificadas por la IARC en el Grupo 2B como posibles carcinógenos para humanos.

A pesar de lo ya documentado, hace aproximadamente unos 8 años comenzó a incrementar la síntesis de fibras en tamaño nanométrico, es decir las nanofibras y comenzaron a posicionarse como alternativa para remplazar a las fibras micrométricas e incluso a algunos otros nanomateriales esféricos, como es el TiO_2 . Por definición una nanofibra es un objeto con dos dimensiones externas en la nanoescala y una tercera dimensión significativamente más larga, no necesariamente en la nanoescala (ISO ISO/TS 27687:2008).

Actualmente hay aproximadamente 46 tipos diferentes de nanofibras en el mercado, que comparadas con los 2486 no es mucho, pero tienen amplio potencial (Base de datos Nanowerk; <https://www.nanowerk.com/nanomaterial-database.php>). El gran área superficial que ofrecen las nanofibras, combinada con otras propiedades físicas, eléctricas, térmicas y mecánicas, las hace adecuadas para diversas aplicaciones comerciales, incluyendo electrónica, energía, mecánica, química y ambiental. Por ejemplo, las nanofibras son de gran utilidad en la industria para el almacenamiento de energía en baterías para dispositivos electrónicos, en la filtración de aire y agua y también se ha propuesto su utilización en la biomedicina para hacer andamiajes de tejidos, implantes, para los materiales de curación como vendas o espumas que retrasen las hemorragias y para la liberación de fármacos.

Un estudio realizado por una empresa llamada BCC en el 2016 menciona que el mercado global de productos con nanofibras alcanzó los \$203.2 millones de dólares (USD) en el 2013 y que aumentó a \$383.7 millones de dólares (USD) en el 2015, con una proyección a incrementar a 2 mil millones de dólares para el 2020. Lo anterior representa una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 38.6% entre 2015 y 2020. Además, algo que es muy importante a considerar es que estos valores de mercado se miden a nivel de fabricante, es decir, podrían todavía ser mayores.

3.2 Toxicidad de nanofibras de dióxido de titanio

Hace unos 5 años comenzó a sintetizarse TiO_2 en forma de fibras y comenzaron a proponerse aplicaciones para este tipo de nanomaterial. Se proponen para reemplazar los implantes óseos ya que se ha visto que los osteocitos proliferan más cuando el implante tiene nanofibras de TiO_2 y además se favorece la angiogénesis, que es esencial para la osteointegración (Brammer *et al.*, 2012; Beltrán-Partida *et al.*, 2017), también se proponen para reemplazar el TiO_2 y el SiO_2 de las celdas solares ya que por su área superficial y su forma hacen mejor la conducción de electrones optimizando la energía solar captada (Hwang

et al., 2014). El tratamiento de aguas residuales actualmente se lleva a cabo con nanopartículas esféricas de TiO₂ y también se propone que las nanofibras las reemplacen ya que son más fotocatalíticas y por lo tanto con menos cantidad se obtienen los resultados esperados (Liu *et al.*, 2014b; Du *et al.*, 2014). También, recientemente se propusieron las nanofibras de TiO₂ como una herramienta valiosa para la extracción de miRNAs de muestras biológicas, ya que mostraron una recuperación de 18.0 ± 3.6% para los miRNAs mientras que el kit comercial recuperó solo 0.02 ± 0.0001% (Jimenez *et al.*, 2018). La extracción mejorada de miRNAs usando fibras podría explicarse debido a la fuerte coordinación entre TiO₂ y el grupo fosfato del RNA, y el buffer de elución utilizado por los autores logra una extracción selectiva de RNA más pequeños que 500 nucleótidos (Jimenez *et al.*, 2018). Actualmente, la base de datos de NCBI pubmed, al mezclar las palabras “nanofiber, titanium dioxide” da como resultado alrededor de 10 investigaciones sobre la toxicidad de las nanofibras de TiO₂ mientras que arroja alrededor de 220 artículos científicos sobre sus posibles aplicaciones (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=nanofiber+titanium+dioxide>).

Toxicidad

La exposición a las nanofibras de TiO₂ induce pérdida de la integridad de la membrana en las células epiteliales de pulmón (Allegri *et al.*, 2016), ruptura de los fagolisosomas, liberación de catepsina B y activación del inflammasoma (NLRP3) por medio de la liberación de citocinas IL-1β e IL-18 (Yazdi *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2014). También, la exposición a las nanofibras de TiO₂ induce ROS, apoptosis (Hamilton *et al.*, 2009) y liberación de la enzima LDH (Xia *et al.*, 2013; Tilton *et al.*, 2013). Con respecto al transcriptoma y el proteoma analizado en células alveolares (cultivo primario) expuestas a nanofibras de TiO₂, hay genes y proteínas sobreexpresados relacionados con la producción de óxido nítrico (NO), regulación de angiogénesis, factores de crecimiento de las fases G1 y S del ciclo celular, y también relacionados con el arresto celular, inestabilidad genómica, adhesión a la matriz extracelular medida por integrinas, NADPH oxidasa, regulación transcripcional, transición epitelio-mesenquimal entre otros (Tilton *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha evaluado la implicación de la expresión de esos genes en un modelo *in vivo*.

En cuanto a los estudios *in vivo*, se ha mostrado que por aspiración faríngea se induce inflamación a nivel tisular, alveolitis, bronquiolitis e inflamación perivascular, incluso después de 112 días de una administración de 30 µg en ratones expuestos a nanofibras de TiO₂ por

aspiración faríngea (Hamilton et al., 2009; Bonner et al., 2013; Silva et al., 2013; Porter et al., 2013). También, la exposición de ratones a las nanofibras de TiO₂ incrementa el infiltrado de células como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células polimorfonucleares y linfocitos en el lavado bronquioalveolar (BAL) (Bonner et al., 2013). Conjuntamente, 4 laboratorios que se dedicaron a realizar los mismos experimentos determinaron fuerte inflamación en la región bronquiolar terminal y la región de la bifurcación del conducto alveolar así como acumulación del TiO₂ en la misma área (Bonner et al., 2013).

En nuestro laboratorio, observamos que las células epiteliales de pulmón expuestas a las nanofibras de TiO₂ durante 7 días no solo sobrevivieron, sino que al sembrarlas en una membrana corioalantoide de embriones de pollos, ganaron potencial invasivo y proliferativo después de 5 días (Medina-Reyes et al., 2015).

Por otro lado, con otras nanopartículas como SiO₂, CeO₂, MWCNT y Ag se ha observado que la inflamación constante lleva a inducción de fibrosis pulmonar mediante transición epitelio mesénquima (Wang et al., 2017; Ma et al., 2017; Chen et al., 2014; Choo et al., 2016). En todos estos estudios, se determina la fibrosis evaluando principalmente la expresión de TGF- β y de colágeno en modelos *in vitro* (monocapa) pero no se ha evaluado si la expresión de esos marcadores en los sistemas en monocapa necesariamente conduce a la formación de un tumor con un fenotipo fibrótico o características que puedan sugerir que es más agresivo. Para ello proponemos el modelo de xenotrasplante que es un modelo 3D y simula un tumor sólido. Además, otro efecto asociado a la exposición de nanopartículas, como las de Ni o Co, es la activación del factor inducible de hipoxia 1 α (HIF-1 α) y sobreexpresión del VEGF, ambos indicadores de la iniciación de un proceso angiogénico y que también se relacionan con la fibrosis y un fenotipo más agresivo (Wan et al., 2011; Feng et al., 2015). En este trabajo buscamos investigar si la exposición a nanofibras de TiO₂ puede inducir en un modelo de monocapa a) internalización de las fibras, b) expresión de marcadores angiogénicos y fibróticos c) daño a DNA y al mismo tiempo evaluar si la expresión y/o cambios que las nanofibras de TiO₂ inducen en un modelo de monocapa conduce a la formación de tumores más grandes y con un fenotipo más mesenquimal en un modelo 3D de xenotrasplante subcutáneo evaluando los mismos parámetros así como su respuesta al fármaco antineoplásico cisplatino.

2. HIPÓTESIS

La exposición de células epiteliales de pulmón a nanofibras de TiO_2 durante 7 días en un modelo *in vitro* inducirá la sobreexpresión de marcadores de angiogénesis, transición epitelio mesénquima, incrementará la inestabilidad genómica e inducirá mayor proliferación lo que conducirá a que, una vez inyectadas en la subdermis de los ratones inmunosuprimidos, es decir en un modelo de xenotrasplante, desarrollen tumores de mayor volumen con un fenotipo más mesenquimal y con menor sensibilidad al antineoplásico cisplatino.

3. OBJETIVO

Determinar si la exposición *in vitro* de células epiteliales de pulmón a nanofibras de TiO₂ por 7 días induce sobreexpresión de los marcadores de angiogénesis HIF-1 α , VEGF, de transición epitelio mesénquima TGF- β , N-cadherina, E-cadherina, vimentina; y si dicha exposición incrementa la inestabilidad genómica y la proliferación celular. Por otro lado, determinar si los daños observados en las células epiteliales de pulmón expuestas *in vitro* durante 7 días pueden conducir a la formación de tumores de mayor volumen, con un fenotipo más agresivo y con menor sensibilidad al antineoplásico cisplatino.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Síntesis y caracterización de las nanofibras de TiO₂

4.1.1 Síntesis: A partir de nanopartículas comerciales de TiO₂ (Sigma Aldrich 637254) que tienen una forma similar a esferas se sintetizaron las nanofibras de TiO₂ por un proceso hidrotérmico. Brevemente, el TiO₂ comercial (0.5 g) se resuspendió en una solución NaOH 10 M y esta se agitó durante 10 minutos. Posteriormente la solución se vertió en un recipiente de teflón y se ultrasonicó durante 15 minutos para dispersar las nanopartículas y finalmente la solución se colocó en un horno para ser calentado a 200°C por 24 h. El TiO₂ se enjuagó con agua desionizada y centrifugado a 3 500 rpm sucesivamente por, al menos, 5 veces. El pH, que inicialmente era de 14, se ajustó a 7 mediante lavados con HCl 0.1 M; cada lavado con una duración de entre 8-10 minutos y centrifugaciones a 3 500 rpm para recuperar el TiO₂. Finalmente el TiO₂ se calcinó a 700°C por 30 minutos con una rampa de temperatura de 1°C/min (Hamilton et al., 2009).

4.1.2 Estructura cristalina: El TiO₂ comercial, a partir del cual se sintetizaron las nanofibras, tiene una estructura cristalina de anatasa, y el objetivo era obtener nanofibras con la misma estructura. Debido a que el arreglo cristalográfico del TiO₂ cambia de anatasa a rutilo cuando el material alcanza los 900°C, se realizó una espectroscopía Raman para garantizar que las nanofibras de TiO₂ obtenidas de la síntesis mantuvieran esta estructura cristalina de anatasa y no hubieran cambiado a rutilo. Para realizar la espectroscopía Raman se usó un microscopio Olympus (100 y 0,90 NA: apertura numérica) tanto para enfocar el láser en muestras sólidas como para coleccionar la luz dispersada en una configuración de retrodispersión de 180°. Los espectros Raman de nanofibras de TiO₂ se midieron en una región espectral de 300-2000 cm⁻¹ con un espectrómetro Raman dispersivo Almega XR. Además, los espectros Raman se acumularon durante 25 s con una resolución de ~4 cm⁻¹, la fuente de excitación fue radiación de 532 nm de un láser Nd: YVO 4 (frecuencia duplicada) y la potencia del láser en la muestra fue de 2.5 mW.

4.1.3 Tamaño y morfología de las nanofibras de TiO₂: Para hacer evidente que el producto final de la síntesis habían sido nanofibras la morfología de las nanopartículas se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM; JEOL 5800-LV, Japón) a 5000X, 15 kV. Mediante un análisis de, al menos, 6 imágenes y con ayuda del software ImageJ se determinó lo largo y lo ancho de las nanofibras de TiO₂. La morfología de los aglomerados se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM; JEOL JEM 1010, Japón) a 75,000X 60 kV.

4.1.4 Potencial eléctrico de las nanofibras de TiO₂ y tamaño de aglomerados en medio F12K: Se determinó el potencial Z de las nanofibras de TiO₂, el cual determina el potencial eléctrico de las partículas, y el tamaño de los aglomerados de las nanopartículas suspendidas en medio de cultivo celular F12K suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) con una dilución 1:7 en el Zeta Plus meter Brookehaven.

4.2 Modelo *in vitro*: células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂

4.2.1 Cultivo celular y exposición a nanofibras de TiO₂

Células epiteliales de humano con adenocarcinoma pulmonar de la línea A549 y que específicamente son neumocitos tipo II se obtuvieron de la “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Manassas, VA) y se cultivaron con medio F12K suplementado con 10% de SFB. El cultivo celular se mantuvo en una atmósfera de humedad al 95% y 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. Para la exposición, las nanofibras de TiO₂ se resuspendieron en medio F12K más 10% de SFB y sonicadas por 30 min a 60 Hz para dispersar las NPs. Las células se expusieron a concentraciones finales de 1 y 10 µg/cm² de nanofibras de TiO₂ durante 7 días.

Las células se cosecharon y sembraron dos veces por semana con tripsina-EDTA al 0.05% por 5 min a 37°C. Luego la solución se centrifugó a 1 500 rpm por 5 min y las células se resuspendieron en medio F12K suplementado con 10% de SFB.

4.2.2 Internalización de las nanofibras de TiO₂

Para determinar si las células epiteliales de pulmón internalizan las nanofibras de TiO₂, después de la exposición de 7 días, las células se enjuagaron con buffer Hanks para retirar las nanofibras de TiO₂ que no se internalizaron. Posteriormente, para recuperar las células la placa Petri se incubaron con tripsina-EDTA al 0.05% por 5 min, centrifugaron a 1 500 rpm durante 5 min y para se fijaron con glutaraldehído al 2% por 2 h a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron bajo las mismas condiciones y enjuagadas con 500 µL de

solución de fosfatos SORENSEN dos veces. Posteriormente, las células se trataron con 2% de óxido de osmio, el cual es un contrastante de imágenes. Se deshidrataron las células mediante una secuencia de alcoholes (10%-90%) y se incluyeron en resina y esta se polimerizó a 80°C durante 48 h para después realizar cortes ultrafinos. Los cortes se trataron con metales pesados como plomo y uranio para la obtención de imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión.

Por otro lado, mediante una tinción con hematoxilina y eosina realizada para observar la morfología de las células se pudo observar también la presencia de nanofibras de TiO₂ en el citoplasma de las células. Las células después de haber sido expuestas a nanofibras durante 4 días, se sembraron sobre un cubreobjetos y en el día 7 de exposición se fijaron con paraformaldehído-PBS (solución buffer de fosfatos) al 4% durante 40 min a temperatura ambiente. Las células se tiñeron con hematoxilina por 1 min y con eosina durante 10 min y montadas en portaobjetos con glicerol-PBS 3:1. Las fotografías se tomaron por microscopía de campo claro en el microscopio confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X, Alemania) a 40X magnificación. A estas mismas muestras se les realizó una microscopía de contraste interdiferencial (DIC) en donde también se observa la internalización de las nanofibras de TiO₂ a 40X de magnificación.

4.2.3 Citotoxicidad y proliferación de las células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂

El sobrenadante de las últimas 24 h de exposición se recuperó y se le realizó una cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) con el KIT ROCHE 04744926001. Brevemente, los sobrenadantes se mezclaron con diaforasa/NAD⁺ para la catálisis y con cloruro de yodotetrazolio y lactato de sodio para dar color a la reacción. La solución se incubó a 37°C bajo oscuridad por 15 min y leída en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, BioTek) a 492 nm. Los datos se expresan como media ± error estándar de, al menos, tres experimentos independientes.

Se determinó la expresión de Ki67 como un marcador de proliferación celular por medio de RT-PCR e inmunocitoquímica. Para la RT-PCR, se extrajo RNA de aproximadamente 1x10⁶ células sembradas en una caja Petri de 21 cm² expuestas a nanofibras de TiO₂ durante 7 días con ayuda de TRIZOL. Se determinó la integridad del RNA por medio de una electroforesis con un gel de agarosa al 1% y se cuantificó la cantidad de RNA en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, BioTek) a una longitud de onda 260/280 nm. Posteriormente, se sintetizó

cDNA a partir del RNA por una reacción de retrotranscriptasa, para ello se utilizó el KIT Qiagen 205310. Brevemente, después de la extracción de RNA con TRIzol, se tomó 1 µg para la reacción de retrotranscriptasa y se limpió de DNA genómico con el reactivo gDNA Wipeout Buffer, 7x y se incubó a 42°C por 2 min. Para la retrotranscripción se realizó la Reverse-transcription master mix indicada en el KIT y se incubó la muestra a 42°C por 15 min. El cDNA se utilizó para la amplificación del gen Ki67 con el *primer forward* GCCTGCTCGACCCTACAGA; y el *primer reverse* GCTTGTCAACTGCGGTTGC. Para la reacción se utilizaron 0.5 U de Taq polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y se amplificó bajo las siguientes condiciones: 3 min 95°C, 30 seg 95 °C, 30 seg T_m, 1 min 72°C, 35 ciclos, 5 min 72°C, infinito 4°C. La expresión del gen de Actina se utilizó como control de carga para la RT-PCR. La densitometría de las bandas, como producto de la RT-PCR, se realizó mediante el software de Image J 1.43.

Para la cuantificación de Ki67 por medio de inmunocitoquímica, después de 5 días de exposición a nanofibras de TiO₂, se sembraron 2.5 x 10⁵ células en un cubreobjetos estéril dentro de una caja Petri de 8 cm². En el día 7 de exposición, las células se fijaron con paraformaldehído-PBS al 4% por 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizaron con PBS-tritón al 0.5% frío, casi al punto de congelación, por 7 min. Se enjuagaron tres veces con PBS por 5 min a temperatura ambiente y luego se bloquearon con PBS-BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas se enjuagaron nuevamente tres veces con PBS durante 5 min a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario anti-Ki67 1:500 (BioLegend, 652402) a 4°C durante toda la noche. Luego de la incubación, se enjuagaron con PBS bajo las mismas condiciones y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rat acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) 1:1000 durante 2 h a temperatura ambiente. Después de enjuagar con PBS nuevamente la inmunodetección se reveló con diaminobencidina (DAB) y H₂O₂ durante 2 min a temperatura ambiente. Las muestras se contrastaron con hematoxilina la cual se usó durante 30 seg, se enjuagaron, se deshidrataron con una serie de alcoholes del 70% hasta xilol por 5 min y se montaron sobre un portaobjetos. Con microscopía de campo claro se tomaron fotografías (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación. Se cuantificó la expresión de Ki67 mediante el software del microscopio confocal. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media±error estándar.

4.2.4 Marcadores de angiogénesis y fibrosis en cultivo celular después de la exposición a nanofibras de TiO₂

La expresión génica de HIF-1 α y VEGF se determinó por RT-PCR. Una vez sintetizado el cDNA, se realizó la PCR con los siguientes primers: HIF-1 α forward TTCCCGACTAGGCCCATTC; HIF-1 α reverse CAGGTATTCAAGGTCCCATTTC. VEGF forward GGCTGGCAACATAACAGAGAA; VEGF reverse CCCACATCTATACACACCTCC. Para la reacción se utilizaron 0.5 U de Taq polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y se amplificó bajo las siguientes condiciones: 3 min 95°C, 30 seg 95 °C, 30 seg Tm, 1 min 72°C, 35 ciclos, 5 min 72°C, infinito 4°C. La expresión del gen de Actina se utilizó como control de carga para la RT-PCR. La densitometría de las bandas, como producto de la RT-PCR, se realizó mediante el software de Image J 1.43. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

La expresión de HIF-1 α y TGF- β a nivel de proteína se determinó por inmunofluorescencia. Después de 5 días de exposición a las nanofibras de TiO₂, se sembraron 2.5 x 10⁵ células en un cubreobjetos estéril. En el día 7 de exposición, las células se fijaron con paraformaldehído-PBS al 4% por 40 min. Posteriormente se permeabilizaron con PBS-tritón al 0.5% frío, casi al punto de congelación, por 7 min. Se enjuagaron tres veces con PBS por 5 min a temperatura ambiente y luego se bloquearon con PBS-BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas se enjuagaron nuevamente tres veces con PBS durante 5 min a temperatura ambiente e incubadas con el anticuerpo primario HIF-1 α 1:500, TGF- β 1:300 durante toda la noche a 4°C (Santa Cruz 146; Santa Cruz H206, respectivamente). Las células se enjuagaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a TRITC 1:600 por 2 h a temperatura ambiente (Jackson 111-025-003). Los cubreobjetos con las células se colocaron en un portaobjetos. Las laminillas se observaron en el microscopio Confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación. Se cuantificó la fluorescencia de, al menos, tres experimentos independientes mediante el software del microscopio confocal y los datos se expresan como media \pm error.

La proteína N-cadherina se determinó por inmunocitoquímica. Las células se sembraron en cubreobjetos estériles, se fijaron a los 7 días de exposición a las nanofibras de TiO₂, se permeabilizaron y se bloquearon con BSA 1% a temperatura ambiente. Luego las células se incubaron el anticuerpo primario 1:500 (BioLegend, 652402) durante toda la noche a 4°C, se

enjuagaron y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a HRP para posteriormente revelarlas con diaminobencidina y H_2O_2 . Las muestras se contrastaron con hematoxilina la cual se usó durante 30 seg, se enjuagaron, se deshidrataron con una serie de alcoholes del 70% hasta xilol por 5 min y se montaron sobre un portaobjetos. Las fotografías se realizaron con microscopía de campo claro en el microscopio confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación. Se cuantificó la expresión de N-cadherina mediante el software del microscopio confocal de, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

Por otro lado, en los cultivos celulares expuestos a nanofibras de TiO_2 también se determinó la concentración de hidroxiprolina como un marcador de pro-fibrosis. En el día 7 de exposición los cultivos se tripsinizaron, se centrifugaron a 1 500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y el pellet se resuspendió en 50 μ L de HCl concentrado (\sim 12M) y usando un criovial las células se hidrolizaron a 120°C por 1 h. Después, los crioviales se centrifugaron a 10,000 xg por 3 min y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de la hidroxiprolina mediante el KIT Biovision K555. Se realizó una curva de concentración conocida de hidroxiprolina y tanto la curva como las muestras se incubaron a 60°C por 90 min. La absorbancia se determinó con un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, BioTek) a una longitud de onda de 560 nm. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

4.2.5 Inestabilidad genómica por la exposición a nanofibras de TiO_2

Una vez que las células epiteliales de pulmón se expusieron a nanofibras de TiO_2 durante 7 días, se cuantificó la frecuencia de micronúcleos (Fenech 2000) como marcador de inestabilidad genómica. Para obtener células binucleadas y contar los micronúcleos de una sola división celular se bloqueó la citocinesis con 4.5 μ g/mL de citocalasina B (Sigma-Aldrich, C6762) por 24 h. Después las células se fijaron con paraformaldehído-PBS 4% por 40 min a temperatura ambiente y se tiñeron con Hoechst 1:800 (Thermo Scientific, 62249) por 1 h a 37°C en constante agitación. Se montaron las muestras en portaobjetos y se realizó una cuantificación de la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas usando un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, Alemania). Por otro lado, se cuantificó la frecuencia de células trinucleadas y tetranucleadas como otro marcador de inestabilidad genómica. Se presentan las imágenes más representativas tanto de los micronúcleos como de las células multinucleadas y los conteos de, al menos, tres experimentos independientes se expresan como media \pm error estándar.

4.3 Modelo de Xenotrasplante de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂ y trasplantadas en ratones inmunosuprimidos

4.3.1 Mantenimiento de los ratones

Los ratones de la cepa BALB/c nu/nu se mantuvieron en cajas limpias, secas y en condiciones ambientales adecuadas. Todos los días se observó a los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte. El agua y la comida suministrada a los animales fueron estériles y de libre acceso. Los ratones se mantuvieron a una temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $60\pm 10\%$, así como en ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El agua, el consumo de alimento y el peso de los ratones se cuantificó semanalmente. Los ratones de 7 semanas de edad estuvieron en aclimatación por 1 semana en el bioterio y todos los experimentos fueron aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM bajo las normas que establece la NOM-062-ZOO-1999.

4.3.2 Xenoinjerto subcutáneo de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂ en ratones inmunosuprimidos

Después de los 7 días de exposición, las células se cosecharon y se xenotrasplantaron 3×10^6 células control y 3×10^6 células expuestas a 1 o $10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO₂ en un volumen de 100 μL de PBS (Reddy et al., 1987; Jakubowska et al., 2013; Ma et al., 2013). Con ayuda de una aguja de 27 G x 13 mm se inyectaron las células subcutáneamente, es decir en el espacio vascular entre la piel y el músculo. La inyección se realizó en el flanco lateral izquierdo de los ratones, justo en medio para no ocasionar inmovilización de las extremidades tanto anterior como posterior (Figura 8). Se sujetó al animal tomando la piel del lomo y cuello con los dedos medio, índice y pulgar y también se sujetó al ratón por la base de la cola con el dedo anular y la palma de la mano para inmovilizarlos. Después se limpió la zona con una torunda de algodón impregnada de alcohol y se levantó un poco la piel. Se introdujo la aguja de 2 a 3 mm a través de la piel con un ángulo de 20 a 30° con respecto al cuerpo del ratón y se presionó suave y firmemente el émbolo de la jeringa para vaciar el contenido.

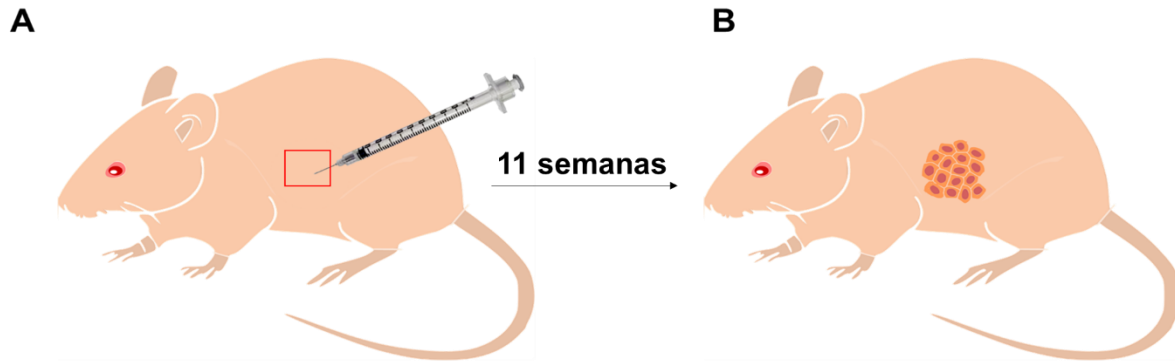


Figura 8. Sitio del xenotrasplante de células epiteliales de adenocarcinoma pulmonar de humano en los ratones inmunosuprimidos. (A) En el cuadro rojo se muestra el lugar donde se llevó a cabo la inyección de 3×10^6 células en un volumen de $100 \mu\text{L}$ de PBS con una aguja de 27 G x 13 mm. (B) Representación de la formación del tumor después de 11 semanas de desarrollo.

Se evaluó el largo y el ancho del tumor 2 veces por semana con una escala vernier digital y para obtener el volumen del tumor se considera la siguiente fórmula $V = L \cdot W^2 / 2$ donde V es volumen (mm^3), L el diámetro más largo (mm) y W el diámetro más corto (Moser et al., 2014; Sobral et al., 2014). Se tomó en consideración la recomendación del “*National Institutes of Health*”, que menciona que si el tamaño del tumor es mayor de 2 cm, representa el 10% del peso corporal, produce limitaciones para el movimiento o la ingesta de alimento, se encuentran ulcerados, infectados o necróticos serían considerados criterios de punto final humanitario, por lo que se llevaría a cabo la eutanasia en ese momento. Cinco ratones de grupos aleatorios presentaron necrosis por lo que se sacrificaron. A las 11 semanas de crecimiento de los tumores los ratones se sacrificaron por el método físico de dislocación cervical, que se encuentra en los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999. Este método físico de eutanasia se llevó a cabo sobre una superficie firme, sujetando con una mano la cabeza del ratón por la base del cráneo con los dedos índice, pulgar y medio o bien, con un utensilio que mantenga firme la base del cráneo, y con la otra mano se toma la base de la cola. Mediante un movimiento rápido, controlado y firme se separan las vértebras cervicales de la base del cráneo. Los tumores se extrajeron de la piel, fotografiaron y se cortaron para fijar una parte con paraformaldehído-PBS al 4% y almacenar otra a -80°C .

4.3.3 Histología, conteo de eritrocitos y forma de los tumores formados a partir de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂

La histología se evaluó mediante una tinción de hematoxilina y eosina mientras que la forma de los tumores se evaluó mediante un análisis de imágenes. Para las histologías, los tumores se fijaron en paraformaldehído-PBS al 4% por al menos 24 h. Posteriormente, se deshidrataron con una serie de alcoholes desde el 40% hasta 100% seguidos por etanol-butanol 1:1, el tren de alcoholes fue de 30 min cada uno y finalmente los tumores se sumergieron en butanol toda la noche. Los tumores deshidratados se embebieron en parafina y se realizaron cortes histológicos de 3 µm. Los cortes histológicos se hidrataron con un tren de Xilol, xilol-etanol 1:1, etanol 100%, 90%, 70% y agua corriente con un tiempo de 2-3 min cada uno. Posteriormente, se realizó una tinción con hematoxilina 1 min y eosina 8 min. Los cortes histológicos una vez teñidos se deshidrataron nuevamente con el mismo tren de alcoholes pero a la inversa. Se realizaron tinciones de al menos 3 ratones por tratamiento. Las imágenes se tomaron con microscopía de campo claro en un microscopio confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación. A partir de las fotografías tomadas de las tinciones de hematoxilina y eosina se cuantificó el número de eritrocitos por fotografía, de al menos 5 fotografías de cada ratón y de, al menos, tres ratones por tratamiento. Los datos se expresan como media ± error estándar. Para evaluar la forma de los tumores, a partir de las fotos tomadas de los tumores recién extraídos de los ratones a las 11 semanas se hizo una binarización y un análisis de imágenes con el software Image J 4.13 para evaluar la circularidad de los tumores.

4.3.4 Expresión de marcadores de angiogénesis, proliferación, muerte celular y transición epitelio mesénquima en los tumores formados a partir de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂

Los cortes histológicos se hidrataron como se describe en el punto anterior, sumergidos en un contenedor coplin con solución DIVA y se llevaron a 100°C por 30 min para la recuperación antigénica. Una vez que las muestras estaban a temperatura ambiente, se permeabilizaron con PBS-tritón 0.5% frío, casi al punto de congelación y lavadas 3 veces con PBS por 5 min para después ser bloqueadas con PBS-BSA al 1% por 1 h a temperatura ambiente. La actividad de las peroxidasas endógenas se descartó mediante la incubación de los cortes histológicos con 3% de H₂O₂ en metanol por 30 min. Posteriormente se enjuagaron 3 veces con PBS por 5 min y se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Para evaluar la angiogénesis se utilizó el anticuerpo anti-HIF-1α 1:300

(Santa Cruz 146), para evaluar proliferación se utilizó anti- Ki67 1:500 (BioLegend 652402), para evaluar muerte celular se utilizó caspasa 3 1:500 (BioLegend 622702) y para evaluar transición epitelio mesénquima se utilizaron los anticuerpos anti-TGF- β , anti-E-cadherina, anti-vimentina y anti-N-cadherina (1:300 Santa Cruz H206; 1:600 Biolegend 324102; 1:500 Santa Cruz 7558, 1:500 BioLegend, 652402, respectivamente). Una vez incubados con el anticuerpo primario, las laminillas con los cortes histológicos se lavaron 3 veces con PBS por 5 min a temperatura ambiente y luego se incubaron con el anticuerpo secundario. Para la detección de TGF- β y E-cadherina las laminillas se incubaron con el anticuerpo acoplado a TRITC (1:600 Jackson 111-025-003) y las muestras de vimentina con el anticuerpo acoplado a FITC (1:600 Jackson 115-095-003) durante 2 h a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, se enjuagaron 3 veces con PBS por 5 min y se observaron en el microscopio confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación. La cuantificación de la fluorescencia se determinó con el software del microscopio confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) y los datos se expresan como media \pm error estándar. Para el caso de N-cadherina, después del primer anticuerpo las laminillas se enjuagaron 3 veces con PBS por 5 min a temperatura ambiente y se incubaron con un anticuerpo acoplado a una HRP 1:1000 durante 2 h a temperatura ambiente, nuevamente se enjuagaron 3 veces con PBS por 5 min a temperatura ambiente y se revelaron con una solución de diaminobencidina y H₂O₂ al 3%, se contratiñeron con hematoxilina durante 30 seg y se observaron con microscopía de campo claro en el microscopio confocal Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación. También se realizó una semi-cuantificación de la expresión de N-cadherina con el software del microscopio confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) y los datos se expresan como media \pm error estándar.

4.3.5 Cuantificación del contenido de colágeno en los tumores formados a partir de células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂

Para detectar el contenido de colágeno en los tumores se realizó una tricrómica de Masson, para ello los cortes histológicos de 3 μ m de los tumores se sumergieron en solución de Bouin por 3 días en la oscuridad. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina de Weigert y rojo escarlata por 10 min cada uno a temperatura ambiente para teñir núcleos y tejido queratinizado, respectivamente. Para teñir el tejido conectivo laxo y denso primero las laminillas se sumergieron en una solución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotúngstico 1:1 durante 10 min y luego se tiñeron con azul de anilina por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente los tejidos se deshidrataron y se montaron para observarlos en el microscopio óptico. Las fotografías se tomaron con campo claro a 40X y 100X de magnificación (Carl

Zeiss, Alemania). Por otro lado, se cuantificó el área teñida de azul mediante análisis de imágenes con el software ImageJ 4.13, que correspondería al contenido de colágeno principalmente. Se analizaron 3 fotografías de cada ratón y al menos 3 ratones de cada tratamiento.

Para determinar de manera más específica el contenido de colágeno en las histologías se realizó una inmunohistoquímica hidratando los tejidos como se describió previamente, incubando con el anticuerpo primario anti-colágeno I (1:500 BioLegend, 652402) durante toda la noche a 4°C y con el anticuerpo secundario acoplado a HRP 1:1000 durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras se enjuagaron con PBS 3 veces con PBS por 5 min a temperatura ambiente y se revelaron con una solución de diaminobencidina y H₂O₂ al 3%, se contratiñeron con hematoxilina durante 30 seg y se observaron con microscopía de campo claro en el microscopio confocal Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación.

4.4 Diferencias en el ciclo celular y la sensibilidad a cisplatino entre el modelo de cultivo *in vitro* y el modelo de tumores por xenotrasplante

Se determinó el porcentaje de células que había en cada fase del ciclo celular (G₁, S, G₂/M) tanto en células expuestas a nanofibras de TiO₂ en el cultivo *in vivo* como en células aisladas de los tumores que estuvieron en crecimiento durante 11 semanas en el modelo de xenotrasplante.

Para arrestar las células en la fase G₁, el medio suplementado con 10% de SFB de los cultivos *in vitro*, se reemplazó en el día 7 de exposición a nanofibras de TiO₂ por medio F12K y las células se incubaron por 24 h (Nakhjavani et al., 2016). Posteriormente, las células se cosecharon con PBS-EDTA 0.5 mM por 5 min a 37°C y fijadas con alcohol al 70% filtrado y frío y se dejaron por 24 h a 4°C.

Se extrajeron los tumores formados a partir de células control y de células expuestas a 1 y 10 µg/cm² a las 11 semanas de desarrollo y se tomó un pequeño fragmento de los tumores que se colocó en una caja Petri de 58 cm² con 10 mL de medio F12K suplementado con 10% de SFB y 5% de penicilina/estreptomicina. El pequeño fragmento de tumor fue seccionado múltiples veces con una hoja de bisturí número 10 estéril hasta obtener fragmentos de entre 4 y 5 mm y la caja se incubó en una atmósfera de humedad al 95% y 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C por 48 h días. Después, el medio de cultivo de las cajas Petri se reemplazó por medio F12K sin SFB arrestar las células en la fase G₁ y las cajas se incubaron por 24 h más. Al día 7 se cosecharon las células con PBS-EDTA 0.5 mM por 5 min a 37°C y se fijaron con alcohol al 70% filtrado y frío y se dejaron por 24 h a 4°C.

Las células provenientes de ambos modelos, una vez que pasaron 24 h en alcohol al 70% a 4°C, se enjuagaron 3 veces con PBS y se centrifugaron a 1 500 rpm a temperatura ambiente. Luego, el DNA de las células se tiñó con la siguiente solución: En 10 mL de PBS-tritón 0.1% se añadieron 2 mg de RNAsa libre de DNAsa (Sigma-Aldrich, 9001-99-4) y 50 mg/mL de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, 25535-16-4).

Se incubaron con 1 mL de esa solución a temperatura ambiente bajo la oscuridad y en movimiento por 30 min. Luego, se enjuagaron 3 veces con PBS y la cantidad de DNA de 10,000 células se cuantificó por medio de citometría de flujo (FACScalibur cytometer). Se realizaron al menos tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error.

Por otro lado, estas mismas células, tanto las expuestas a nanofibras de TiO₂ en el cultivo *in vivo* como las aisladas de los tumores, se trataron con cisplatino para evaluar su sensibilidad. Se sembraron 10 000 células por pozo en una placa de 96 pozos y se incubaron las células por 24 h. Después, las células se trataron con 0, 25, 50, 75 y 100 μ M de cisplatino por 24 h y posteriormente se les realizó un ensayo de reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para determinar la viabilidad y la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀). Para el ensayo de reducción del MTT, se retiró el medio de cultivo y se enjuagaron los pozos con PBS, para luego agregar 100 μ L de medio F12K con 0.5 mg/mL de MTT. Las placas se incubaron a 37°C por 2 h. El sobrenadante se retiró y los cristales de formazán que quedan en el fondo del pozo y que son insolubles en agua se disolvieron con 150 μ L de isopropanol y el contenido de cada pozo se centrifugó a 1 500 rpm para evitar que las nanofibras de TiO₂ interfirieran con la densidad óptica. Una vez centrifugadas las muestras se colocaron en una placa de 96 pozos de nuevo y se leyeron a 540 nm. Se realizaron al menos tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

4.5 Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y se realizó una prueba de Dunnet para determinar diferencias entre las medias. El ciclo celular así como la sensibilidad a cisplatino se evaluó con ANOVA de dos factores. Se consideró el valor de $p < 0.05$ para señalar las diferencias significativas. Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar y las gráficas se realizaron el programa GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS

5.1 Modelo *in vitro*

5.1.1 Caracterización de las nanofibras de TiO₂

Después de realizar la síntesis se determinó la forma y el tamaño del producto por medio de SEM. Se observó que el producto tenía forma de nanofibras (Figura 9A) de un tamaño de $3.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ de largo por $61.5 \pm 4.9 \text{ nm}$. Cuando las nanofibras de TiO₂ se resuspendieron en medio F12K suplementado con 10% de SFB el tamaño hidrodinámico de las nanofibras fue de $249.5 \pm 12.8 \text{ nm}$ (Figura 9B). Además se determinó que la fase cristalina no hubiera cambiado de anatasa a rutilo debido a las condiciones de temperatura y presión de la síntesis por medio de espectroscopia Raman la cual presentó un patrón típico de la fase anatasa (Figura 9C). En la tabla 3 se resumen las características más importantes de las nanofibras de TiO₂ como el largo y ancho de las fibras, el tamaño de los aglomerados por dispersión dinámica de luz y potencial Z.

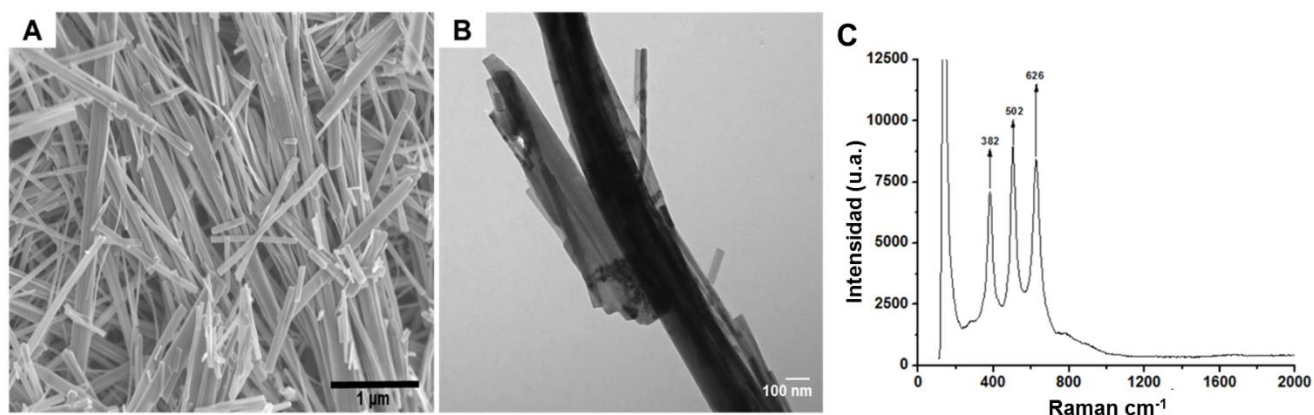


Figura 9. Caracterización de las nanofibras de TiO₂. (A) Morfología de las partículas primarias por medio de microscopía electrónica de barrido. (B) Forma y tamaño de los aglomerados de las nanofibras de TiO₂ suspendidas en medio F12K suplementado con 10% de SFB. (C) Fase cristalina con un arreglo atómico de anatasa del TiO₂ mediante espectroscopia Raman.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las nanofibras de TiO₂

Muestra	Longitud promedio (μm)	Ancho promedio (nm)	Cristalinidad	Tamaño de aglomerado (nm)	Potencial Z (mV)
Nanofibras de TiO ₂	3.1 ± 0.2	61.5 ± 4.9	Anatasa	249.5 ± 12.82	-27.17 ± 3.72

5.1.2 Las nanofibras de TiO₂ son internalizadas por las células epiteliales de pulmón sin modificar la morfología celular

Se determinó si las células epiteliales de pulmón utilizadas en este proyecto, que cabe mencionar que son neumocitos tipo II, cuya principal función es exocitar el surfactante por medio de los cuerpos lamelares, tenían la capacidad de internalizar las nanofibras de TiO₂. La ultraestructura celular fotografiada mediante TEM hace evidentes los organelos celulares tales como núcleo, mitocondrias, retículo endoplásmico, vesículas, cuerpos lamelares, gotas lipídicas y además revela que las nanofibras de TiO₂ se encuentran en el citoplasma, localizadas en vesículas y generalmente acompañadas de cuerpos lamelares (Figura 10A). Por otro lado, se observó que la morfología celular no se altera debido a la internalización de las nanofibras (Figura 10B y C) y la tinción con hematoxilina y eosina así como la microscopía de contraste interdiferencial permitieron también observar el depósito de nanofibras de TiO₂ en el citoplasma celular y alrededor del núcleo, fortaleciendo así el hecho de que las células epiteliales de pulmón internalizan las nanofibras de TiO₂ (Figura 10B y C).

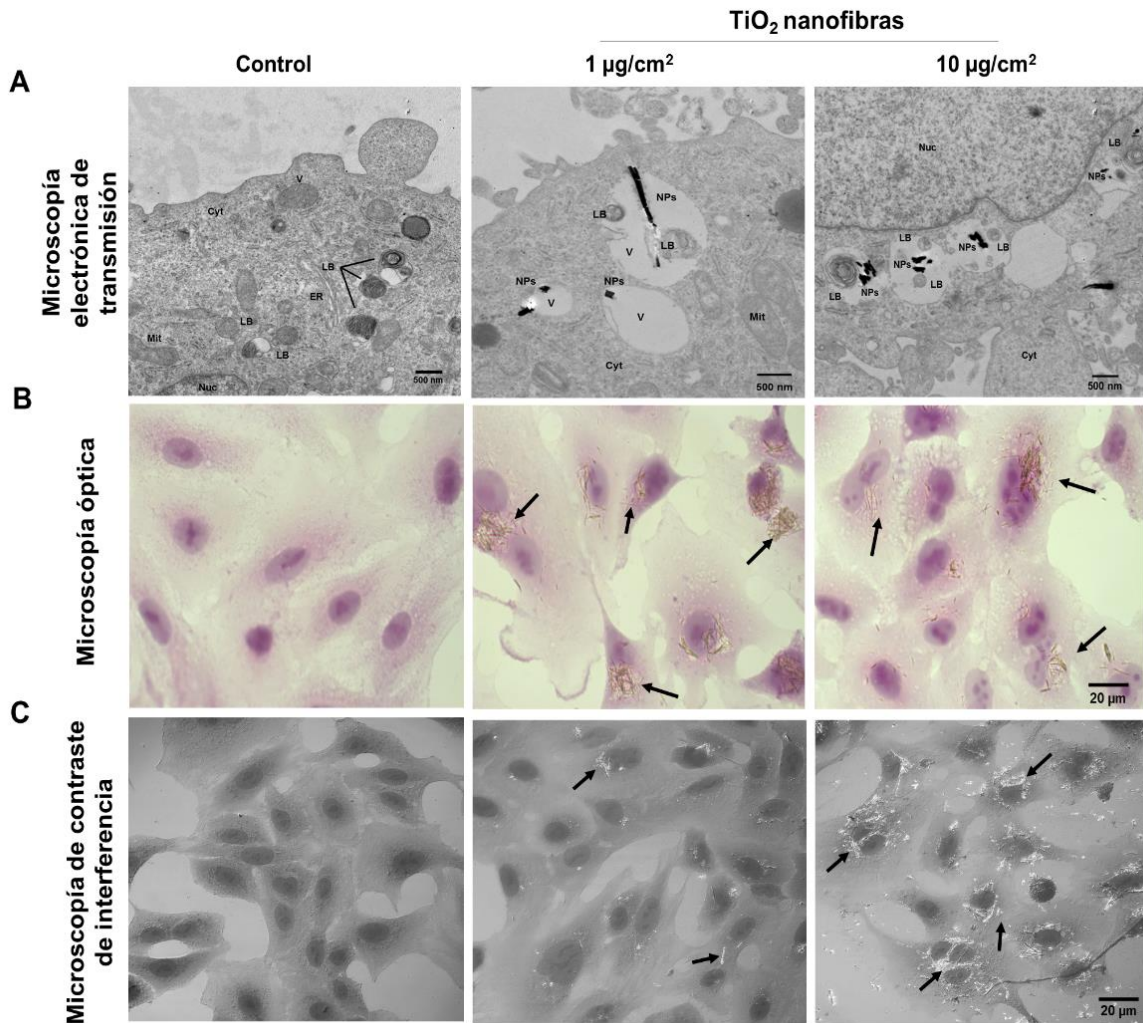


Figura 10. Internalización de las nanofibras de TiO₂ después de 7 días de exposición. (A) Ultraestructura de las células control y las células expuestas a nanofibras de TiO₂, donde se hace evidente que las nanofibras están en vesículas y rodeadas de cuerpos lamelares, por microscopía electrónica de transmisión (B) Morfología celular por tinción de hematoxilina y eosina. (C) Morfología celular e internalización de nanofibras de TiO₂ después por microscopía de contraste interdifereencial. Las flechas señalan la internalización de las nanofibras de TiO₂ después. Cyt: cytoplasm, ER: endoplasmic reticulum, LB: lamellar body, Mit: mitochondria, NPs: nanoparticles, Nuc: nucleus, V: vesicles. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes.

5.1.3 La exposición a nanofibras de TiO₂ induce liberación de LDH como marcador de citotoxicidad y la disminución de Ki67 como marcador de proliferación

Después de los 7 días de exposición a nanofibras de TiO₂, las células expuestas a 1 µg/cm² incrementaron 22±2.9% la concentración de LDH liberada mientras que las expuestas a 10 µg/cm² liberaron 48±7.9% más LDH que las células control (Figura 11A). El gen MKi67, que codifica para la proteína Ki67 no presentó cambios en la expresión a nivel de mensajero mientras que la proteína presenta una ligera disminución en el tratamiento con 10 µg/cm² de nanofibras de TiO₂ (Figura 11B y C). La cuantificación de la proteína mostró una disminución del 17.8% en la expresión de la proteína Ki67 en el tratamiento con 10 µg/cm² comparado con el control (Figura 11D).

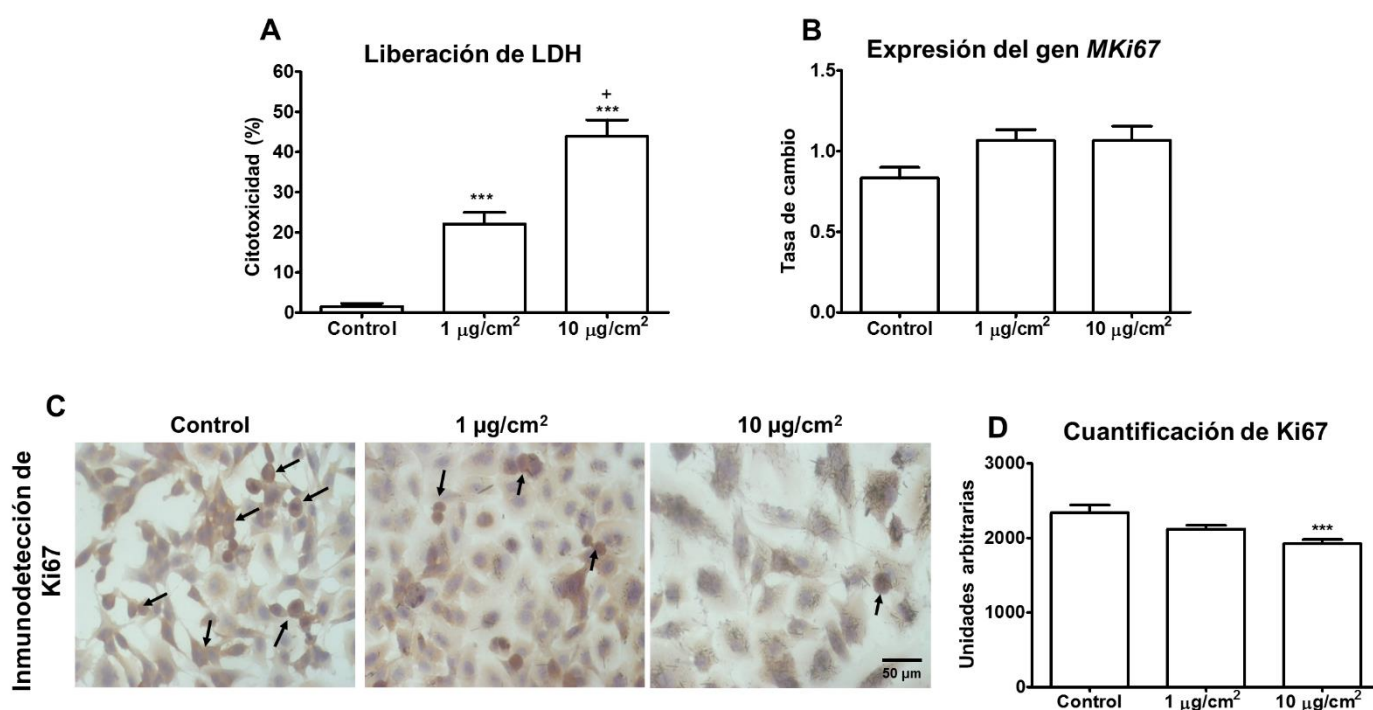


Figura 11. Toxicidad celular inducida por la exposición a nanofibras de TiO₂. (A) liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de las últimas 24 h de exposición de los cultivos celulares. (B) Expresión del gen MKi67 como marcador de proliferación por RT-PCR. (C) Expresión de la proteína Ki67 por inmunocitoquímica (la expresión se presenta en color café). (D) Cuantificación de las áreas positivas para Ki67 con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. *p<0.05 vs control, ***p<0.001 vs control, +p<0.05 vs 1 µg/cm² de nanofibras de TiO₂. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar.

5.1.4 Células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂ sobreexpresan marcadores de angiogénesis

La expresión de la proteína HIF-1 α en las células control se encuentra de manera perinuclear mientras que en las células expuestas a las nanofibras de TiO₂ se encuentra también dentro del núcleo (Figura 12A). Se cuantificó la expresión de HIF-1 α después de los 7 días de exposición a las nanofibras de TiO₂ y el control presentó 883.8 \pm 83.2 U.A. mientras que los tratamientos de 1 y 10 μ g/cm² tuvieron 1505 \pm 57 y 1456 \pm 50.9 U.A (Figura 12B).

Por otro lado, se determinó si la expresión de HIF-1 α se localizaba en el núcleo por medio del traslapamiento entre el colorante del núcleo (Hoescht) y la expresión de la proteína. La cuantificación de la colocalización confirma lo que se ve en las imágenes, ya que en el control hay una colocalización del 5.6 \pm 0.8% mientras que en el tratamiento de 1 μ g/cm² hay una colocalización del 31.8 \pm 3.6% y en el tratamiento de 10 μ g/cm² hay una colocalización del 50.5 \pm 5.6% (Figura 12C).

Además, se cuantificó la expresión de los genes HIF-1 α y VEGF y se observó que la expresión de ambos estaba incrementada en células que habían sido expuestas a las nanofibras de TiO₂ (Figura 12D y F). En la cuantificación se observa una tasa de cambio de 0.7 \pm 0.05 en el control a 0.9 \pm 0.02 en el tratamiento de 1 μ g/cm² y a 1.3 \pm 0.08 en el tratamiento de 10 μ g/cm² para el gen de HIF-1 α (Figura 12E) mientras que para el gen de VEGF la tasa de cambio fue de 0.8 \pm 0.02 en el control a 1.0 \pm 0.05 y 1.1 \pm 0.07 en los tratamientos de 1 y 10 μ g/cm², respectivamente (Figura 12G).

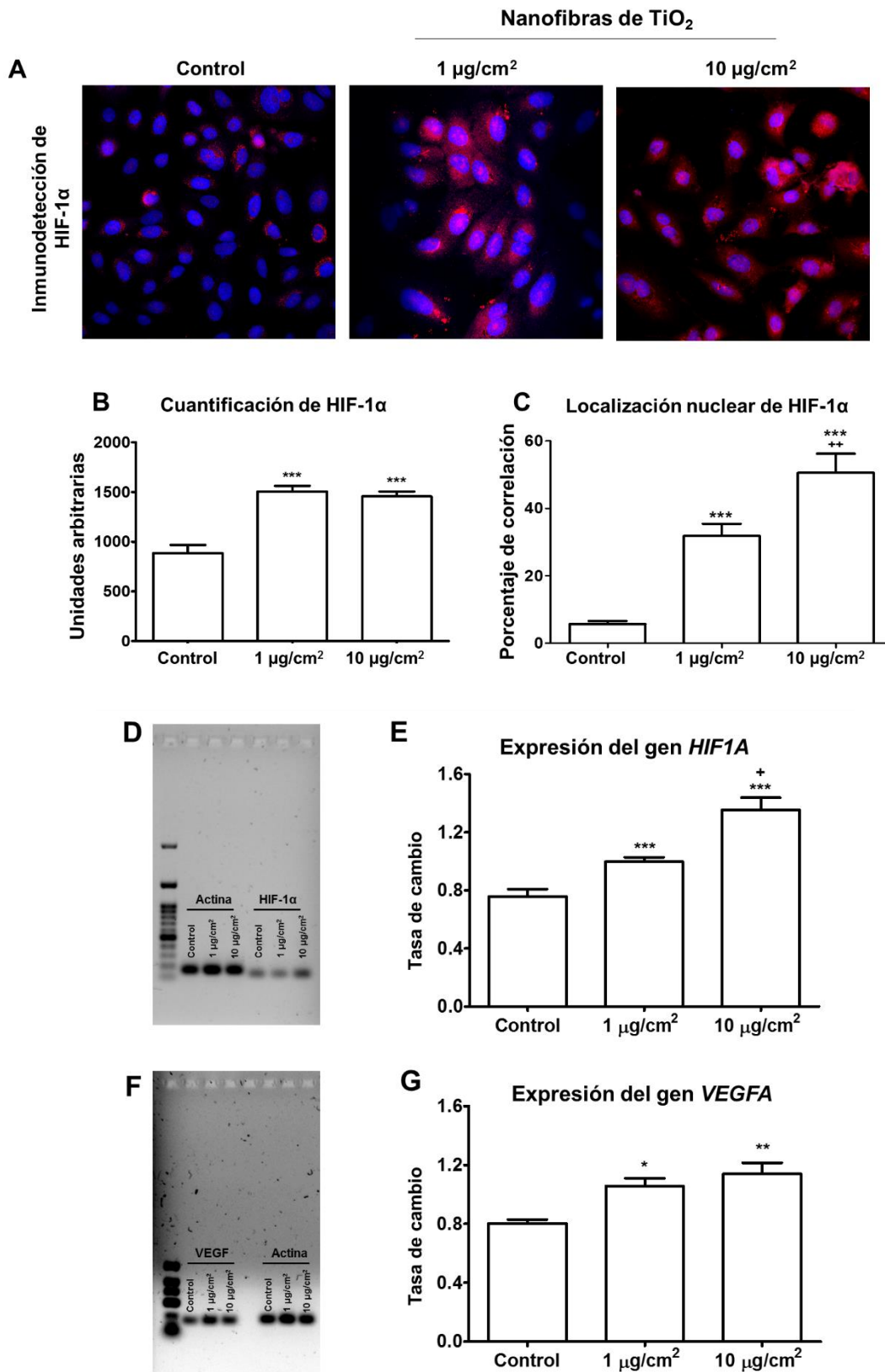


Figura 12. Sobreexpresión de marcadores angiogénicos después de la exposición a nanofibras de TiO₂. (A) Expresión de la proteína HIF-1 α detectada por inmunofluorescencia (rojo) y tinción del núcleo (azul). (B) Cuantificación de la fluorescencia de HIF-1 α y (C) la colocalización nuclear de la expresión

de HIF-1 α con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. (D) Expresión de los genes HIF-1 α y F) VEGF así como del gen de actina como control de carga por RT-PCR. (E) La cuantificación de la expresión de los genes HIF-1 α y G) VEGF por ImageJ. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs control, *** $p < 0.001$ vs control, + $p < 0.05$ vs. 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO₂, +++ $p < 0.001$ vs. 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO₂. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar de

5.1.5 La exposición a nanofibras de TiO₂ induce sobreexpresión de marcadores profibróticos en células epiteliales de pulmón

TGF- β es conocido por ser uno de los principales reguladores del inicio de la transición epitelio mesénquima, proceso que se caracteriza por iniciar con la expresión de marcadores asociados a la fibrosis. Para saber si la exposición a nanofibras de TiO₂ inducía transición epitelio mesénquima medimos la expresión de TGF- β , N-cadherina y la concentración de hidroxiprolina que es el principal aminoácido para la síntesis de colágeno que también se asocia con la transición epitelio mesénquima y la fibrosis. La expresión de TGF- β aumenta en los tratamientos de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ después de 7 días de exposición (Figura 13A) y en la cuantificación se observa que el control tuvo 639.5 \pm 109.9 U.A. mientras que el tratamiento de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentó 1363 \pm 106.6 U.A. y el tratamiento de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ tuvo 1243 \pm 38.3 U.A. (Figura 13B). Por otro lado, N-cadherina que es una molécula de adhesión y que se sobreexpresa en células que están en proceso de transición epitelio mesénquima también incrementó ligeramente en las células expuestas a nanofibras de TiO₂ durante 7 días (Figura 13C), ya que la expresión del control fue de 3117 \pm 56.7 U.A. mientras que en los tratamientos la expresión subió a 3587 \pm 33.9 U.A y 3679 \pm 33.81 U.A. para 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente (Figura 13D).

La concentración de la hidroxiprolina intracelular también incrementó en los tratamientos de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ya que el control tuvo una molaridad de 2.3 \pm 0.6 μM mientras que los tratamientos de tuvieron 5.5 \pm 1.1 y 9.9 \pm 1.3 μM , respectivamente (Figura 14).

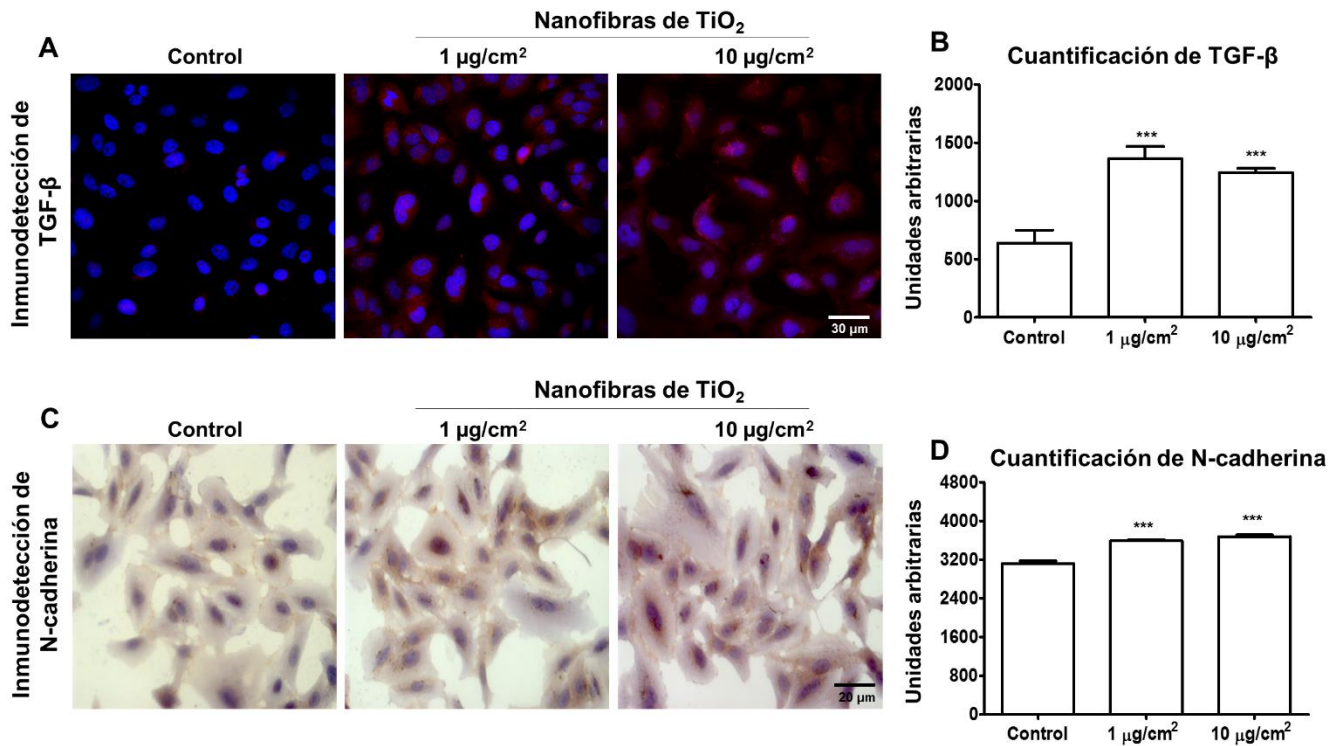


Figura 13. Sobreexpresión de TGF- β y N-cadherina como marcadores de transición epitelio mesénquima después de la exposición a nanofibras de TiO₂. (A) Expresión de la proteína TGF- β detectada por inmunofluorescencia (rojo) y tinción del núcleo (azul). (B) Cuantificación de la fluorescencia de TGF- β con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. (C) Expresión la proteína N-cadherina detectada por inmunocitoquímica y (D) la cuantificación de la expresión de N-cadherina con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs control, *** $p < 0.001$ vs control, +++ $p < 0.001$ vs. 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO₂. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

Cuantificación de hidroxiprolina

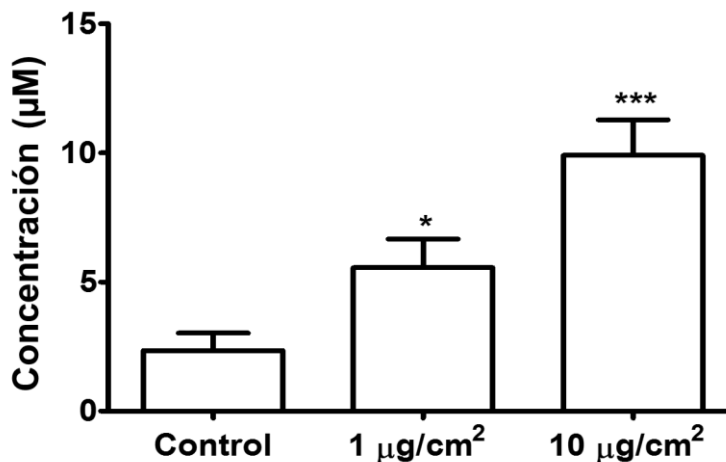
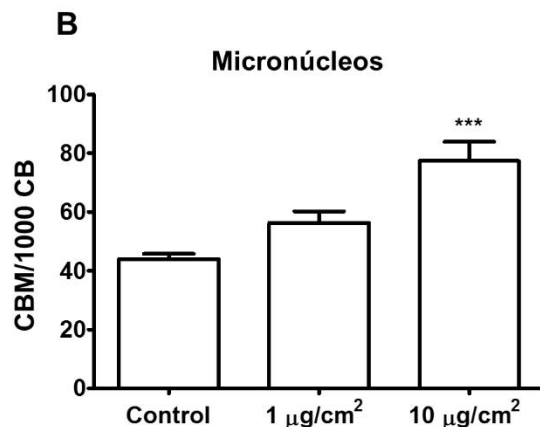
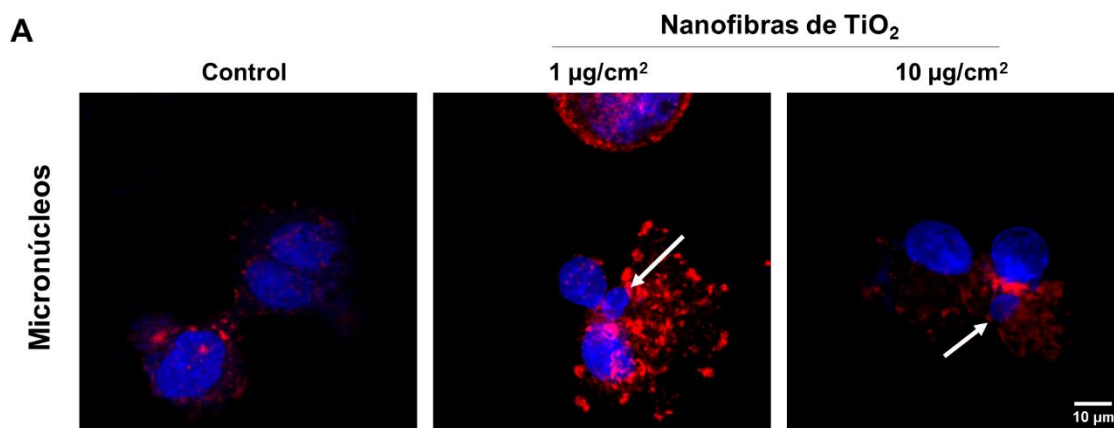


Figura 14. Concentración intracelular de hidroxiprolina como marcador profibrótico después de la exposición a nanofibras de TiO₂. Las células fueron lisadas con HCl 12 M y se realizó la cuantificación de hidroxiprolina. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs control. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

5.1.6 La inestabilidad genómica incrementa en células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras de TiO₂

Para determinar la inestabilidad genómica se realizó el ensayo de micronúcleos en donde además de los micronúcleos se cuantificó el número de células trinucleadas y tetranucleadas (Figura 15A y C). De cada mil células binucleadas cuantificadas, el control tuvo 44 ± 1.7 células binucleadas con micronúcleos (CBMN) mientras que las células expuestas a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 7 días con nanofibras de TiO₂ mostraron 56 ± 3.8 y 77.3 ± 6.5 CBMN, respectivamente (Figura 15B). Como un hallazgo, se encontró que la frecuencia de células multinucleadas también era mayor que en las células control, que *per se* no son estables genómicamente, por lo que cuantificamos células trinucleadas y células tetranucleadas. De cada mil células cuantificadas, el control presentó 90.1 ± 10.4 células trinucleadas mientras que los tratamientos de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentaron 133.8 ± 3.6 y 147.4 ± 12.8 células trinucleadas, respectivamente (Figura 15D). Similarmente, de cada mil células cuantificadas, las control tenían 50.2 ± 7.0 con tetranúcleo, mientras que las células expuestas a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO₂, tenían 67.8 ± 4.8 y 74.8 ± 6.4 , respectivamente (Figura 15E).



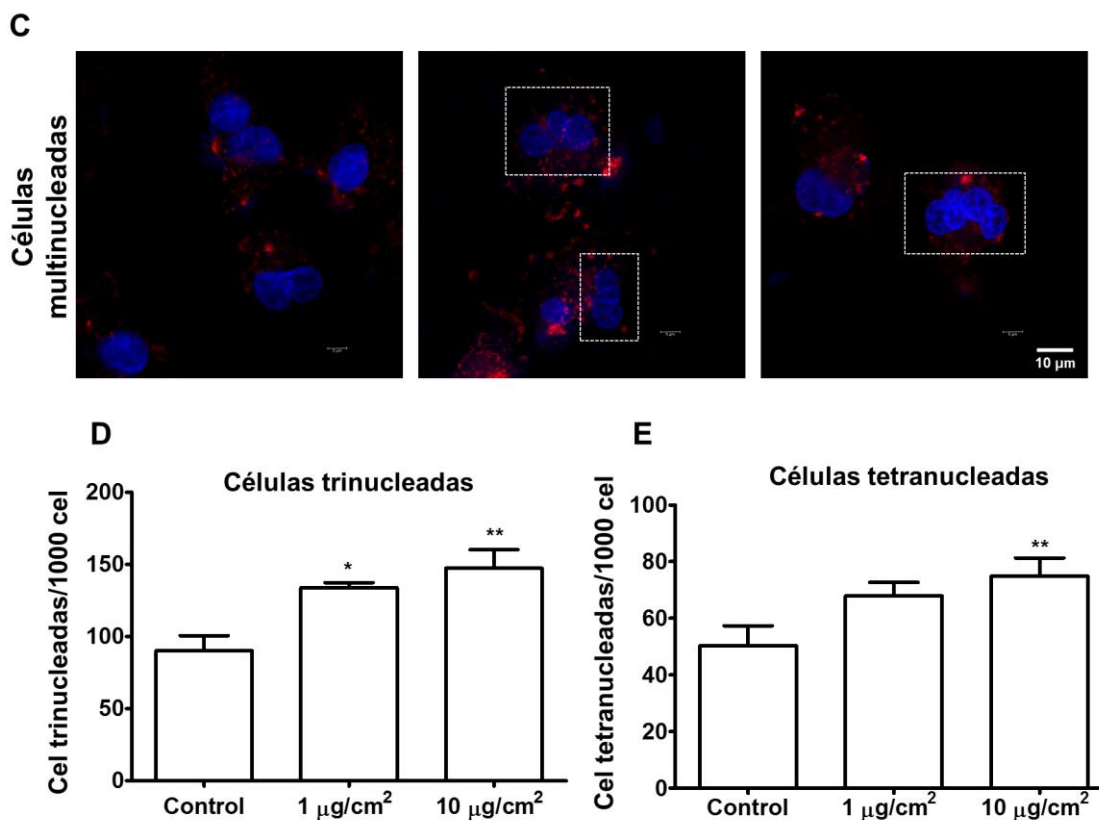


Figura 15. Inestabilidad genómica inducida por la exposición a nanofibras de TiO₂. (A) Formación de micronúcleos (MN) en células binucleadas (CB). El DNA está teñido en azul mientras que en rojo se muestra actina despolimerizada. Las flechas indican los micronúcleos. (B) La frecuencia de células con micronúcleos (CBM) por cada 1000 CB se cuantificó. (C) Imágenes representativas de células multinucleadas. Los recuadros punteadas indican las células con tres o cuatro núcleos. (D) Frecuencia de células trinucleadas y (E) tetranucleadas por cada 1000 células. *p<0.05 vs control, **p<0.01 vs control, ***p<0.001 vs control. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar.

5.2 Modelo de xenotrasplante en ratones inmunosuprimidos

5.2.1 El desarrollo de los tumores no modifica el consumo de alimento, agua o peso de los ratones

Después de los 7 días de exposición a 1 y 10 µg/cm², se inyectaron las células en la subdermis de los ratones y durante las 11 semanas del desarrollo de los tumores se monitoreo el consumo de comida, agua y el peso de los ratones. Ninguno de estos parámetros reveló ningún cambio en ninguno de los tratamientos (Figura 16A y C). Además, se monitoreo el tamaño de los tumores semanalmente y se calculó el volumen de los mismos, sin embargo tampoco se encontraron diferencias entre los tratamientos (Figura 16D).

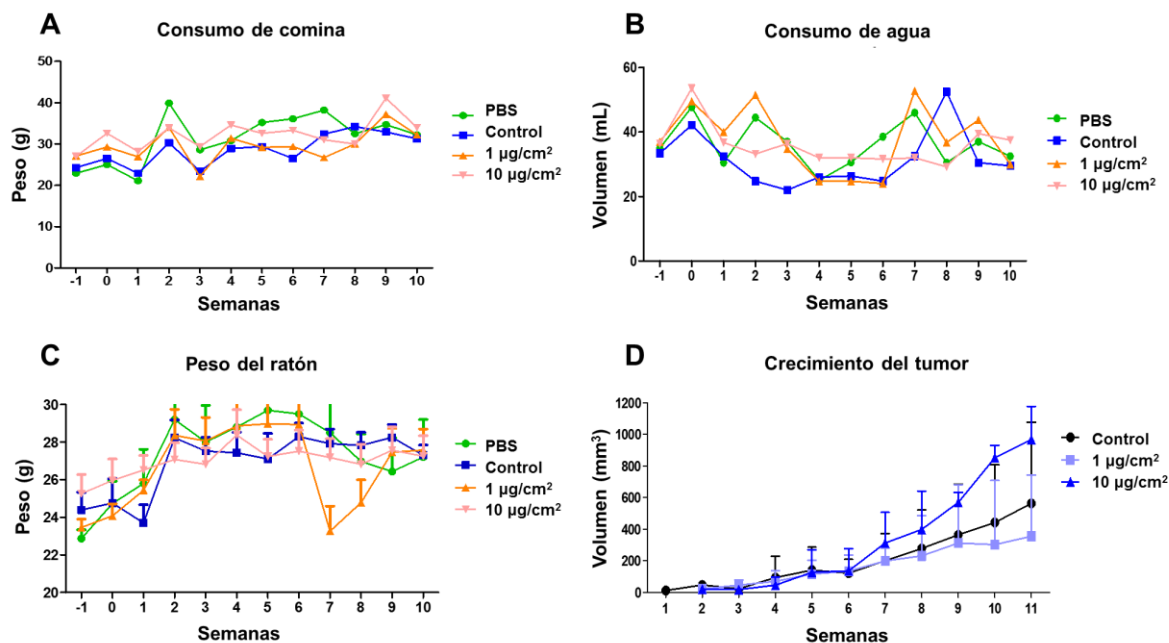


Figura 16. Monitoreo de los ratones durante las 11 semanas del desarrollo de los tumores. A) El consumo de alimento, B) consumo de agua, C) peso de los ratones y D) crecimiento de los tumores se midió durante 11 semanas. Ningún parámetro mostró cambios. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

5.2.2 La exposición a nanofibras de TiO₂ induce tumores de forma irregular, con mayor filtración de eritrocitos, desdiferenciación e incrementada expresión de HIF-1 α

Los tumores se fotografiaron después de las 11 semanas de desarrollo y mostraron una media de entre 1.2 y 1.8 cm de largo (Figura 17A). Además, una vez extraídos los tumores se volvieron a fotografiar y se observó que los tumores desarrollados a partir de células epiteliales de pulmón mostraban mayor irregularidad (Figura 17B). Las imágenes se binarizaron para analizar la irregularidad de los tumores (Figura 17C) y dicho análisis revela un índice de circularidad de 0.84 ± 0.00 mientras que el tratamiento de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentó una circularidad de 0.73 ± 0.01 y el tratamiento de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentó un índice de circularidad de 0.79 ± 0.01 (Figura 17D).

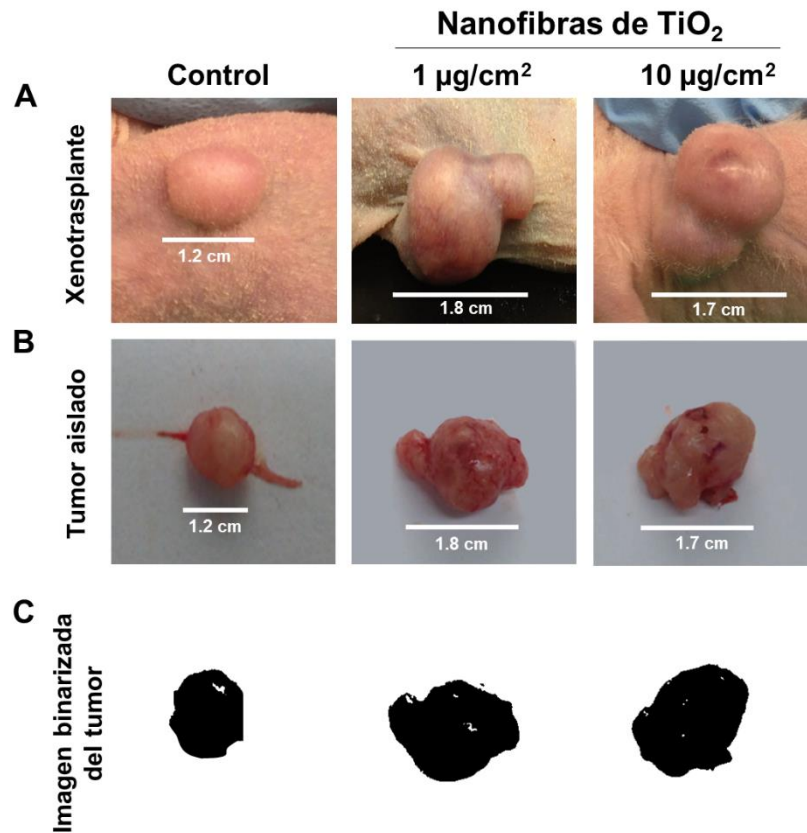


Figura 17. Imágenes representativas de los ratones con tumores formados por xenotrasplante. (A) Tumores formados durante 11 semanas por células sin exposición y con exposición a 1 y 10 µg/cm² de nanofibras de TiO₂. (B) Tumores aislados después del sacrificio e (C) imágenes binarizadas donde se observa la forma irregular de los tumores.

Por otro lado, se realizaron histologías de los tumores y el control mostró un adenocarcinoma moderadamente diferenciado, constituido por mantos de células neoplásicas poligonales y con presencia de estructuras glandulares bien formadas (Figura 18A) mientras que la histología de los tumores formados de células expuestas a 1 µg/cm² tuvo menor grado de diferenciación, manifestado por mantos de grandes células poligonales, muchos de ellos con un gran núcleo hiper cromático atípico alternado con áreas de células cuboidales más pequeñas (Figura 18A). La histología de los tumores formados de células expuestas a 10 µg/cm² tuvo incluso menos diferenciación ya que presentaba áreas focales de células sarcomatoides fusiformes (Figura 18A). También, en las histologías se pudo observar una mayor infiltración de eritrocitos en los tratamientos de 1 y 10 µg/cm² por lo cual se decidió cuantificarlos por cada campo de las laminillas. La histología de los tumores de células control mostraba 14±0.5 eritrocitos por campo mientras que los tratamientos de 1 y 10 µg/cm² mostraban 56±0.9 y 36±1.2 eritrocitos por campo (Figura 18B).

Una vez observado el incremento en la infiltración de eritrocitos, pensamos que podía estar relacionado a una mayor irrigación de los tumores mediante el proceso de angiogénesis y cuantificamos la expresión de HIF-1 α , que es un marcador inicial de angiogénesis. Observamos que la expresión de HIF-1 α aumentaba en los tumores de células expuestas a nanofibras de TiO₂ (Figura 18C). El control mostró una fluorescencia media de 4.5 \pm 0.2 U.A. mientras que el tratamiento de 1 μ g/cm² tuvo 11.5 \pm 0.87 U.A. y el tratamiento de 10 μ g/cm² 28 \pm 1.4 U.A. (Figura 18D).

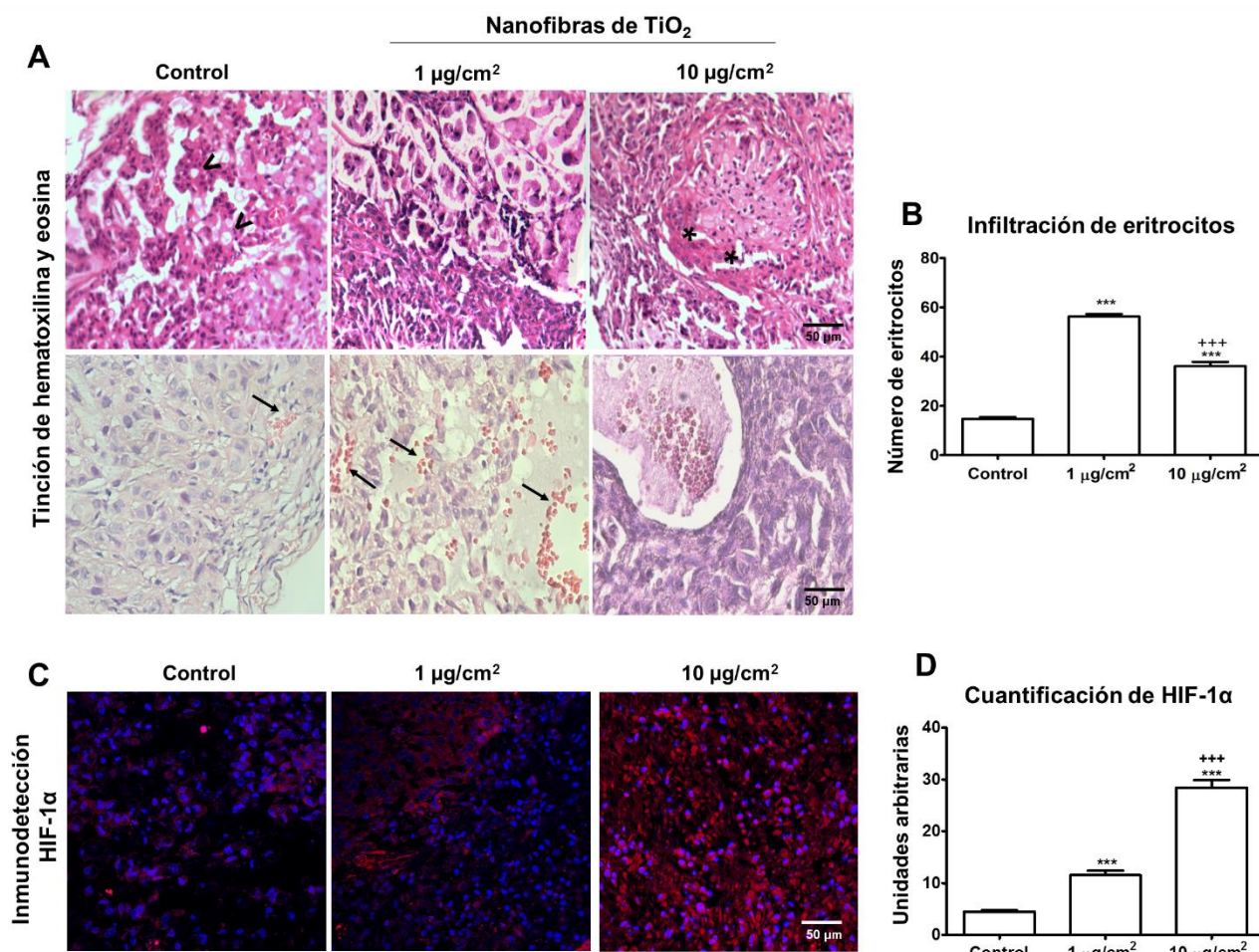


Figura 18. Histología de los tumores, cuantificación de eritrocitos infiltrados y expresión de HIF-1 α como marcador de angiogénesis. (A) El panel superior se presentan los controles con ligera diferenciación de adenocarcinoma indicada por los mantos de células neoplásicas poligonales y ocasionales estructuras glandulares (puntas de flechas). Los tumores de 1 μ g/cm² de nanofibras de TiO₂ tuvieron menor grado de diferenciación indicada por los mantos de células poligonales grandes con núcleos hiper cromáticos que se alternan con áreas de células cuboidales más pequeñas. Los tumores expuestos a 10 μ g/cm² de nanofibras de TiO₂ presentaron incluso un menor grado de diferenciación que se hace evidente por las áreas focales de las células fusiformes sarcomatoides (asteriscos). (B) Infiltración de eritrocitos en los tumores de células expuestas a nanofibras de TiO₂. (C) Expresión de la proteína HIF-1 α en los tumores por medio de inmunofluorescencia (rojo). El núcleo se encuentra teñido de azul. (D) Cuantificación de la fluorescencia de HIF-1 α . ***p<0.001 vs control, +++p<0.001 vs 1 μ g/cm². Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

5.2.3 Las células expuestas a nanofibras de TiO₂ desarrollan tumores con mayor proliferación, menor muerte celular y mayor fibrosis

Después de saber que los tumores presentaban mayor angiogénesis e infiltrado de eritrocitos, quisimos saber si los tumores tenían mayor índice de proliferación ya que los tumores de células que habían sido expuestas a nanofibras de TiO₂ estaban siendo más irrigados. Efectivamente, los tumores de células control presentaban menor expresión de Ki67, que es un marcador de proliferación, que los tumores de células expuestas a nanofibras de TiO₂ (Figura 19A). Se realizó una semicuantificación de la proteína Ki67 en donde los tumores de células controles mostraron una media de 1333±20.7 U.A. mientras que los tumores de células expuestas a TiO₂ presentaron 2074±131.7 U.A. y 2257±54.1 U.A. respectivamente para los tratamientos de 1 y 10 µg/cm² (Figura 19B).

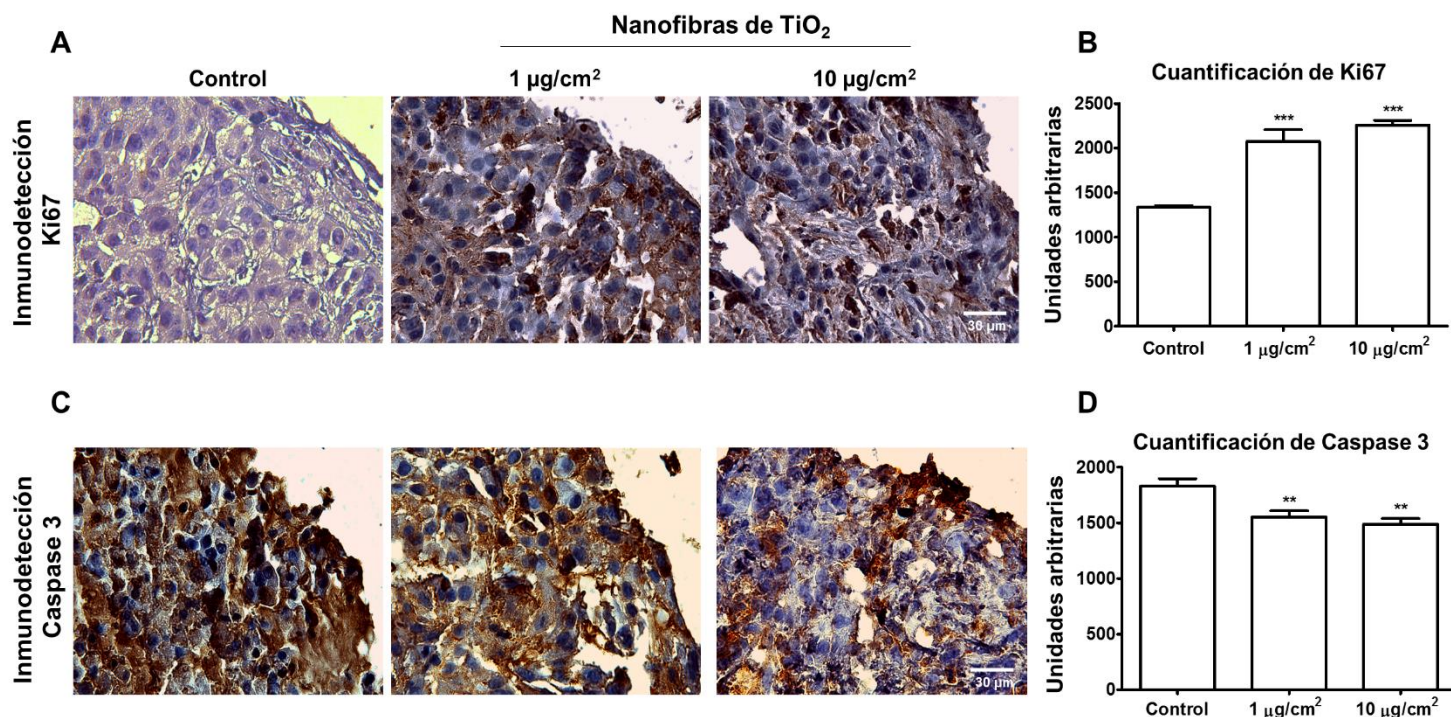


Figura 19. Expresión de Ki67 y caspasa 3 como marcadores de proliferación y muerte celular. (A) Expresión de la proteína Ki67 en los tumores como marcador de proliferación detectada por inmunohistoquímica (la expresión se presenta en color café) y su (B) cuantificación con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. (C) Expresión de la proteína caspasa 3 en los tumores como marcador de muerte celular detectada por inmunohistoquímica (la expresión se presenta en color café) y su (D) cuantificación con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. **p<0.01 vs control, ***p<0.001 vs control. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar.

Por otra parte, se determinó la cantidad de tejido conectivo mediante la tinción de Masson, que en color azul tiñe principalmente fibras de colágeno, el cual es un marcador de fibrosis. La presencia de fibras de colágeno se observa en la periferia de los tumores de células control mientras que estas mismas fibras pueden observarse incluso en áreas más al centro de los tumores de células expuestas a nanofibras de TiO_2 (Figura 20A). El área positiva para fibras de colágeno (es decir el área teñida de azul) se cuantificó y los tumores de células control tuvieron $922 \pm 40 \mu\text{m}^2$ mientras que los tumores de células expuestas a nanofibras de TiO_2 tuvieron un área positiva de $3974 \pm 281 \mu\text{m}^2$ y $7330 \pm 1083 \mu\text{m}^2$ para los tratamientos de 1 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente (Figura 20B).

Para evaluar la cantidad de colágeno de manera más específica se realizó una inmunohistoquímica contra colágeno tipo I y se observó el mismo patrón de localización de las fibras de colágeno que en las tinciones de Masson, es decir, en los tumores de células control las fibras se encuentran en la periferia de los tumores mientras que en los tumores de células expuestas a nanofibras de TiO_2 se localizan un ligeramente más hacia el centro (Figura 20C). Además de la localización, la cantidad de colágeno tipo I incrementa de 1110 ± 39.4 U.A. en los controles a 2161 ± 75.5 U.A y 1959 ± 43.9 U.A. en los tumores de células expuestas a 1 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente (Figura 20D).

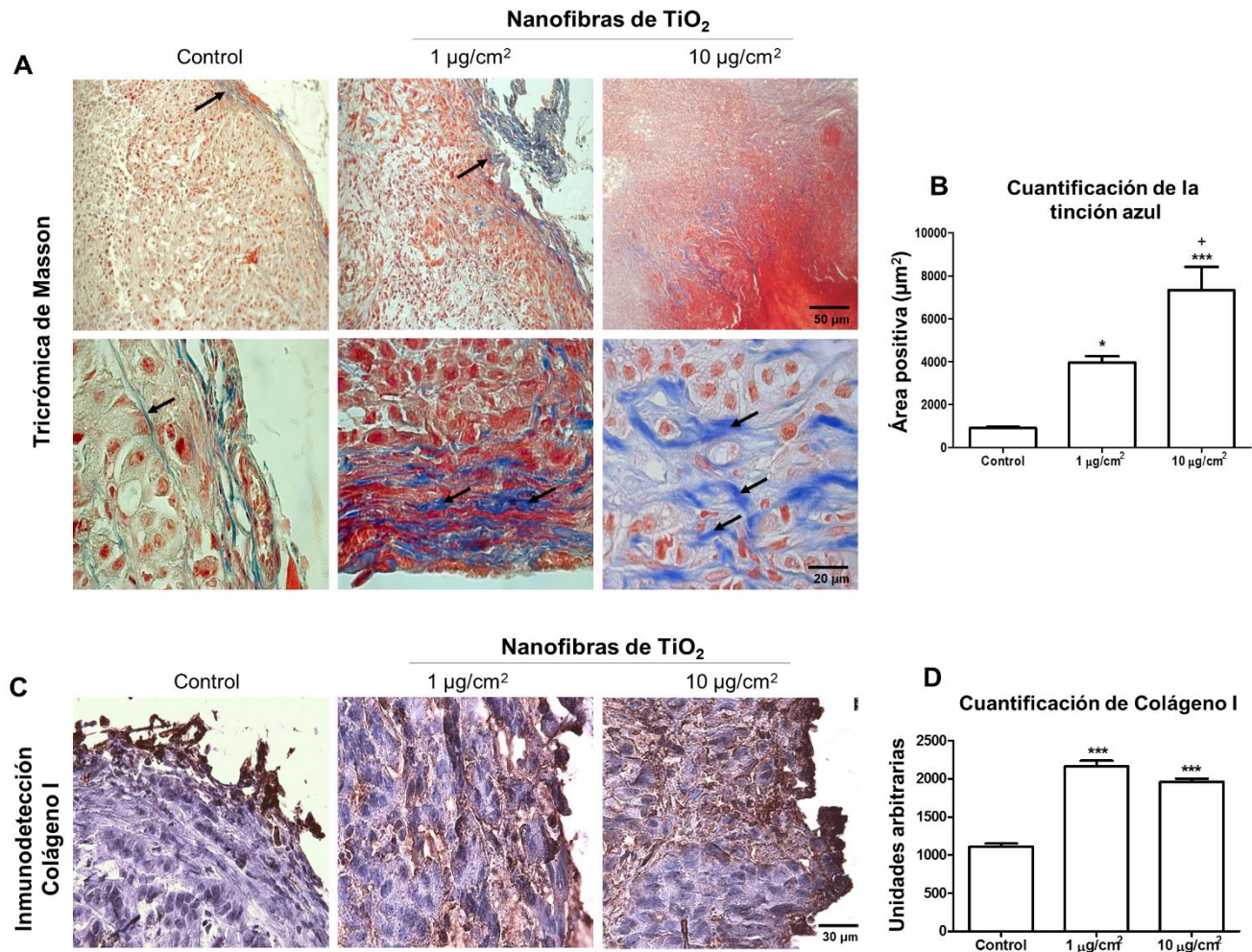


Figura 20. Cuantificación de tejido conectivo y colágeno tipo I como marcadores de fibrosis. (A) Imágenes representativas de la tinción de Masson que muestra en azul el tejido conectivo. (B) Cuantificación del área positiva para la tinción del tejido conectivo con el software ImageJ. (C) Expresión de la proteína colágeno tipo I en los tumores detectada por inmunohistoquímica (la expresión se presenta en color café) y su (D) cuantificación con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. * $p < 0.05$ vs control, *** $p < 0.001$ vs control, + $p < 0.05$ vs 1 µg/cm². Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar.

5.2.4 Los tumores desarrollados a partir de células expuestas a TiO₂ sobreexpresan marcadores de transición epitelio mesénquima

Dado que la transición epitelio mesénquima es uno de los principales mecanismos que conducen a la fibrosis, investigamos si esta transición se encontraba involucrada en el proceso fibrótico. TGF-β que es una proteína desencadenadora de la transición epitelio y mesénquima encontramos que hubo sobreexpresión en los tumores desarrollados a partir

de células expuestas a nanofibras de TiO_2 (Figura 21A) ya que el control tuvo 22.7 ± 0.8 U.A., el tratamiento de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 49.1 ± 2.3 U.A. y el tratamiento de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 46.9 ± 1.7 U.A. (Figura 21B), sugiriendo que podría estar activada la transición epitelio mesénquima. E-cadherina es una proteína de adhesión que en este proceso de transición se pierde, por lo cual la evaluamos y observamos una disminución en los tumores de células que habían sido expuestas a nanofibras de TiO_2 (Figura 21C y D). Por otro lado, la expresión de la proteína vimentina como parte del citoesqueleto en células epiteliales también se ha reconocido como un indicador de iniciación del proceso de transición epitelio mesénquima, sin embargo nosotros no encontramos cambios en su expresión (Figura 21E y F). La expresión de la proteína N-cadherina que es una molécula débil de adhesión célula-célula y que comúnmente incrementa durante la transición epitelio mesénquima, se sobreexpresó en los tumores desarrollados a partir de células expuestas a nanofibras de TiO_2 (Figura 21G). Este incremento fue de $73 \pm 8.7\%$ y $65 \pm 4.2\%$ para los tratamientos de 1 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 , respectivamente (Figura 21H).

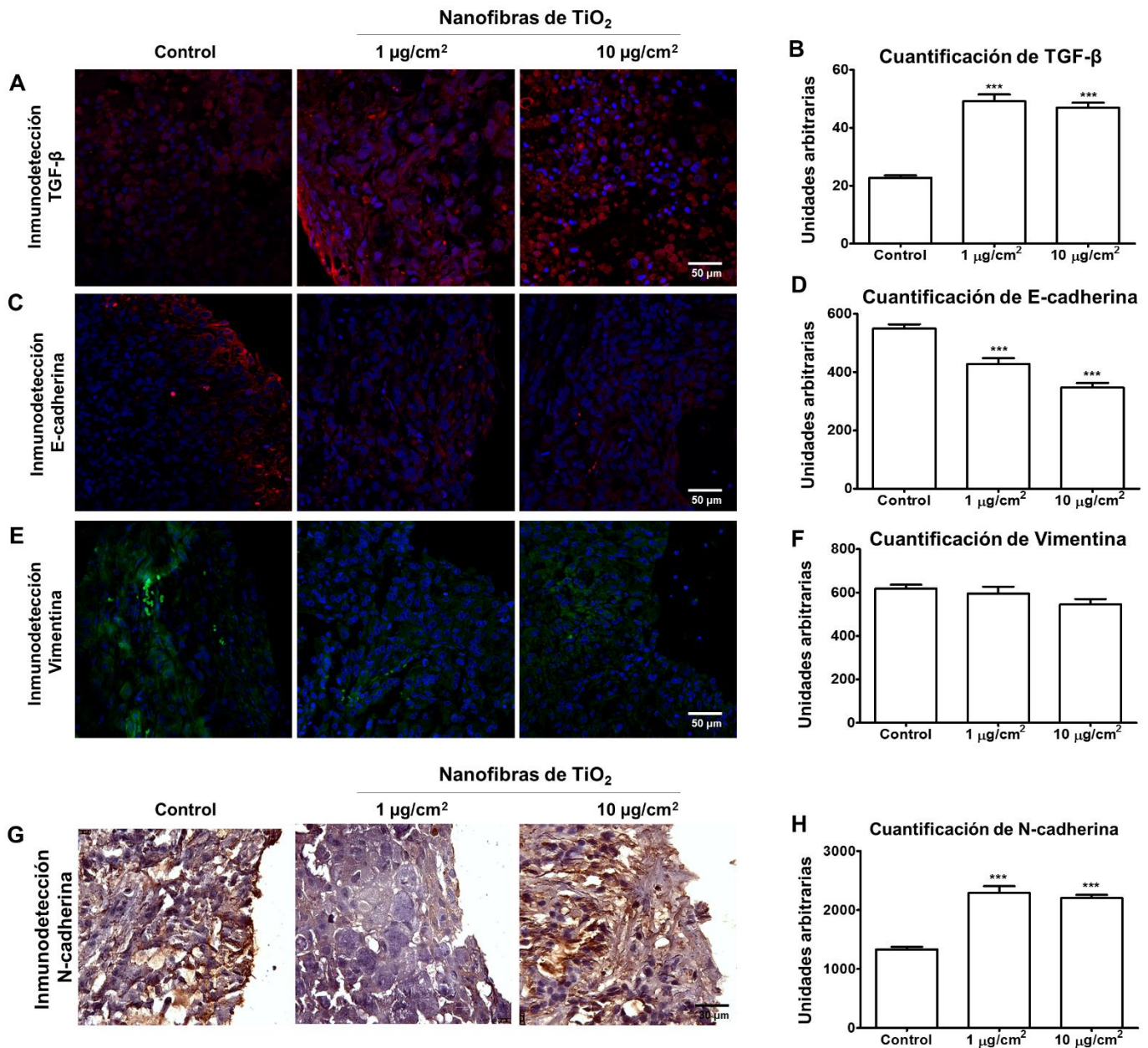


Figura 21. Cuantificación de marcadores de transición epitelio mesénquima en los tumores. (A) Expresión de las proteínas TGF- β (fluorescencia en rojo), (C) E-cadherina (fluorescencia en rojo), (E) vimentina (fluorescencia en verde) en los tumores por medio de inmunofluorescencia los núcleos se encuentran teñidos en azul. (B) La cuantificación de la fluorescencia de TGF- β , (D) E-cadherina y (F) vimentina se realizó con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. (G) Expresión de la proteína N-cadherina en los tumores detectada por inmunohistoquímica (la expresión se presenta en color café) y su (H) cuantificación con el software del microscopio confocal Leica TCS SP8 X. *** $p < 0.001$ vs control. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

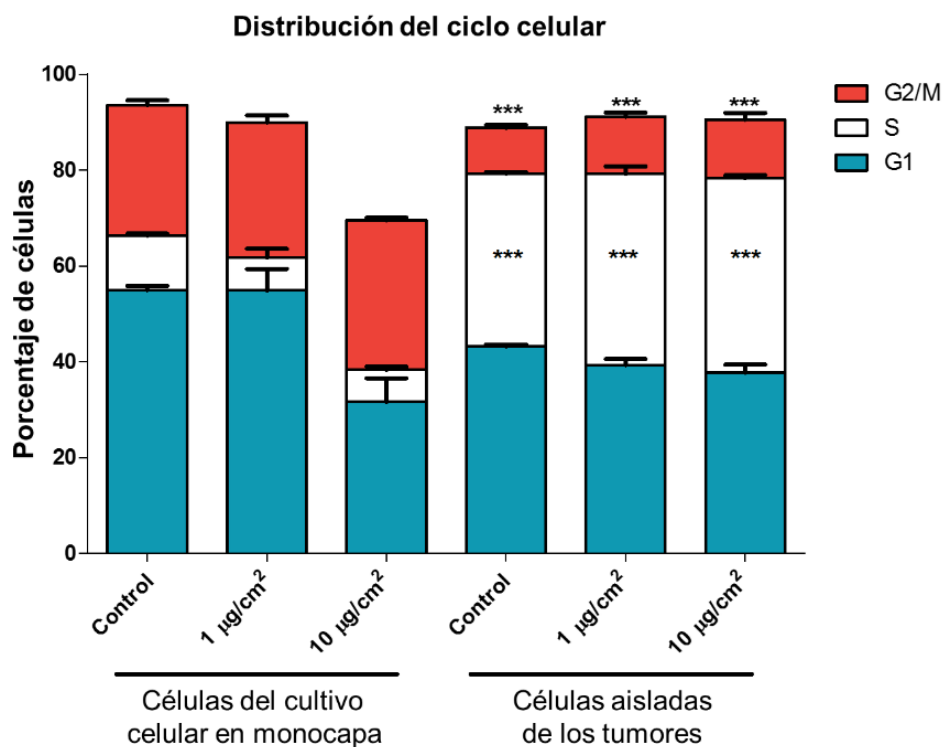
5.2.5 La exposición a nanofibras de TiO₂ no induce cambios en el ciclo celular sin embargo disminuye la sensibilidad al cisplatino

Tanto como en la evaluación de la distribución del ciclo celular como en la evaluación de la sensibilidad al cisplatino, además de comparar entre los tratamientos, se realizó una comparación entre modelos. El ciclo celular no muestra cambios entre los tratamientos tanto en el *modelo in vitro*, como en las células aisladas de los tumores, es decir, las células expuestas a 1 y 10 µg/cm² tienen aproximadamente el mismo porcentaje de células en cada fase (G₁, S como G₂/M) como el control (Figura 22A). Solo el tratamiento de 10 µg/cm² del cultivo *in vitro*, muestra una disminución en todas las fases, que de hecho en sumatoria no dan el 100% pero es debido a la gran cantidad de células con alto contenido de DNA, más de que deberían tener en la fase G₂/M. Eso coincide con el incremento de células trinucleadas y tetranucleadas, sin embargo dado que las fases del ciclo celular se determinan por cantidad de DNA, estas células no se consideraron. A pesar de que todas las fases de este tratamiento hayan bajado, en proporción con los otros dos tratamientos este tratamiento de 10 µg/cm² del cultivo *in vitro* no muestra diferencias con el control (Figura 22A). Por otro lado, en las células aisladas de los tumores tampoco se encontraron diferencias entre los tratamientos pero sí se encontró que la fase S incrementa con respecto a las células de los cultivos *in vitro*. La fase S de las células control incrementa de 11±0.3% a 36±0.4%, mientras que la fase G₂/M disminuye de 27±1.0% a 9±0.5%. La fase S de las células expuestas a 1 µg/cm² incrementó de 6.8±1.8% en el cultivo *in vitro* a 40±1.5% en las células aisladas de los tumores, mientras que la fase G₂/M disminuyó de 28±1.4 a 11±0.5%. La fase S de las células expuestas a 10 µg/cm² incrementó de 6±0.6% en el cultivo *in vitro* a 40±0.6% en las células aisladas de los tumores, mientras que la fase G₂/M disminuyó de 31±0.5 a 12±1.4% (Figura 22A).

Posteriormente, la sensibilidad al cisplatino se determinó tanto en las células expuestas a nanofibras de TiO₂ en el cultivo *in vitro* como en células aisladas de los tumores de los tres tratamientos. Todos los cultivos se incubaron por 24 h con diferentes concentraciones de cisplatino y en las células control del cultivo *in vitro* se necesitó de una concentración de 75 µM de cisplatino para obtener la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) y a esta pérdida del 50% de la viabilidad le llamamos el 100% de sensibilidad al cisplatino. Los tratamientos de 1 y 10 µg/cm² en los cultivos *in vitro* que se trataron con de 75 µM de cisplatino, mostraron una viabilidad de 55.7±3.0% y 84.8±4.3%, respectivamente, esto representa una pérdida en la sensibilidad al cisplatino de 18% y 72%, respectivamente (Figura 22B). Por otro lado, las

células aisladas de los tumores control que no se expusieron a cisplatino muestran la misma viabilidad que las células control de los cultivos *in vitro*, sin embargo, cuando se trataron con 75 μ M de cisplatino la viabilidad fue de $68.7\pm 3.1\%$, lo que representa una pérdida en la sensibilidad al cisplatino de 42%. Adicionalmente, las células aisladas de los tumores de 1 y 10 μ g/cm² que se trataron con 75 μ M de cisplatino presentaron una viabilidad de $102.2\pm 6.5\%$ y $102.2\pm 6.6\%$ lo que representa no solo la pérdida total de la sensibilidad al cisplatino, sino que también representa una resistencia del 4% y 40%, respectivamente (Figura 22B).

A



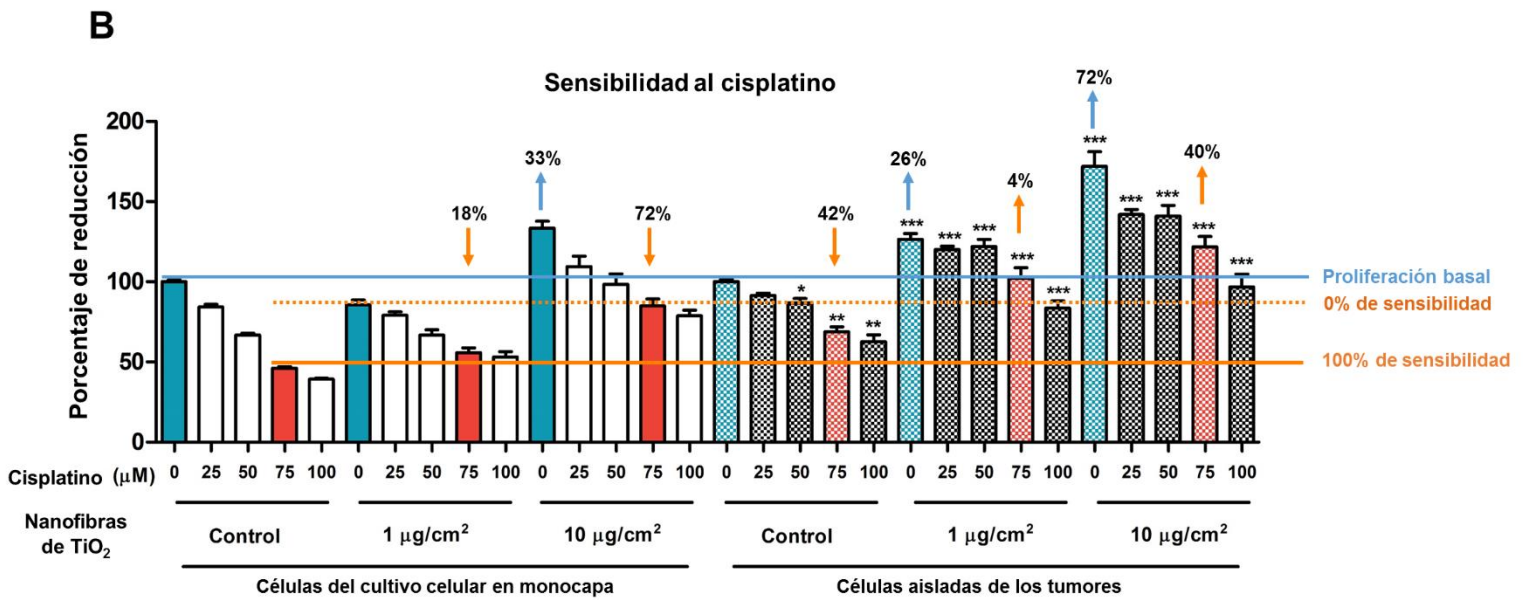


Figura 22. Distribución del ciclo celular y sensibilidad al cisplatino tanto en células cultivadas en monocapa como en células aisladas de los tumores desarrollados en xenotrasplante. (A) El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G_1 , S y G_2/M) se evaluó en células control y células expuestas a nanofibras de TiO_2 en ambos modelos. (B) La sensibilidad al cisplatino se determinó en ambos modelos. Las células se expusieron a diferentes concentraciones de cisplatino (25–100 μM) por 24 h y la viabilidad celular se evaluó por la reducción de MTT. Las diferencias estadísticas son entre el modelo de cultivo en monocapa vs las células aisladas de los tumores. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar.

6. DISCUSIÓN

El dióxido de titanio comenzó a sintetizarse en Francia en el año 1930, y el tamaño en el que era sintetizado era micrométrico. A partir del año 1969, comenzó a sintetizarse en tamaños nanométricos lo que cambia muchas de sus propiedades físicas y químicas, y lo cual lo ha vuelto más atractivo para la industria, ya que se requiere de menor cantidad del material para alcanzar los efectos deseados. Hay mucha evidencia científica que muestra que la composición química, el tamaño, la forma e incluso el arreglo molecular de los átomos son las principales características de las partículas que determinan sus propiedades así como su toxicidad. Durante décadas el TiO_2 se ha sintetizado en forma de esferas o amorfo, pero recientemente se han sintetizado nuevas formas, como los nanotubos de TiO_2 que se han usado para promover la proliferación de fibroblastos en implantes óseos (Radtke et al., 2019), o para la liberación de antibióticos en los huesos (Shen et al 2019), los nanocubos de TiO_2 que mejoran la capacidad de almacenar y liberar rápidamente litio (Li^+) así como el rendimiento de las baterías de Li^+ (You et al., 2017), las nanohojas de TiO_2 que se han propuesto para el desarrollo de fotocatalizadores ya que muestran una mejor actividad fotocatalítica que las nanoesferas (Barbierikovaa et al., 2018). Sin embargo, una de las formas recientemente sintetizadas que tienen más fuerza en el mercado por sus propiedades físicas y químicas son las nanofibras de TiO_2 . Estas se usan en la remediación de aguas residuales, paneles solares, como bactericida y hasta en dispositivos que miden pH (Brammer et al., 2012; Cho et al., 2015; Mohamed et al., 2016; Batmunkh et al., 2017). Debido a que la IARC ha clasificado al TiO_2 como posible carcinógeno para humanos cuando se está expuesto por vía inhalatoria, la principal preocupación son los ambientes ocupacionales. Sin embargo, esta clasificación no discrimina entre tamaño y forma. Por otro lado en NIOSH ha recomendado que la exposición a partículas ultrafinas, es decir nanopartículas, no debe exceder los 0.3 mg/m^3 en una jornada laboral de máximo 8 horas. No obstante, esta recomendación no se lleva a cabo y por el contrario, los organismos encargados de regular la exposición ocupacional por ejemplo la OSHA en EE.UU. permite que la exposición sea de 15 mg/m^3 mientras que en México la NOM-010-STPS-1999 con base en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización del Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo del Reglamento Interior de la Secretaría del Trabajo y Previsión Social, permite la exposición al TiO_2 (Número CAS 13463-67-7) en una concentración de 10 mg/m^3 en una jornada laboral de 8 horas. Este número de CAS que la NOM-010-STPS-1999 menciona, tampoco discrimina entre tamaño y forma ya que los productos que aparecen con esa clasificación incluyen partículas mayores a 200 nm,

nanopartículas de tamaño menor a 25 nm, nanotubos de TiO₂ con un diámetro de 25 nm y nanofibras de 10 nm de ancho x 10 µm de largo (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=13463-67-7&interface=CAS%20No.&N=0&mode=partialmax&lang=es®ion=MX&focus=product>).

Dentro de estos ambientes ocupacionales, los trabajadores expuestos a una mayor concentración son los que se encuentran en el área de empaquetamiento y limpieza del área donde se encuentran los paquetes de TiO₂. Un estudio epidemiológico realizado en cuatro plantas productoras de TiO₂ entre 1960-2000 mostró que la exposición ocupacional ha disminuido con el tiempo ya que entre 1976 y 1980 la dosimetría fue de 13.7 mg/m³, entre 1981 y 1985 fue de 7.9 mg/m³, entre 1986 y 1990 fue de 6.4 mg/m³, entre 1991 y 1995 fue de 5.3 mg/m³ y entre 1996-2000 fue de 3.1 mg/m³. De esas concentraciones, la del área de empaquetamiento siempre presentó las más altas con una media de 6.2 mg/m³ mientras que por ejemplo el área donde se manipula el mineral de donde el TiO₂ es extraído mostró una media de 1.1 mg/m³ (Fryzek et al 2003). Además de que en las fábricas se excede el límite recomendado, los trabajadores no cuentan con las medidas de seguridad adecuadas. De hecho, el cubrebocas más sofisticado que hasta ahora se ha desarrollado retiene partículas de entre 10-400 nm, sin embargo, el 96% de las partículas retenidas miden alrededor de 350nm (Vo et al., 2015), dejando pasar las partículas más pequeñas.

Poco se sabe sobre la toxicidad de las nanofibras de TiO₂, sin embargo su toxicidad se ha comparado con la toxicidad de otras fibras, como los asbestos (Hamilton *et al.*, 2009) los cuales se encuentran clasificados en el grupo 1 de la IARC como carcinógenas. El principal motivo del estudio de la toxicidad de las nanofibras de TiO₂ es determinar su toxicidad para tomar las medidas necesarias que conduzcan al desarrollo de ambientes ocupacionales seguros para los trabajadores y evitar lo que ha sucedido en el pasado como por ejemplo con los asbestos, los cuales se clasificaron como carcinógenos después de que millones de personas alrededor del mundo ya habían desarrollado esta patología. Además, países como la India, aún sintetizan este material y sigue sin contar con las medidas necesarias de seguridad para los trabajadores.

Parte de las similitudes entre los asbestos y las nanofibras de TiO₂ es que la toxicidad de estas depende del largo de las fibras y que además, son internalizadas y acumuladas en las células del pulmón. En este trabajo mostramos que las nanofibras de TiO₂ se internalizan en las células epiteliales de pulmón y que además se asocian a los cuerpos lamelares que son

los responsables de sintetizar el surfactante pulmonar. Esto se ha observado también con nanopartículas de oro y dióxido de silicio, que se además de encontrarse en vesículas con cuerpos lamelares disminuyen las proteínas surfactantes SP-B y SP-C (Wang y Petersen 2013; Kononenko et al., 2017). La disminución del surfactante es importante ya que conduce al proceso de transición epitelio mesénquima y fibrosis (Glasser y Mallampalli 2012; Ghidoni et al., 2015; Ma et al., 2017) que es uno de los efectos observados en este trabajo. El efecto de las nanopartículas sobre el surfactante es un área poco explorada, en las bases de datos como PubMed aparecen 5 artículos científicos relacionados con este tema y es un área que podría ofrecer muchas respuestas a los efectos tóxicos de las nanopartículas en el pulmón.

Por otro lado, observamos daño cromosómico debido a la exposición de las nanofibras de TiO_2 lo cual es muy relevante. La formación de micronúcleos indica la pérdida de fragmentos de cromosomas o incluso de cromosomas completos que se asocia con daños en la segregación durante la mitosis. Aunque las células A549, utilizadas en este trabajo son inestables cromosómicamente, ya que son hipotriploides con 24% de las células conteniendo 66 cromosomas, 22% con 64, 65 y 67 cromosomas, y con un 40% de células sin uno o ambos cromosomas Y (ATCC A549® CCL-185), esta inestabilidad genómica se ve incrementada con la exposición a las nanofibras de TiO_2 ya que no solo hay incremento en la frecuencia de micronúcleos sino que las células trinucleadas y tetranucleadas también son más frecuentes. El daño a DNA y la frecuencia de micronúcleos son efectos que también otras nanopartículas inducen, como por ejemplo, las de plata y las de óxido de zinc tanto en modelos *in vitro* como modelos *in vivo* (Nallanthighal et al., 2017; Souza et al., 2016; Pati et al., 2016) sin embargo, en las aneuploidías no se ha profundizado y sería de relevancia ya que esto le da a las células mayor variación genética para les permite adaptarse a entornos cambiantes como las fluctuaciones de nutrientes, la hipoxia e incluso les podría modificar el fenotipo, induciendo que pierdan diferenciación, promoviendo la fibrosis e incluso haciéndolas más agresivas o resistentes a fármacos (Giam y Rancati et al., 2015; Xiong y Liu, 2017). Además de la exacerbada inestabilidad cromosómica, tanto la hipoxia, como la fibrosis y la resistencia a fármacos son efectos hallados en este trabajo.

La hipoxia, que es la disminución de la cantidad de oxígeno, activa al factor inducible de hipoxia HIF-1 α el cual es traslocado al núcleo y forma un heterodimero con HIF-1 β para después unirse a los “elementos de respuesta a la hipoxia” en el DNA y así encender genes relacionados con la fibrosis y la angiogénesis (Xiong y Liu, 2017).

HIF-1 α tiene la capacidad de activar a TGF- β quien tiene una actividad autocrina y así activa a la proteína SMAD3 la cual forma un dímero con HIF-1 α que es traslocado al núcleo y promueve la transcripción del gen *VEGF* (Shi et al., 2014). El factor VEGF es el principal promotor de la angiogénesis. Después de la exposición a nanofibras de TiO₂ en los cultivos en monocapa nosotros observamos que la expresión de HIF-1 α incrementó y que además esta proteína se encontraba localizada en el núcleo. Conjuntamente, el RNA mensajero de VEGF también incrementó después de la exposición a TiO₂, con lo cual observamos que en las células había un proceso de señalización a favor de la angiogénesis, sin embargo con modelos de xenotrasplante pudimos tener mayor certeza de este hallazgo. Después de que las células se implantaron en la subdermis de los ratones y que los tumores desarrollados por 11 semanas se obtuvieron, se observó en las histologías de los tumores formados a partir de células expuestas a nanofibras un alto infiltrado de eritrocitos así como una sobreexpresión nuevamente de HIF-1 α en comparación con las histologías de los tumores controles, lo cual confirmó que los ratones tenían un proceso angiogénico que les proporcionó mayor irrigación sanguínea.

Por otro lado, TGF- β no solo está involucrado en el proceso angiogénico, sino que está altamente relacionado con la fibrosis, la cual se define como la reparación desregulada de tejidos en respuesta a hipoxia crónica, inflamación o daño tisular que resulta en la acumulación excesiva de matriz extracelular en donde son abundantes proteínas como colágeno y fibronectina, ácido hialurónico y proteoglicanos (Xiong y Liu, 2017). Nosotros observamos que la expresión de TGF- β también incrementó tanto en el modelo de monocapa como en el modelo de xenotrasplante, por lo cual nos cuestionamos si aparte de existir un proceso angiogénico, había fibrosis en los tumores.

La fibrosis inicia con el proceso de transición epitelio mesénquima (EMT) que se caracteriza por inducir en las células epiteliales la pérdida de polaridad apical-basal, reorganizar el citoesqueleto perdiendo filamentos intermedios de citoqueratinas por filamentos intermedios de vimentina y principalmente por inducir la pérdida de marcadores epiteliales como las moléculas de fuertes de adhesión célula-célula como E-cadherina y Zona Ocludens (ZO-1) para empezar a promover la expresión de proteínas relacionadas a un fenotipo mesenquimal, en donde las células son poco diferenciadas, con una morfología de fibroblastoide y con una mejor capacidad migratoria (Chen et al., 2014; Burger et al., 2017). Existen tres tipos de EMT, la tipo 1 es durante el desarrollo embrionario, la tipo 2 se da en casos de cicatrización de las heridas y la EMT de tipo 3 se da en las neoplasias. Sin

embargo, a pesar de la observación de EMT *in vitro*, la falta de evidencia de EMT *in vivo* ha causado escepticismo sobre su papel en la progresión tumoral. Se ha descrito que la transición epitelio-mesénquima en la línea celular usada en este trabajo (A549) lleva a la sobreproducción de colágeno por medio de la vía TGF- β (Shintani *et al.*, 2008), convirtiendo a las células epiteliales en fibroblastos y conduciendo al tejido a un proceso fibrótico (Shi *et al.*, 2016) lo cual también se observó en este trabajo. Además de la sobreexpresión de TGF- β , que es la principal molécula iniciadora del proceso de EMT, la cantidad de N-cadherina incrementó en los cultivos en monocapa expuestos a nanofibras de TiO₂, la cual es una molécula de unión célula-célula pero de poca fuerza y es característica de una EMT. Asimismo, estos cultivos en monocapa expuestos a nanofibras de TiO₂ presentaron una mayor concentración intracelular de hidroxiprolina, uno de los tres aminoácidos que constituyen a las moléculas de colágeno (glicina-lisina-hidroxiprolina), lo cual indica una mayor síntesis de colágeno en las células. Adicionalmente, en las histologías de los tumores, desarrollados a partir de estas células, incrementó TGF- β , N-cadherina, tejido conectivo y colágeno tipo I, y disminuyó E-cadherina, lo cual muestra un perfil más completo de la EMT que tienen los tumores desarrollados a partir de células expuestas a nanofibras de TiO₂. El exceso de acumulación de colágeno y tejido conectivo conducen a la fibrosis, que a su vez desencadena un fenotipo más agresivo en los tumores (Rybinski *et al.*, 2014 y Avery *et al.*, 2018).

Como se ha mencionado, tanto la hipoxia como la EMT y la inestabilidad genómica pueden conducir a fenotipos más agresivos. Específicamente, la EMT induce resistencia a la apoptosis y anoikis, le da a las células mayor capacidad para migrar e invadir y está íntimamente relacionada con la resistencia a fármacos con base en platino (Brozovic, 2017). Desgraciadamente el modelo de xenotrasplante en la dermis de los ratones no es el adecuado para determinar capacidad de migración o de metástasis en las células, ya que las barreras de la piel son muy difíciles de atravesar. Sin embargo, tanto las células expuestas a nanofibras de TiO₂ de los cultivos de monocapa, como células extraídas de los tumores se expusieron a diferentes concentraciones de cisplatino para evaluar la sensibilidad a este fármaco antineoplásico basado en platino ampliamente usado en el tratamiento del cáncer de pulmón, cabeza y cuello, ovario, mama, próstata y vejiga entre otros. Los resultados fueron muy interesantes al mostrar que las células control del modelo de monocapa son más sensibles al cisplatino que las células control de los tumores. Es decir, el hecho de que las células se encuentren en un ambiente rodeadas de los múltiples nutrientes que implica un organismo completo como lo es el ratón, hace que las células de

adenocarcinoma pulmonar muestren cierta pérdida de sensibilidad al cisplatino. Este efecto se vio totalmente exacerbado en las células expuestas a las nanofibras de TiO₂, ya que en el modelo de xenotrasplante las células expuestas a las nanofibras no solo perdieron total sensibilidad al cisplatino, sino que mostraron resistencia al mismo. Este resultado denota la importancia que tiene evaluar la toxicidad de las nanofibras de TiO₂, ya que aquí se muestra claramente un fenotipo de las células más agresivo y resistente a cisplatino. Sin embargo, para este hallazgo quedan abiertas aún muchas preguntas, como por ejemplo el mecanismo por el cual estas células pierden la sensibilidad al fármaco.

Una posible explicación es que la EMT y la pérdida de sensibilidad a los fármacos basados en platino están íntimamente relacionados aunque no se ha descrito cuál de los dos procesos ocurre primero en la célula. Se ha observado que diferentes líneas celulares de ovario y pulmón que se hacen resistentes a cisplatino o carboplatino de manera intencional en el laboratorio también presentan un perfil de una célula con EMT (Brozovic, 2017). Se ha observado que cuando son bloqueadas las proteínas SNAIL y TWIST que son dos factores de transcripción que promueven la EMT, las células A549 (epiteliales de pulmón) y HeLa (cáncer cervical), se sensibilizan al cisplatino (Zhuo et al., 2008a, b). Recientemente, también se ha mostrado que la síntesis constante de TGF- β lleva a la resistencia de doxorubicina, cisplatino y ciclofosfamida en células epiteliales de mama (Katsuno et al., 2019).

Otra posible explicación es que los sistemas de reparación del DNA se encuentren sobreactivados. Específicamente, se ha visto que cuando se sobreexpresa la proteína ERCC1 que es una endonucleasa que corta en el extremo 5' del DNA para la reparación del DNA en el sistema de reparación de escisión de nucleótidos (NER) la resistencia al cisplatino es incrementada (Hsu et al., 2010). Sin embargo, habría que explorar si la exposición a nanofibras de TiO₂ tiene la capacidad de sobreactivar los sistemas de reparación del DNA. Este campo está completamente inexplorado, no solo con las nanofibras de TiO₂, sino con las nanopartículas en general.

Por otro lado, a pesar de que se ha descrito que la EMT y la inestabilidad cromosómica inhiben la apoptosis, nosotros no observamos cambios en el ciclo celular entre los tratamientos en ninguno de los dos modelos, sin embargo hubo un mayor porcentaje de células en fase S en las células extraídas de los tumores comparadas con las células del modelo en monocapa. Probablemente, el hecho de no sincronizar las células en alguna de las fases del ciclo celular mimetizó los resultados, ya que no todas las células comenzaron

la progresión del ciclo celular en la misma fase, y se ha descrito que para detectar cambios en la progresión del ciclo celular es necesario sincronizarlas en alguna de las fases, por ejemplo en la fase G₁ con hidroxiaurea y con privación de suero fetal bovino (Medina-Reyes et al., 2015) y 24 h después evaluar el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

A pesar de no observar cambios en el ciclo celular en ninguno de los dos modelos, lo que sí observamos en las células de los cultivos en monocapa fue la disminución de la proteína Ki67 que es un marcador de proliferación, a pesar de que a nivel de RNA mensajero no hubo cambios mientras que en las histologías de los tumores, la expresión de Ki67 fue justo lo opuesto al haber mucha mayor expresión en los tumores formados a partir de células expuestas a nanofibras de TiO₂ en comparación con los tumores controles. Este efecto, en donde en el cultivo en monocapa observamos que las células muestran incremento en la muerte celular pero en un modelo *in vivo* su capacidad para proliferar aumenta ya lo habíamos observado previamente en embriones de pollo, en donde células epiteliales de pulmón que habían sido expuestas a las nanofibras de TiO₂ durante 7 días y que presentaban muerte celular en el cultivo en monocapa después se sembraron sobre la membrana corioalantoides de embriones de pollo donde no solo sobrevivieron, sino que ganaron potencial invasivo y proliferativo después de 5 días (Medina-Reyes et al., 2015). Asumimos que la irrigación sanguínea que hay en los modelos *in vivo*, proveen a las células de nutrientes y factores de crecimiento que no están disponibles en un cultivo celular lo cual le permite a las células superar el daño y seguir proliferando. Esto es aún más alarmante puesto que estas células presentan daños severos en el DNA y un fenotipo mesenquimal y superan estos daños para seguir proliferando.

Lo interesante de estos modelos *in vivo*, como el del xenotrasplante es que permite observar cambios que en los cultivos celulares de monocapa no se observarían. Por ejemplo, en este proyecto pudimos observar la forma de los tumores hallando que cuando estos eran derivados de células expuestas a nanofibras de TiO₂ perdían circularidad, es decir presentaban irregularidades en el perímetro del tumor. Las formas irregulares de los tumores se relaciona íntimamente con la malignidad en tumores de pulmón ya que a menor circularidad, la posibilidad de metástasis es mayor y el pronóstico de supervivencia es peor (Grove et al., 2015). Lo anterior se ha observado no solo en cáncer de pulmón sino también en glioblastomas, cáncer de mama y meningioma (Czarnek et al., 2017; Liu et al., 2016; Tan et al., 2012). Aún quedan muchas preguntas por contestar sobre los mecanismos de

toxicidad de las nanofibras de TiO_2 , por ejemplo se podría inhibir la vía de $\text{TGF-}\beta$ para ver si de esta manera se puede inhibir la transición epitelio mesénquima y determinar si la resistencia al cisplatino es dependiente de este proceso.

7. CONCLUSIÓN

La exposición de células epiteliales de pulmón a nanofibras de TiO₂ por 7 días induce micronúcleos y células multinucleadas como marcadores de inestabilidad genómica, además de la sobreexpresión de marcadores relacionados con hipoxia, angiogénesis y el proceso de transición epitelio mesénquima en cultivos en monocapa. Estas células no presentan cambios en el ciclo celular, sin embargo muestran pérdida en la sensibilidad al cisplatino. Cuando estas células después de la exposición a las nanofibras de TiO₂ son inyectadas en la subdermis de ratones inmunosuprimidos, logran desarrollar tumores con mayor infiltrado de eritrocitos y elevada expresión de marcadores de hipoxia, angiogénesis y transición epitelio mesénquima. Además, estos tumores tienen un alto contenido de colágeno tipo I lo que sugiere fibrosis y las células aisladas de estos tumores presentan resistencia total al cisplatino.

En general, se puede concluir que la exposición a nanofibras de TiO₂ por 7 días puede cambiar el fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal en las células de adenocarcinoma pulmonar, lo que conduce a tumores fibróticos y con resistencia al fármaco antineoplásico cisplatino.

Los resultados de esta investigación se publicaron en la revista *Environmental Science: Nano*: Environ. Sci.: Nano, 2019; 6:286-304. DOI: 10.1039/C8EN01078A. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/en/c8en01078a#!divAbstract>

8. PERSPECTIVAS

En este estudio se observó que la exposición a nanofibras de TiO_2 puede modificar el fenotipo de células de adenocarcinoma pulmonar, induciendo la pérdida de diferenciación celular, el aumento en la proliferación, pérdida en la sensibilidad a cisplatino (fármaco antineoplásico) e incremento en marcadores de angiogénesis que, haciendo una extrapolación, induciría tumores más irrigados que aunado a los demás hallazgos los volvería también más difíciles de tratar. Sin embargo, aún quedan muchas preguntas por resolver. Una de ellas y probablemente la más importante es que hay que determinar si la exposición a las nanofibras de TiO_2 también puede promover procesos como la invasión y la metástasis, que el modelo de xenotrasplantes no permitió determinar pero que un modelo en donde a los ratones se les inyecten las células por la vena de la cola, para que los tumores crezcan en el órgano de donde provienen, sí permitiría determinar. Además, sería importante determinar si la pérdida de sensibilidad que observamos en este trabajo se observa con otros fármacos antineoplásicos de importancia médica en el tratamiento del cáncer de pulmón, como son el carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, y etopósido, entre otros. E incluso, sería de gran aportación evaluar esa pérdida de sensibilidad a los diferentes fármacos en el ratón, es decir, durante el desarrollo de los tumores, ya sean xenotrasplantes y ortotrasplantes.

Por otro lado, una de las limitaciones de este trabajo fue que el modelo de xenotrasplante en ratones desnudos, carece de sistema inmune por lo que no pudimos observar el comportamiento del tumor en presencia de células inmunes quienes además secretan muchas interleucinas que podrían estar favoreciendo o reprimiendo el crecimiento del tumor. Dado que se ha observado que la exposición a nanopartículas en general, pero en especial a nanofibras de TiO_2 , inducen un ambiente pro-inflamatorio y que además la inflamación constante favorece la formación y crecimiento de los tumores, pienso que los efectos observados en este trabajo podrían incluso ser más drásticos en presencia de un ambiente pro-inflamatorio. Para ello, se podría realizar un modelo de ortotrasplante, que es con células de la misma especie que el sujeto en donde se inyectan (por ejemplo, células pulmonares de ratón inyectadas en ratones). De esta manera no se necesitarían ratones inmunosuprimidos y se podría evaluar la presencia del ambiente inflamatorio.

Todos estos hallazgos permitirían tener un contexto mucho más completo de la toxicidad de las nanofibras de TiO_2 y de su participación en el cáncer, que es una enfermedad de importancia mundial.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aftab Q, Sin WC, Naus CC. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. *Oncotarget*. 2015;6(13):11447–64.
- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):102.
- Al-Ahmady ZS, Scudamore CL, Kostarelou K. Triggered doxorubicin release in solid tumors from thermosensitive liposome-peptide hybrids: critical parameters and therapeutic efficacy. *Int J Cancer*. 2015;137(3):731–43.
- Allegri. M, Bianchi. MG, Chiu. M, Varet. J, Costa. AL, Ortelli. S, Blosi. M, Bussolati. O, Poland. CA and Bergamaschi. E, Shape-Related Toxicity of Titanium Dioxide Nanofibres, *PLoS One*, 2016,11(3),e0151365.
- Arnoldussen YJ, Anmarkrud KH, Skaug V, Apte RN, Haugen A, Zienolddiny S. Effects of carbon nanotubes on intercellular communication and involvement of IL-1 genes. *J Cell Commun Signal*. 2016;10(2):153–62.
- Avery D, Govindaraju P, Jacob M, Todd L, Monslow J, Puré E. Extracellular matrix directs phenotypic heterogeneity of activated fibroblasts. *Matrix Biol* 2018;67:90–106.
- Baris I, Simonato L, Artvinli M, Pooley F, Saracci R, Skidmore J, Wagner C. Epidemiological and environmental evidence of the health effects of exposure to erionite fibres: a four-year study in the Cappadocian region of Turkey. *Int J Cancer*. 1987;39(1):10–7.
- Barbieriková Z, Pližingrová E, Motlochová M, Bezdičková P, Boháček J, Dvoranová D, Mazúra M, Kupčík J, Jirkovský J, Šubr J, Krýsac J, Brezová V. N-Doped titanium dioxide nanosheets: Preparation, characterization and UV/visible-light activity. *Applied Catalysis B: Environmental* 232: 2018;397–408.
- Batmunkh M, Macdonald TJ, Shearer CJ, Bat-Erdene M, Wang Y, Biggs MJ, Parkin IP, Nann T, Shapter JG. Carbon Nanotubes in TiO₂ Nanofiber Photoelectrodes for High-Performance Perovskite Solar Cells. *Adv Sci Weinh* 2017;4(4):1600504.
- Beltrán-Partida. E, Valdéz-Salas. B, Moreno-Ulloa. A, Escamilla. A, Curiel. MA, Rosales-Ibáñez. R, Villarreal. F, Bastidas. DM, Bastidas. JM, Improved in vitro angiogenic behavior on anodized titanium dioxide nanotubes, *J Nanobiotechnology*, 2017,15(1),10.
- Benesch M, Urban C. Liposomal cytarabine for leukemic and lymphomatous meningitis: recent developments. *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9(2):301–9.

- Boffetta P, Gaborieau V, Nadon L, Parent MF, Weiderpass E, Siemiatycki J. Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal. *Scand J Work Environ Health*. 2001;27(4):227–32.
- Bonner JC, Silva RM, Taylor AJ, Brown JM, Hilderbrand SC, Castranova V, Porter D, Elder A, Oberdörster G, Harkema JR, Bramble LA, Kavanagh TJ, Botta D, Nel A, Pinkerton KE. Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environ Health Perspect* 2013;121:676–82.
- Brammer KS, Frandsen CJ, Jin S. TiO₂ nanotubes for bone regeneration. *Trends Biotechnol*. 2012;30(6):315–22.
- Brozovic A. The relationship between platinum drug resistance and epithelial-mesenchymal transition. *Arch Toxicol*. 2017;91(2):605–19.
- Brun E, Barreau F, Veronesi G, Fayard B, Sorieul S, Chanéac C, Carapito C, Rabilloud T, Mabondzo A, Herlin-Boime N, Carrière M. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part Fibre Toxicol* 2014;11:13.
- Bugno J, Hsu HJ, Pearson RM, Noh H, Hong S. Size and surface charge of engineered poly(amidoamine) dendrimers modulate tumor accumulation and penetration: a model study using multicellular tumor spheroids. *Mol Pharm*. 2016;13(7):2155–63.
- Burger GA, Danen EHJ, Beltman JB. Deciphering Epithelial-Mesenchymal Transition Regulatory Networks in Cancer through Computational Approaches. *Front Oncol*. 2017;7:162.
- Chairuangkitti P, Lawanprasert S, Roytrakul S, Aueviriyavit S, Phummiratch D, Kulthong K, Chanvorachote P, Maniratanachote R. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol In Vitro*. 2013;27(1):330–8.
- Chen T, Nie H, Gao X, Yang J, Pu J, Chen Z, Cui X, Wang Y, Wang H, Jia G. Epithelial-mesenchymal transition involved in pulmonary fibrosis induced by multi-walled carbon nanotubes via TGF-beta/Smad signaling pathway. *Toxicol Lett*. 2014;226(2):150–62.
- Chézeau L, Sébillaud S, Safar R, Seidel C, Dembélé D, Lorcin M, Langlais C, Grossmann S, Nunge H, Michaux S, Dubois-Pot-Schneider H5, Rihn B, Joubert O, Binet S, Cosnier F, Gaté L. Short- and long-term gene expression profiles induced by inhaled TiO₂ nanostructured aerosol in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;356:54–64.

- Cho JS, Hong YJ, Kang YC. Electrochemical properties of fiber-in-tube- and filled-structured TiO₂ nanofiber anode materials for lithium-ion batteries. *Chemistry* 2015;21(31):11082–7.
- Choo WH, Park CH, Jung SE, Moon B, Ahn H, Ryu JS, Kim KS, Lee YH, Yu IJ, Oh SM. Long-term exposures to low doses of silver nanoparticles enhanced in vitro malignant cell transformation in non-tumorigenic BEAS-2B cells. *Toxicol In Vitro* 2016;37:41–9.
- Cohen CR, Brown J, Moscicki AB, Bukusi EA, Paull JR, Price CF, Shiboski S. A phase I randomized placebo controlled trial of the safety of 3% SPL7013 Gel (VivaGel®) in healthy young women administered twice daily for 14 days. *PLoS One*. 2011;6(1):e16258.
- Czarnek N, Clark K, Peters KB, Mazurowski MA. Algorithmic three-dimensional analysis of tumor shape in MRI improves prognosis of survival in glioblastoma: a multi-institutional study. *J Neurooncol* 2017;132(1):55–62.
- Dai X, Liu R, Li N, Yi J. Titanium dioxide nanoparticles induce in vitro autophagy. *Hum Exp Toxicol* 2019;38(1):56–64.
- Demidov VV, Potaman VN, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchard O, Sonnichsen SH, Nielsen PE. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol*. 1994;48(6):1310–3.
- Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8(9):1509–28.
- Ding J, Liu J, Tian Q, Wu Z, Yao W, Dai Z, Liu L, Wu W. Preparing of Highly Conductive Patterns on Flexible Substrates by Screen Printing of Silver Nanoparticles with Different Size Distribution. *Nanoscale Res Lett*. 2016;11(1):412.
- Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK, Blot WJ. A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *J Occup Environ Med*. 2003;(4):400–9.
- Garduño-Balderas LG, Urrutia-Ortega IM, Medina-Reyes EI, Chirino YI. Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an unbalance between benefits and risks. *J Appl Toxicol*. 2015;35(10):1073–85.
- Ghidoni R, Caretti A, Signorelli P. Role of Sphingolipids in the Pathobiology of Lung Inflammation. *Mediators Inflamm* 2015;2015:487508.
- Giam M, Rancati G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Div*. 2015;10:3.

- Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes Infect* 2012;14(1):17–25.
- Hamilton RF, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M, Holian A. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part Fibre Toxicol* 2009;6:35.
- Hamilton RF, Wu N, Xiang C, Li M, Yang F, Wolfarth M, Porter DW, Holian A. Synthesis, characterization, and bioactivity of carboxylic acid-functionalized titanium dioxide nanobelts. *Part Fibre Toxicol* 2014;11:43.
- Hendren CO, Mesnard X, Dröge J, Wiesner MR. Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment. *Environ Sci Technol* 2011;45:2562–69.
- Hext PM, Tomenson JA, Thompson P. Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology. *Ann Occup Hyg.* 2005;49(6):461–72.
- Hochella MF, JR, Aruguete D, Kim B, Madden AS. Naturally occurring inorganic nanoparticles: general assessment and a global budget for one of earth's last unexplored major geochemical components. *Nature's Nanostructures.*
- Horváth T, Papp A, Igaz N, Kovács D, Kozma G, Trenka V, Tiszlavicz L, Rázga Z, Kónya Z, Kiricsi M, Vezér T. Pulmonary impact of titanium dioxide nanorods: examination of nanorod-exposed rat lungs and human alveolar cells. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:7061–77.
- Hsu DS, Lan HY, Huang CH, Tai SK, Chang SY, Tsai TL, Chang CC, Tzeng CH, Wu KJ, Kao JY, Yang MH. Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(18):4561–71.
- Hummel TZ1, Kindermann A, Stokkers PC, Benninga MA, ten Kate FJ. Exogenous pigment in Peyer patches of children suspected of having IBD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;58(4):477–80.
- Hwang SH, Song H, Lee J, Jang J. Multifunctional Ag-Decorated Porous TiO₂ Nanofibers in Dye-Sensitized Solar Cells: Efficient Light Harvesting, Light Scattering, and Electrolyte Contact. *Chemistry* 20014;19.
- ISO/TS 27687:2008, disponible en <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:ts:27687:ed-1:v2:en>. Acceso el 13 de enero del 2019.
- Jakubowska M, Sniegocka M, Podgórska E, Michalczyk-Wetula D, Urbanska K, Susz A, Fiedor L, Pyka J, Płonka PM. Pulmonary metastases of the A549-derived lung adenocarcinoma

tumors growing in nude mice. A multiple case study. *Acta Biochim Pol* 2013;60(3):323–30.

Jimenez LA, Gionet-Gonzales MA, Sedano S, Carballo JG, Mendez Y, Zhong W. Extraction of microRNAs from biological matrices with titanium dioxide nanofibers. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(3),1053–60.

Kairdolf BA, Smith AM, Stokes TH, Wang MD, Young AN, Nie S. Semiconductor quantum dots for bioimaging and biodiagnostic applications. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2013;6:143–62.

Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol*. 2014;5:159.

Katsuno Y, Meyer DS, Zhang Z, Shokat KM, Akhurst RJ, Miyazono K, Derynck R. Chronic TGF- β exposure drives stabilized EMT, tumor stemness, and cancer drug resistance with vulnerability to bitopic mTOR inhibition. *Sci Signal*. 2019;12(570). pii: eaau8544.

Knudsen KB, Northeved H, Kumar PE, Permin A, Gjetting T, Andresen TL, Larsen S, Wegener KM, Lykkesfeldt J, Jantzen K, Loft S, Møller P, Roursgaard M. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine*. 2015;11(2):467–77.

Konduru NV, Molina RM, Swami A, Damiani F, Pyrgiotakis G, Lin P, Andreozzi P, Donaghey TC, Demokritou P, Krol S, Kreyling W, Brain JD. Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells. *Part Fibre Toxicol*. 2017;14(1):42.

Kononenko V, Erman A, Petan T, Križa I, Kralj S, Makovec D, Drobne D. Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO₂-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells. *Nanotoxicology* 2017;11(3):419–29.

Kuku G, Culha M. Investigating the Origins of Toxic Response in TiO₂ Nanoparticle-Treated Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2017;7(4). pii: E83.

Lai L, Jin JC, Xu ZQ, Mei P, Jiang FL, Liu Y. Necrotic cell death induced by the protein-mediated intercellular uptake of CdTe quantum dots. *Chemosphere*. 2015;135:240–9.

Ledall J, Fruchon S, Garzoni M, Pavan GM, Caminade AM, Turrin CO, Blanzat M, Poupot R. Interaction studies reveal specific recognition of an anti-inflammatory polyphosphorhydrazone dendrimer by human monocytes. *Nanoscale*. 2015;7(42):17672–84.

Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1985;79(2):179–92.

Lippmann M. Man-made mineral fibers (MMMF): human exposures and health risk assessment. *Toxicol Ind Health* 1990a;6(2):225–46.

- Lippmann M. Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. *Environ Health Perspect.* 1990b;88:311–7.
- Liu H, Zhou J, Li W, Liu G. Comparative Analysis of the Magnetic Resonance Imaging Features Between Anaplastic Meningioma and Atypical Meningioma. *J Craniofac Surg* 2016;27(3):e229–33.
- Liu Z, Liang XJ. Nano-carbons as theranostics. *Theranostics.* 2012;2(3):235–7.
- Ma CH, Jiang R, Li JD, Wang B, Sun LW, Lv Y. Experimental study of Endostar injection concomitant with cryoablation on lung adenocarcinoma A549 xenografts. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(11):6697–701.
- Ma Y, Guo Y, Wu S, Lv Z, Zhanga Q and Ke Y. Titanium dioxide nanoparticles induce size-dependent cytotoxicity and genomic DNA hypomethylation in human respiratory cells. *RSC Adv.*, 2017;7:23560.
- Mastorakos P, da Silva AL, Chisholm J, Song E, Choi WK, Boyle MP, Morales MM, Hanes J, Suk JS. Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(28):8720–5.
- Medina-Reyes EI, Bucio-López L, Freyre-Fonseca V, Sánchez-Pérez Y, García-Cuéllar CM, Morales-Bárceñas R, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. Cell cycle synchronization reveals greater G2/M-phase accumulation of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015;22(5):3976–82.
- Medina-Reyes EI, Déciga-Alcaraz A, Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro NL, Flores-Flores JO, Gutiérrez-López GF, Sánchez-Pérez Y, García-Cuéllar CM, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. Titanium dioxide nanoparticles induce an adaptive inflammatory response and invasion and proliferation of lung epithelial cells in chorioallantoic membrane. *Environ Res.* 2015;136:424-34.
- Miquel-Jeanjean C, Crepel F, Raufast V, et al. Penetration study of formulated nanosized titanium dioxide in models of damaged and sun-irradiated skins. *Photochem Photobiol.* 2012; 88:1513–21.
- Mishra J, Dey A, Singh N, Somvanshi R, Singh S. Evaluation of toxicity & therapeutic efficacy of a new liposomal formulation of amphotericin B in a mouse model. *Indian J Med Res.* 2013;137(4):767–76.
- Mohamed A, El-Sayed R, Osman TA, Toprak MS, Muhammed M, Uheida A. Composite nanofibers for highly efficient photocatalytic degradation of organic dyes from contaminated water. *Environ Res* 2016;145:18–25.

- Monaco AM, Giugliano M. Carbon-based smart nanomaterials in biomedicine and neuroengineering. *Beilstein J Nanotechnol.* 2014;5:1849–63.
- Moreno LC, Cavalcanti IM, Satyal P, Santos-Magalhaes NS, Rolim HM, Freitas RM. Acute toxicity and anticonvulsant activity of liposomes containing nimodipine on pilocarpine-induced seizures in mice. *Neurosci Lett.* 2015;585:38–42.
- Moscicki AB, Kaul R, Ma Y, Scott ME, Daud II, Bukusi EA, Shiboski S, Rebbapragada A, Huibner S, Cohen CR. Measurement of mucosal biomarkers in a phase 1 trial of intravaginal 3% StarPharma LTD 7013 gel (VivaGel) to assess expanded safety. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;59(2):134–40.
- Moser R, Xu C, Kao M, Annis J, Lerma LA, Schaupp CM, Gurley KE, Jang IS, Biktasova A, Yarbrough WG, Margolin AA, Grandori C, Kemp CJ, Méndez E. Functional kinomics identifies candidate therapeutic targets in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2104;20(16):4274–88.
- Nakhjavani M, Nikounezhad N, Ashtarinezhad A, Shirazi FH. Human Lung Carcinoma Reaction against Metabolic Serum Deficiency Stress. *Iran J Pharm Res.* 2016;15(4):817–23.
- Nallanthighal S, Chan C, Murray TM, Mosier AP, Cady NC, Reliene R. Differential effects of silver nanoparticles on DNA damage and DNA repair gene expression in Ogg1-deficient and wild type mice. *Nanotoxicology.* 2017;11(8):996–1011.
- Pati R, Das I, Mehta RK, Sahu R, Sonawane A. Zinc-Oxide Nanoparticles Exhibit Genotoxic, Clastogenic, Cytotoxic and Actin Depolymerization Effects by Inducing Oxidative Stress Responses in Macrophages and Adult Mice. *Toxicol Sci.* 2016;150(2):454–72.
- Pele LC, Thoree V, Bruggaber SF, Koller D, Thompson RP, Lomer MC, Powell JJ. Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Particle and Fibre Toxicology.* 2015;12(1):12–26.
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res* 2012;14:1109.
- Porter. DW, Wu. N, Hubbs. AF, Mercer. RR, Funk. K, Meng. F, Li. J, Wolfarth. MG, Battelli. L, Friend. S, Andrew. M, Hamilton. R Jr, Sriram. K, Yang. F, Castranova. V and Holian. A, Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts, *Toxicol Sci,* 2013;131(1):179–93.
- Proquin H, Jetten MJ, Jonkhout MCM, Garduño-Balderas LG, Briedé JJ, de Kok TM, van Loveren H, Chirino YI. Transcriptomics analysis reveals new insights in E171-induced molecular alterations in a mouse model of colon cancer. *Sci Rep.* 2018;8(1):9738.
- Proquin H, Rodríguez-Ibarra C, Moonen CG, Urrutia Ortega IM, Briedé JJ, de Kok TM, van Loveren H, Chirino YI. Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and

genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*. 2017;32(1):139–49.

Pujalté I, Dieme D, Haddad S, Serventi AM, Bouchard M. Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles after inhalation in rats. *Toxicol Lett*. 2017;265:77–85.

Dai X, Liu R, Li N, Yi J. Titanium dioxide nanoparticles induce in vitro autophagy. *Hum Exp Toxicol*. 2018:960327118777849.

Radtke A, Ehlert M, Jędrzejewski T, Sadowska B, Więckowska-Szakiel M, Holopainen J, Ritala M, Leskelä M, Bartmański M, Szkodo M, Piszczek P. Titania Nanotubes/Hydroxyapatite Nanocomposites Produced with the Use of the Atomic Layer Deposition Technique: Estimation of Bioactivity and Nanomechanical Properties. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9(1) pii: E123.

Ramanakumar AV, Parent ME, Latreille B, Siemiatycki J. Risk of lung cancer following exposure to carbon black, titanium dioxide and talc: results from two case-control studies in Montreal. *Int J Cancer*. 2008;122(1):183–9.

Reddy S, Piccione D, Takita H, Bankert RB. Human lung tumor growth established in the lung and subcutaneous tissue of mice with severe combined immunodeficiency. *Cancer Res* 1987;47(9):2456–60.

Rodríguez-Escamilla JC, Medina-Reyes EI, Déciga-Alcaraz A, Carolina Rodríguez-Ibarra, José O. Flores-Flores, Ganem-Rondero A, Rodríguez-Sosa M, Terrazas-Valdés LI, Vaca-Paniagua F, Delgado-Buenrostro NL, Chirino YI. Comparison of liquid and solid administration of food-grade titanium dioxide (E171) on testicle of mice. *Bajo revisión en Journal of Applied Toxicology*.

Rompelberg C, Heringa MB, Van Donkersgoed G, Drijvers J, Roos A, Westenbrink S, Peters R, van Bommel G, Brand W, Oomen AG. Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population. *Nanotoxicology* 2006;10(10):1404–14.

Rybinski B, Franco-Barraza J, Cukierman E. The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad, *Physiol Genomics*, 2014;46(7):223–44.

Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, McNeil SE, Howard PC, Doub WH, Buhse LF. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicol Sci*. 2010;115(1):156–66.

Schmid K, Riediker M. Use of nanoparticles in Swiss Industry: a targeted survey. *Environ Sci Technol* 2008;42:2253–60.

- Senzui M, Tamura T, Miura K, et al. Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *J Toxicol Sci.* 2010;35:107–13.
- Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, Asghar MS, Khan MS, Chaudhry AS. Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. *Biol Trace Elem Res.* 2016;172(1):1–36.
- Shao W, Paul A, Rodes L, Prakash S. A new carbon nanotube-based breast cancer drug delivery system: preparation and in vitro analysis using paclitaxel. *Cell Biochem Biophys.* 2015;71(3):1405–14.
- Siegrist KJ, Reynolds SH, Kashon ML, Lowry DT, Dong C, Hubbs AF, Young SH, Salisbury JL, Porter DW, Benkovic SA, McCawley M, Keane MJ, Mastovich JT, Bunker KL, Cena LG, Sparrow MC, Sturgeon JL, Dinu CZ, Sargent LM. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:6.
- Silva RM, Teesy C, Franzi L, Weir A, Westerhoff P, Evans JE, Pinkerton KE. Biological response to nano-scale titanium dioxide (TiO₂): role of particle dose, shape, and retention. *J Toxicol Environ Health* 2013;A76:953–72.
- Shen SC, Letchmanan K, Chow PS, Tan RBH. Antibiotic elution and mechanical property of TiO₂ nanotubes functionalized PMMA-based bone cements. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019;91:91–8.
- Shi L, Dong N, Fang X, Wang X. Regulatory mechanisms of TGF- β 1-induced fibrogenesis of human alveolar epithelial cells. *J Cell Mol Med* 2016;20(11):2183–93.
- Shi X, Guo LW, Seedial SM, Si Y, Wang B, Takayama T, Suwanabol PA, Ghosh S, DiRenzo D, Liu B, Kent KC. TGF- β /Smad3 inhibit vascular smooth muscle cell apoptosis through an autocrine signaling mechanism involving VEGF-A. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1317.
- Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR, Wheelock MJ. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(1):95–104.
- Singh N, Chen J, Koziol KK, Hallam KR, Janas D, Patil AJ, Strachan AG, Hanley J, Rahatekar SS. Chitin and carbon nanotube composites as biocompatible scaffolds for neuron growth. *Nanoscale.* 2016;8(15):8288–99.
- Silva AC, Freschi AP, Rodrigues CM, Matias BF, Maia LP, Goulart LR, Dantas NO. Biological analysis and imaging applications of CdSe/CdS_xSe_{1-x}/CdS core-shell magic-sized quantum dot. *Nanomedicine.* 2016;12(5):1421–30.
- Sobral LM, Sousa LO, Coletta RD, Cabral H, Greene LJ, Tajara EH, Gutkind JS, Curti C, Leopoldino AM. Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis,

- cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. *Mol Cancer* 2014;20;13:32.
- Souza TA, Franchi LP, Rosa LR, da Veiga MA, Takahashi CS. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2016;795:70–83.
- Tan H, Zhang S, Liu H, Peng W, Li R, Gu Y, Wang X, Mao J, Shen X. Imaging findings in phyllodes tumors of the breast. *Eur J Radiol* 2012;81(1):e62–9.
- Templeton RC, Ferguson PL, Washburn KM, Scrivens WA, Chandler GT. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environ Sci Technol* 2006; 40:7387–93.
- Thompson David T. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nanotoday* 2007;2: 4.
- Tilton SC, Karin NJ, Tolic A, Xie Y, Lai X, Hamilton RF Jr, Waters KM, Holian A, Witzmann FA, Orr G. Three human cell types respond to multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanobelts with cell-specific transcriptomic and proteomic expression patterns. *Nanotoxicology* 2014;8(5):533-48.
- Urrutia-Ortega IM, Garduño-Balderas LG, Delgado-Buenrostro NL, Freyre-Fonseca V, Flores-Flores JO, González-Robles A, Pedraza-Chaverri J7, Hernández-Pando R, Rodríguez-Sosa M, León-Cabrera S, Terrazas LI, van Loveren H, Chirino YI. Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food Chem Toxicol.* 2016;93:20–31.
- Vo E, Zhuang Z, Horvatin M, Liu Y, He X, Rengasamy S. Respirator Performance against Nanoparticles under Simulated Workplace Activities. *Ann Occup Hyg* 2015;59(8):1012–21.
- Wan R, Mo Y, Chien S, Li Y, Li Y, Tollerud DJ, Zhang Q. The role of hypoxia inducible factor-1 α in the increased MMP-2 and MMP-9 production by human monocytes exposed to nickel nanoparticles. *Nanotoxicology* 2011;5(4):568–82.
- Wang M, Petersen NO. Lipid-coated gold nanoparticles promote lamellar body formation in A549 cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831(6):1089–97.
- Wang X, Lee JH, Li R, Liao YP, Kang J, Chang CH, Guiney LM, Mirshafiee V, Li L, Lu J, Xia T, Hersam MC, Nel AE. Toxicological Profiling of Highly Purified Single-Walled Carbon Nanotubes with Different Lengths in the Rodent Lung and Escherichia Coli. *Small* 2018;14(23):e1703915.
- Wei Z, Chen L, Thompson DM, Montoya LD. Effect of particle size on in vitro cytotoxicity of titania and alumina nanoparticles. *Journal of Experimental Nanoscience.* 2014;9(6): 625–38.

- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 2012;46:2242–50.
- Wright C, Iyer AK, Wang L, Wu N, Yakisich JS, Rojanasakul Y4, Azad N1. Effects of titanium dioxide nanoparticles on human keratinocytes. *Drug Chem Toxicol.* 2017;40(1):90–100.
- Xia T, Hamilton RF, Bonner JC, Crandall ED, Elder A, Fazlollahi F, Girtsman TA, Kim K, Mitra S, Ntim SA, Orr G, Tagmount M, Taylor AJ, Telesca D, Tolic A, Vulpe CD, Walker AJ, Wang X, Witzmann FA, Wu N, Xie Y, Zink JI, Nel A, Holian A. Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environ Health Perspect* 2013;121:683–90.
- Xiong A, Liu Y. Targeting Hypoxia Inducible Factors-1 α As a Novel Therapy in Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2017;8:326.
- Xiong S, Tang Y, Ng HS, Zhao X, Jiang Z, Chen Z, Ng KW, Loo SC. Specific surface area of titanium dioxide (TiO₂) particles influences cyto- and photo-toxicity. *Toxicology.* 2013;304:132–40.
- Yamadori I, Ohsumi S, Taguchi K. Titanium dioxide deposition and adenocarcinoma of the lung. *Acta pathologica japonica* 1986;36:783–90.
- Yang J, Luo Y, Xu Y, Li J, Zhang Z, Wang H, Shen M, Shi X, Zhang G. Conjugation of iron oxide nanoparticles with RGD-modified dendrimers for targeted tumor MR imaging. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(9):5420–8.
- Yang Y, Doudrick K, Bi X, Hristovski K, Herckes P, Westerhoff P, Kaegi R.. Characterization of titanium dioxide food grade: The presence of nanosized particles. *Eviron Sci Technol* 2014;48:6391–400.
- Yasuno T, Ohe T, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T. The human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition activity of novel pyridine/pyridinium-type fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25(16):3226–9.
- Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(45):19449–54.
- You H, Wu Q, Li J, He S, Li X, Yang X, Yang J, Meng Y, Tong S, Wu M. Hollow nanocubes constructed from <001> oriented anatase TiO₂ nanoarrays: topotactic conversion and fast lithium-ion storage. *CrystEngComm*, 2017;19:2456–63.

- Zeng C, Shi X, Wu B, Zhang D, Zhang W. Colloids containing gadolinium-capped gold nanoparticles as high relaxivity dual-modality contrast agents for CT and MRI. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;123:130–5.
- Zhao W, Zhang H, He Q, Li Y, Gu J, Li L, Li H, Shi J. A glucose-responsive controlled release of insulin system based on enzyme multilayers-coated mesoporous silica particles. *Chem Commun (Camb)*. 2011;47(33):9459–61.
- Zhuo WL, Wang Y, Zhuo XL, Zhang YS, Chen ZT. Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2008a;369(4):1098–102.
- Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, Zhang Y, Ao X, Chen Z. Knock-down of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway. *Lung Cancer* 2008;62(1):8–14.
- Zulkarnain M, Fadzil MA, Mariattil M, Azid A. Effects of Silver Microparticles and Nanoparticles on Thermal and Electrical Characteristics of Electrically Conductive Adhesives. *Journal of Electronic Materials* 2017;46;11:6727–35.

10. Proyecto realizado durante la estancia de investigación en el “*National Institute for Public Health and the Environment*” en Países Bajos.

“El modelo de interface aire-líquido es más sensible que el modelo sumergido para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de nanofibras de TiO₂ pero no de nanoesferas de TiO₂”

10.1 INTRODUCCIÓN

Las nanofibras de TiO₂, son una de las formas de TiO₂ recientemente sintetizadas, por lo que su toxicidad ha sido poco explorada. El TiO₂ a nivel mundial es principalmente sintetizado en forma de esferas o amorfo, aproximadamente unas 5.7 millones de toneladas a nivel mundial, sin embargo debido a que las nanofibras pueden superar las propiedades físicas y químicas como el área superficial, la durabilidad, la flexibilidad, la conducción eléctrica y térmica entre otras, su producción ha comenzado a ser un atractivo para la industria aunque aún no se cuentan con datos sobre su producción. Está bien documentado en el área de la nanotoxicología que la forma de las partículas es una de las principales características que determinan la toxicidad de estas. Las formas fibrosas de manera general, como las fibras de vidrio, de cerámica o las de asbestos han mostrado ser tóxicas, sin embargo en este caso se desconoce cuánto más pueden ser tóxicas las nanofibras de TiO₂ que su contraparte en forma de esferas. Existen pocos estudios en donde se compara la toxicidad de las nanofibras y las nanoesferas pero está bien documentado que las nanofibras inducen mayor inflamación pulmonar en ratones administrados con 30 µg de partículas por vía intratraqueal (Porter et al., 2013). Además, los ratones que recibieron nanofibras de TiO₂ mantuvieron activo el inflamasoma NRLP3 incluso 112 días después de la administración, mientras que las nanoesferas no lograron mantenerlo activo ni a los 90 días después de la administración (Porter et al., 2013). Por otro lado, los ratones que son administrados con nanofibras de TiO₂ por aspiración orofaríngea muestran un incremento en el infiltrado de neutrófilos en el pulmón, mucho mayor que cuando son administrados con nanoesferas, pero muy similar a cuando son administrados con nanotubos de carbón, mostrando que la formas fibrosas pueden tener efectos similares. Este hallazgo se repitió en cinco laboratorios y todos los resultados fueron muy consistentes (Bonner et al., 2013). En cuanto a los estudios in vitro, las nanofibras inducen mayor muerte celular por medio de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y mayor liberación de la interleucina IL-1β que las nanoesferas de TiO₂ y estos resultados fueron consistentes en 8 diferentes laboratorios (Xia et al., 2013). Sin embargo, en estos pocos estudios sobre la comparación de la toxicidad de estas dos formas de nanopartículas de TiO₂ no se ha explorado la genotoxicidad, la cual nosotros pensamos que será mayor en las células expuestas a nanofibras de TiO₂ sin embargo no se ha descrito si este tipo de nanopartículas pueden o no entrar al núcleo y si la genotoxicidad

inducida es de manera directa o indirecta, es decir a través del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno o a través de una interacción directa entre las nanopartículas y el DNA de acuerdo con las definiciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) (Doak et al., 2012).

Por otro lado, recientemente la marca VitroCell® desarrolló un sistema para evaluar la toxicidad en cultivos celulares simulando las condiciones de los pulmones en donde se tiene el cultivo celular entre una fase de aire y una fase líquida (Figura 23).

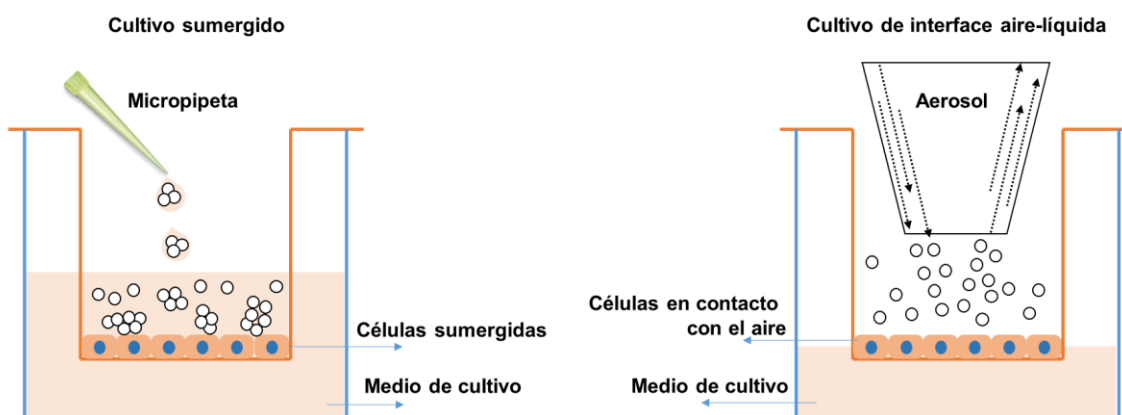


Figura 23. Modelos de cultivo celular sumergido y de interface aire-líquido. Las líneas naranjas indican la canastilla donde las células son sembradas. Para el caso del cultivo de interface aire-líquida las células son sembradas en canastillas de “transwell”. Las líneas azules indican los pozos en donde las canastillas son puestas. Los círculos blancos indican las nanopartículas que pueden estar libres o en aglomerados.

Este sistema permite dos cosas principalmente, la primera es tener un acercamiento al pulmón el cual se encuentra en una interface de aire pero también en contacto con una interface acuosa, y la segunda y probablemente más importante para fines de este trabajo es que cuando las nanopartículas son suspendidas en algún medio de cultivo forman aglomerados y el tamaño de estos va a depender del contenido proteico y lipídico, del pH y de la cantidad de sales que contenga. El tamaño de los aglomerados es otro factor importante a considerar para determinar la toxicidad de las nanopartículas, ya que tamaños más grandes inducen menor toxicidad que los aglomerados más pequeños debido a que los primeros son más fáciles de internalizar. Con el sistema de interface aire-líquido las nanopartículas son dispersadas en seco, lo cual evita la aglomeración de las nanopartículas. Por lo que en este estudio también fue de nuestro interés determinar las diferencias entre los modelos.

10.2 HIPÓTESIS

El cultivo de interface aire-líquido inducirá efectos más atenuados sobre la genotoxicidad y citotoxicidad que el cultivo celular sumergido después de la exposición a nanofibras y nanoesferas de TiO₂. Independientemente del modelo de exposición, la genotoxicidad incrementará con respecto al tiempo de exposición (24 h, 48 h y 72 h) en células epiteliales de pulmón. Además, en ambos cultivos celulares las nanofibras promoverán efectos más preponderantes que las nanoesferas y el daño genotóxico será a través del incremento en especies reactivas de oxígeno y no debido a una interacción directa entre las nanopartículas y el DNA ya que estas no tendrán la capacidad de entrar en el núcleo celular.

10.3 OBJETIVO

Determinar si el cultivo de interface aire-líquido induce efectos similares sobre la genotoxicidad y citotoxicidad que el cultivo sumergido en células epiteliales de pulmón expuestas a nanofibras y nanoesferas de TiO_2 . Determinar si la genotoxicidad se acumula con respecto al tiempo de exposición (24 h, 48 h y 72 h) y determinar si estos dos tipos de nanopartículas logran entrar en el núcleo celular.

Finalmente, comparar los efectos citotóxicos y genotóxicos entre estos dos tipos de nanopartículas.

10.4 MATERIALES Y MÉTODOS

10.4.1 Caracterización de las nanopartículas

Para determinar el número de partículas por intervalo de tamaño se realizó una solución de 1mg/mL de nanopartículas de TiO₂ en agua ultrapura y el tamaño de los aglomerados se determinó con el Nanosight®, cuyo fundamento está en la incidencia de un láser el cual es reflejado y de acuerdo a esta reflexión de la luz se puede determinar el tamaño de las partículas. La determinación del tamaño de acuerdo a la masa de los aglomerados se realizó mediante una centrifugadora de disco (CPS Disc Centrifuge®). El potencial de las nanopartículas para generar radical hidroxilo se determinó mediante resonancia paramagnética electrónica.

10.4.2 Potencial eléctrico de las nanofibras de TiO₂ en suspensión

Las nanofibras y las nanoesferas se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de SFB o en agua ultrapura (1mg/mL). Tanto en tamaño hidrodinámico como el potencial Z se determinaron haciendo una dilución 1:7 de las suspensiones. Se realizaron, al menos, tres lecturas en el Zeta Plus meter Brookehaven.

10.4.3 Cultivo de células de adenocarcinoma pulmonar

Las células epiteliales de pulmón de la línea A549 se obtuvieron de la “*American Type Culture Collection*” (ATCC®) y se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de SFB. El cultivo celular se mantuvo en una atmósfera de humedad al 95% y 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. Las células se cosecharon y sembraron dos veces por semana con tripsina-EDTA al 0.05% por 5 min a 37°C. Luego la solución se centrifugó a 1 500 rpm por 5 min y resuspendidas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB.

10.4.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno en cultivos expuestos a nanofibras y nanoesferas de TiO₂

En el cultivo sumergido, las células se sembraron en placas de 96 pozos con una densidad de 1.5×10^4 y posteriormente se trataron con 2',7'-diclorofluoresceína y calceína por 45 min (Thermo Fisher Scientific, C6827). Los pozos se enjuagaron con PBS y después las células se expusieron a 1, 2, 5, 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂. Para ello, tanto las nanofibras como las nanoesferas se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de SFB (1 mg/mL) y ultrasonificadas por 16 minutos para después ser exponer las células a las diferentes concentraciones. La fluorescencia que produce la diclorofluoresceína cuando los grupos

acetatos se eliminan por esterasas intracelulares debido a la oxidación dentro de la célula se cuantificó en un lector de placas de 96 pozos a 540 nm después de 4 h, 24 h, 48 h y 72 h de exposición. Los datos se presentan como media \pm error estándar de, al menos, tres experimentos independientes.

Desafortunadamente, debido a las indicaciones metodológicas del kit utilizado para determinar las especies reactivas de oxígeno, este no era compatible con la metodología de los cultivos mantenidos en interface aire-líquido, por lo que no se pudo obtener ese dato.

10.4.5 Cuantificación de muerte celular en cultivos expuestos a nanofibras y nanoesferas de TiO₂

Para los cultivos sumergidos, las células se sembraron en placas de 6 pozos con una densidad de 2.5×10^6 y posteriormente se expusieron a 1, 2, 5, 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂. Para ello, tanto las nanofibras como las nanoesferas se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de SFB (1mg/mL) y ultrasonizadas por 16 minutos.

Para los cultivos de la interface aire-líquido, las células se sembraron en *transwells* de placas de 6 pozos con una densidad de 2.5×10^6 y posteriormente se expusieron a 1 h y 4 h en el equipo de VitroCell® para la exposición en la interface aire-líquido. Para la exposición, tanto las nanofibras como las nanoesferas se resuspendieron en agua ultrapura (2.5 mg/mL) y la suspensión se mantuvo en constante agitación. Parte del funcionamiento del aparato es evaporar el agua para que las partículas lleguen a los cultivos en aerosol. De acuerdo con la concentración de la suspensión y el tiempo de exposición, se calcula que los cultivos celulares estuvieron expuestos a 2 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO₂.

El sobrenadante de los cultivos se recuperó a las 24 h, 48 h y 72 h de exposición para cuantificar la enzima lactato deshidrogenasa con el KIT ROCHE 04744926001. Brevemente, los sobrenadantes se mezclaron con diaforasa/NAD⁺ para la catálisis y con cloruro de yodotetrazolio y lactato de sodio para dar color a la reacción. La solución se incubó a 37°C bajo oscuridad por 15 min y leída en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, BioTek) a 492 nm. Los datos se expresan como media \pm error estándar de, al menos, tres experimentos independientes.

10.4.6 Cuantificación de marcadores de genotoxicidad en células expuestas a nanofibras y nanoesferas de TiO₂

Para ambos modelos, tanto el sumergido como el de interface aire-líquido, 2.5×10^6 células se sembraron sobre un cubreobjetos en placas de 6 pozos o *transwells* de placas de 6 pozos,

respectivamente. Posteriormente, los cultivos se expusieron a nanofibras y nanoesferas de TiO₂ por 24 h, 48 h y 72 h como se ha descrito previamente para cada uno de los modelos y posteriormente se recuperaron los cubreobjetos para colocarlos en placas de 12 pozos y ahí se fijaron las células con paraformaldehído-PBS al 4% durante 25 min. Los cubreobjetos se enjuagaron con PBS y se utilizaron para realizar inmunofluorescencias contra pATM y γ -H2AX que son marcadores tempranos de daño a DNA. Brevemente, las células se bloquearon con BSA al 1% por 2 h a temperatura ambiente para después incubarlas con los anticuerpos primarios anti-pATM 1:500 y anti- γ -H2AX 1:500 durante toda la noche a 4°C (Abcam 199726; Abcam 11174, respectivamente). Las células se enjuagaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a TRITC 1:600 y FITC 1:600, respectivamente durante toda la noche a 4°C (Jackson 111-025-003; Jackson 115-095-003, respectivamente). Los cubreobjetos se colocaron en un portaobjetos para observar las laminillas en el microscopio Confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación. Se cuantificó la fluorescencia mediante el software del microscopio confocal y se expresa como media \pm error estándar de, al menos, tres experimentos independientes.

10.4.7 Internalización de nanofibras y nanoesferas de TiO₂ en el núcleo celular de células epiteliales de pulmón

Las laminillas utilizadas para las inmunofluorescencias descritas en el punto anterior, se utilizaron para tomar fotografías 3D en el microscopio confocal (Confocal Microscope Leica TCS SP8 X) a 40X de magnificación. Se tomaron 3 fotografías por cada grupo de, al menos, 2 experimentos independientes. En cada muestra se realizaron 12 cortes de 0.6 μ m de grosor cada uno y con ellos se determinó la localización de las nanofibras y las nanoesferas en el núcleo celular. Los resultados muestran imágenes representativas de cada uno de los tratamientos. La colocalización muestra media \pm error estándar.

10.4.8 Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y se realizó una prueba de Dunnet para determinar diferencias entre las medias. El ciclo celular así como la sensibilidad a cisplatino se evaluó con ANOVA de dos factores. Se consideró el valor de $p < 0.05$ para señalar las diferencias significativas. Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar y las gráficas se realizaron el programa GraphPad Prism 5.

10.5 RESULTADOS

10.5.1 Cantidad y tamaño de nanopartículas, capacidad oxidante y propiedades fisicoquímicas de las nanofibras y nanoesferas de TiO₂

Después de ultrasonificar las nanofibras y las nanoesferas, se determinó la distribución por tamaño. Alrededor de 300×10^6 partículas de nanofibras de TiO₂ tuvieron un tamaño entre 1 y 100 nm, lo que representa el 38.7% de todas las partículas suspendidas. El 61.3% de las partículas restantes tuvieron un tamaño de entre 101 y 400 nm. En cuanto a las nanoesferas de TiO₂, 608×10^6 partículas tuvieron un tamaño entre 1 y 100 nm lo que representa el 66.5% de todas las partículas en suspensión, mientras que el 33.5% restante tuvo un tamaño entre 101 y 500 nm (Figura 24A). Otro método para determinar la distribución por tamaño de las partículas en suspensión, es de acuerdo con la masa relativa. En este resultado, el 87.6% de las nanofibras se encuentran en un intervalo de tamaño entre 250 nm y 900 nm mientras que el 72.5% de las nanoesferas se encuentran en este mismo intervalo (Figura 24B). Se determinó también, si las nanopartículas utilizadas en este estudio eran

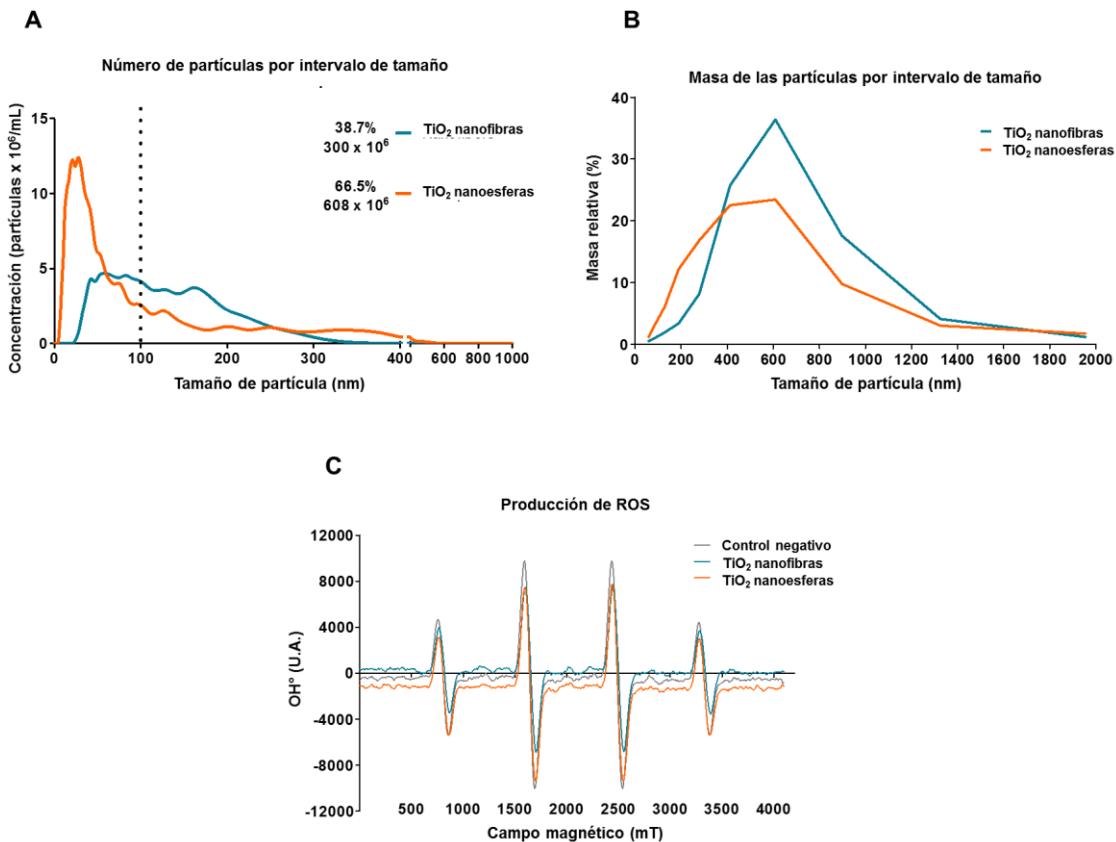


Figura 24. Número de partículas, distribución de tamaño y capacidad oxidante de las nanofibras y nanoesferas de TiO₂. (A) Número de partículas por intervalo de tamaño. (B) Distribución del tamaño de las partículas determinada por la masa relativa. (C) Capacidad de las nanofibras y nanoesferas de TiO₂ para generar radical hidroxilo. Los datos muestran cada una de las cuantificaciones arrojadas por los equipos utilizados. Se realizaron tres experimentos independientes.

capaces de generar de manera acelular radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), que es una de las especies reactivas de oxígeno con mayor capacidad oxidativa. Ni las nanofibras, ni las nanoesferas de TiO_2 tienen la capacidad de generar $\bullet\text{OH}$ (Figura 24C). El potencial Z, el índice de polidispersión y la densidad de las partículas que son parámetros importantes para determinar la toxicidad también se cuantificaron y los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de las nanofibras y las nanoesferas de TiO_2 suspendidas en medio de cultivo celular y agua ultrapura.

Medio	Forma	Tamaño hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)	IPD	Densidad (g/mL)
RPMI suplementado con 10% SFB	Nanofibras	800±64	-9.88±0.6	0.7±0.2	3.25
	Nanoesferas	630±77	-7.44±1.22	1.0	1.05
Agua ultrapura	Nanofibras	571±50	-26.6±4.2	0.7±0.1	1.35
	Nanoesferas	448±41	-24.8±3.3	0.7±0.1	1.05

Los datos muestran media ± error estándar.

IPD: Índice de polidispersión

10.5.2 Las nanofibras de TiO_2 inducen mayor producción de ROS que las nanoesferas de TiO_2 en los cultivos celulares sumergidos

Las células epiteliales de pulmón expuestas a 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 en los cultivos sumergidos incrementaron en un 15±10.6% y 19±4.2% respectivamente en la producción de ROS después de 24 h de exposición. A las 48 h de exposición, los tratamientos de 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 incrementaron la producción de ROS en un 15.2±1.5%, 14±12.3 % y 23±7.3% respectivamente mientras que las 72 h los tratamientos de 1, 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 incrementaron 22.6±2.2%, 24±4.2%, 18.5±14.4% y 31.3±9.1, respectivamente (Figura 25A). Por otro lado, las nanoesferas de TiO_2 no mostraron cambios sino hasta las 48 h de exposición, en donde el tratamiento de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ incrementó 20.1±10.5% la producción de ROS y para las 72 h de exposición los tratamientos de 1, 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ la producción de ROS ya habían incrementado en un 18.9±7.7%, 24.3±11.6%, 13.7±1.1 y 27.4±11.1%, respectivamente (Figura 25B). Curiosamente, ni el tratamiento de 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ni el tratamiento de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ indujeron ningún cambio con ninguna de las dos nanopartículas. En cuanto al tratamiento

de interface aire-líquido no fue posible determinar la producción de ROS por cuestiones metodológicas, ya que las células se siembran en *transwells* que son unas mallas, lo que no permite determinar la fluorescencia.

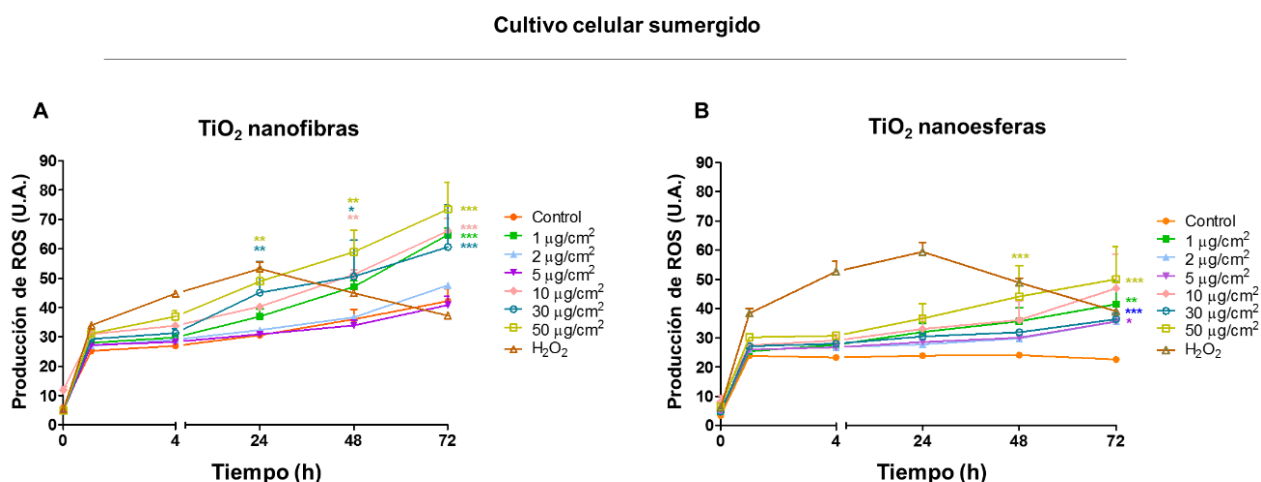


Figura 25. Las nanofibras de TiO_2 inducen mayor producción de ROS que las nanoesferas de TiO_2 . (A) Cuantificación de la producción de ROS en cultivos sumergidos expuestos a nanofibras de TiO_2 en diferentes concentraciones y a 1, 4, 24, 48 y 72 h de exposición. (B) Cuantificación de la producción de ROS en cultivos sumergidos expuestos a nanoesferas de TiO_2 en diferentes concentraciones y a diferentes tiempos. Se realizaron tres experimentos independientes y los datos se expresan como media \pm error estándar. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs control, *** $p < 0.001$ vs control.

10.5.3 La citotoxicidad en el cultivo de interface aire-líquido es más evidente que en el cultivo celular sumergido para las nanofibras pero más atenuante para las nanoesferas de TiO_2

En el cultivo sumergido, el control liberó $32.2 \pm 1.2\%$ a las 24 h de mientras que las concentraciones de 30 y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 indujeron la liberación del $39.3 \pm 0.7\%$ y $41.8 \pm 1.3\%$ de LDH. A las 48 h de exposición, las células expuestas a 10, 30 y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 liberaron $70.8 \pm 1.1\%$, $84.1 \pm 0.9\%$ y $101.6 \pm 2.3\%$ de LDH, respectivamente, y para las 72 h de exposición las células epiteliales de pulmón ya mostraban liberación de LDH de $103.1 \pm 1.0\%$, 119.5 ± 1.9 y $146.7 \pm 1.8\%$ en los tratamientos de 10, 30 y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 , respectivamente (Figura 26A). Los efectos fueron más discretos cuando las células se expusieron a nanoesferas de TiO_2 en el cultivo sumergido, ya que a las 24 h las células no muestran cambios, y a las 48 h de exposición las células expuestas a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ tuvieron $81.03 \pm 0.5\%$ en comparación de las células control que mostraron $65.7 \pm 0.6\%$. Sin embargo, a las 72 h de tratamiento, las células expuestas a 2, 30 y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanoesferas de TiO_2 tuvieron $75.0 \pm 1.0\%$, $74.0 \pm 2.6\%$ y $81.0 \pm 0.5\%$, respectivamente (Figura 26B).

El cultivo de interface aire-líquido, mostró que la liberación de LDH en células que habían sido expuestas a nanofibras de TiO₂ era incluso mayor que la liberación en el cultivo celular sumergido ya que con la concentración de 10 µg/cm² hubo un incremento incluso mayor que el observado con la concentración de 50 µg/cm² en el cultivo sumergido a las 48 y 72 h.

Las células expuestas a 10 µg/cm² de nanofibras de TiO₂ en el cultivo de interface aire-líquido, tuvieron en la parte inferior del *transwell* 137±4.8% y 165±5.3% a las 48 h y 72 h, respectivamente (Figura 26C), mientras que en la parte superior del *transwell* hubo 137±7.1% y 170±9.5% a las 48 y 72 h de exposición, respectivamente (Figura 26E).

Sin embargo, el cultivo de interface aire-líquido mostró que los efectos en la liberación de LDH en células expuestas a nanoesferas de TiO₂ eran más atenuados que en el cultivo celular sumergido ya que ni en la parte superior ni en la parte inferior del *transwell* hubo diferencias en comparación con el control (Figura 26D y F).

Cultivo celular sumergido

Cultivo celular de interface aire-líquido

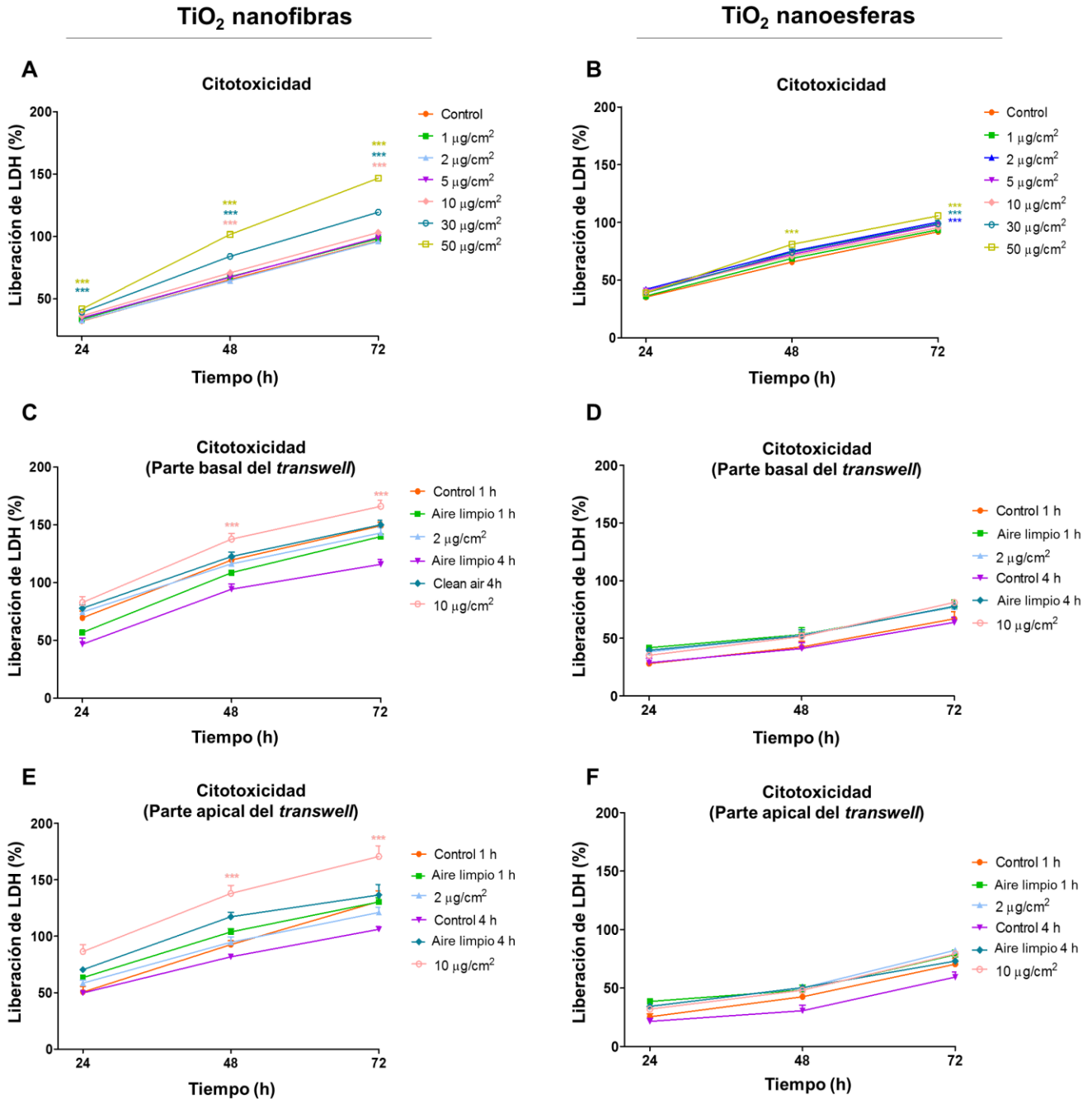


Figura 26. Las nanofibras de TiO₂ inducen mayor muerte celular que las nanoesferas de TiO₂ tanto en modelo sumergido como en el modelo de interface aire-líquido. Cuantificación de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de cultivos sumergidos expuestos a (A) nanofibras de TiO₂ y (B) nanoesferas de TiO₂ a diferentes concentraciones y a 24, 48 y 72 h de exposición. Cuantificación de la liberación de la LDH en el sobrenadante de la parte inferior de los *transwells* de cultivos de interface aire-líquido expuestos a (C) nanofibras de TiO₂ y (D) nanoesferas de TiO₂ así como en los sobrenadantes de la parte superior de los *transwells* de cultivos de interface aire-líquido expuestos a (E) nanofibras de TiO₂ y (F) nanoesferas de TiO₂ a diferentes concentraciones y a 24, 48 y 72 h de exposición. Se realizaron tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar. *p<0.05 vs control, **p<0.01 vs control, ***p<0.001 vs control.

10.5.4 La genotoxicidad en células expuestas a nanofibras de TiO₂ es mayor en el cultivo de interface aire-líquido que en el cultivo celular sumergido

Después de 24 h de exposición a nanofibras de TiO₂, se cuantificó la expresión de pATM y γ H2AX la cual fue más evidente en el cultivo de interface aire-líquido que en el cultivo sumergido (Figura 27A y C) ya que en el tratamiento de 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del cultivo de interface aire-líquido hubo 4313 \pm 208 U.A. mientras que para la misma concentración pero en células expuestas en el cultivo sumergido hubo 2764 \pm 92 U.A., es decir 156% más expresión de pATM en el primer modelo de cultivo celular (Figura 27B y D). En el tratamiento de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se observó el mismo efecto para la expresión de pATM ya que en el cultivo de interface aire-líquido hubo 15797 \pm 895 U.A., mientras que en el mismo tratamiento pero del cultivo celular sumergido hubo 3663 \pm 135 U.A., es decir 431.2% más expresión de pATM en el primer modelo celular (Figura 27B y D). En cuanto a la expresión de γ H2AX, el efecto fue aún más evidente, ya que el cultivo celular sumergido no mostró cambios en las concentraciones de 2 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mientras que en el cultivo celular de interface aire-líquido la expresión fue de 3397 \pm 181 U.A. y 14422 \pm 842 U.A., respectivamente (Figura 27B y D). Sin embargo, se puede observar un ligero incremento de 38% en la expresión de γ H2AX en la concentración más alta utilizada en el cultivo celular sumergido. Es importante mencionar que la cantidad de fibras observadas en el cultivo celular sumergido es mucho mayor a la cantidad de fibras observadas en el cultivo celular de interface aire-líquido (Figura 27A y C).

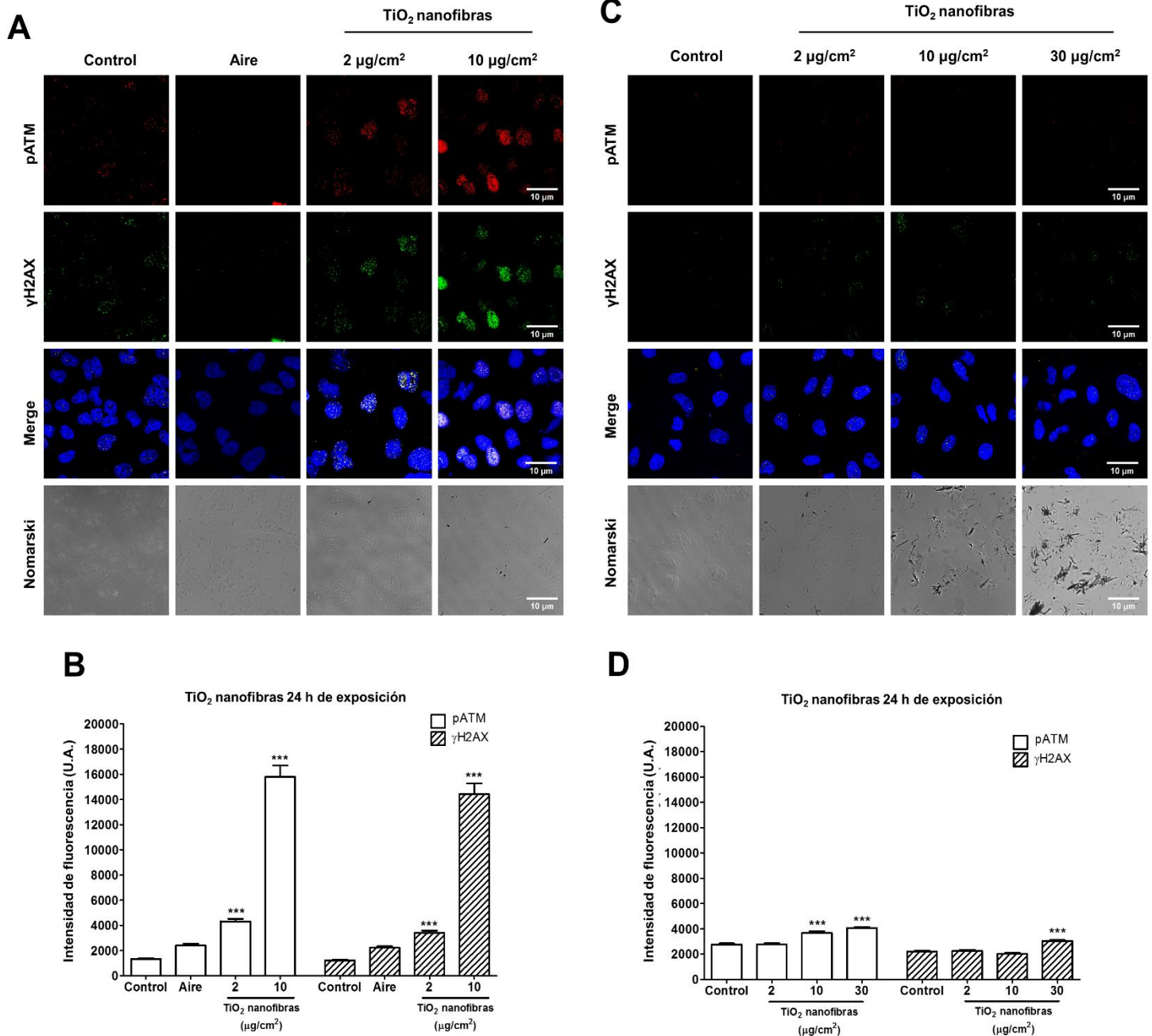


Figura 27. El cultivo celular de interface aire-líquido muestra mayor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 24 h a nanofibras de TiO₂. (A) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanofibras de TiO₂ en un cultivo celular de interface aire-líquido después de 24 h de exposición. (B) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanofibras de TiO₂ en un cultivo celular sumergido después de 24 h de exposición. (C) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular de interface aire-líquido. (D) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular sumergido. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar. **p<0.01 vs control, ***p<0.001 vs control.

Después de 48 h de exposición a las nanofibras de TiO_2 , las células mostraron el mismo patrón que las células expuestas a 24 h, por lo que se observó mayor expresión de pATM en las células cultivadas bajo la interface de aire-líquido que las células cultivadas de manera sumergida en el medio de cultivo (Figura 28A y C). El tratamiento de $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ incrementó de 2219 ± 145 U.A. en el control a 17199 ± 538 U.A. la expresión de pATM, es decir 775%. En el cultivo sumergido, la expresión de esta misma proteína incrementó de 4482 ± 40 U.A. en el control a 7391 ± 24 U.A. en el tratamiento de $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, es decir 165% más expresión (Figura 28B y D). El tratamiento de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ también mostró mayor expresión de pATM en el cultivo de doble interface que el cultivo sumergido ya que en el primero la expresión fue de 8563 ± 789 U.A. mientras que en el segundo fue de 7080 ± 784 U.A. que de acuerdo con sus respectivos controles, la expresión aumenta 385% y 158%, respectivamente (Figura 28B y D). Un efecto similar, pero menos evidente fue determinado para la expresión de γH2AX ya que el tratamiento de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ incrementó la expresión un $795 \pm 3\%$ en el cultivo celular de doble interface, mientras que en el cultivo celular sumergido la expresión de esta proteína incrementó $157 \pm 10\%$ y $152 \pm 7\%$ en los tratamientos de 2 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente (Figura 28B y D). A pesar de que el tratamiento de $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 en el cultivo celular de interface aire-líquido incrementó con respecto al control, no tiene diferencias con el tratamiento de la sola exposición al aire limpio.

Tanto pATM como γH2AX incrementaron en el tratamiento de $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en el cultivo sumergido con $169 \pm 6\%$ y $152 \pm 7\%$, respectivamente (Figura 28D). Lo cual indica, que ni siquiera con la concentración de $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se logra un incremento en la expresión de estas dos proteínas como se observa en el cultivo de interface aire-líquido a las 48 h de exposición a nanofibras de TiO_2 .

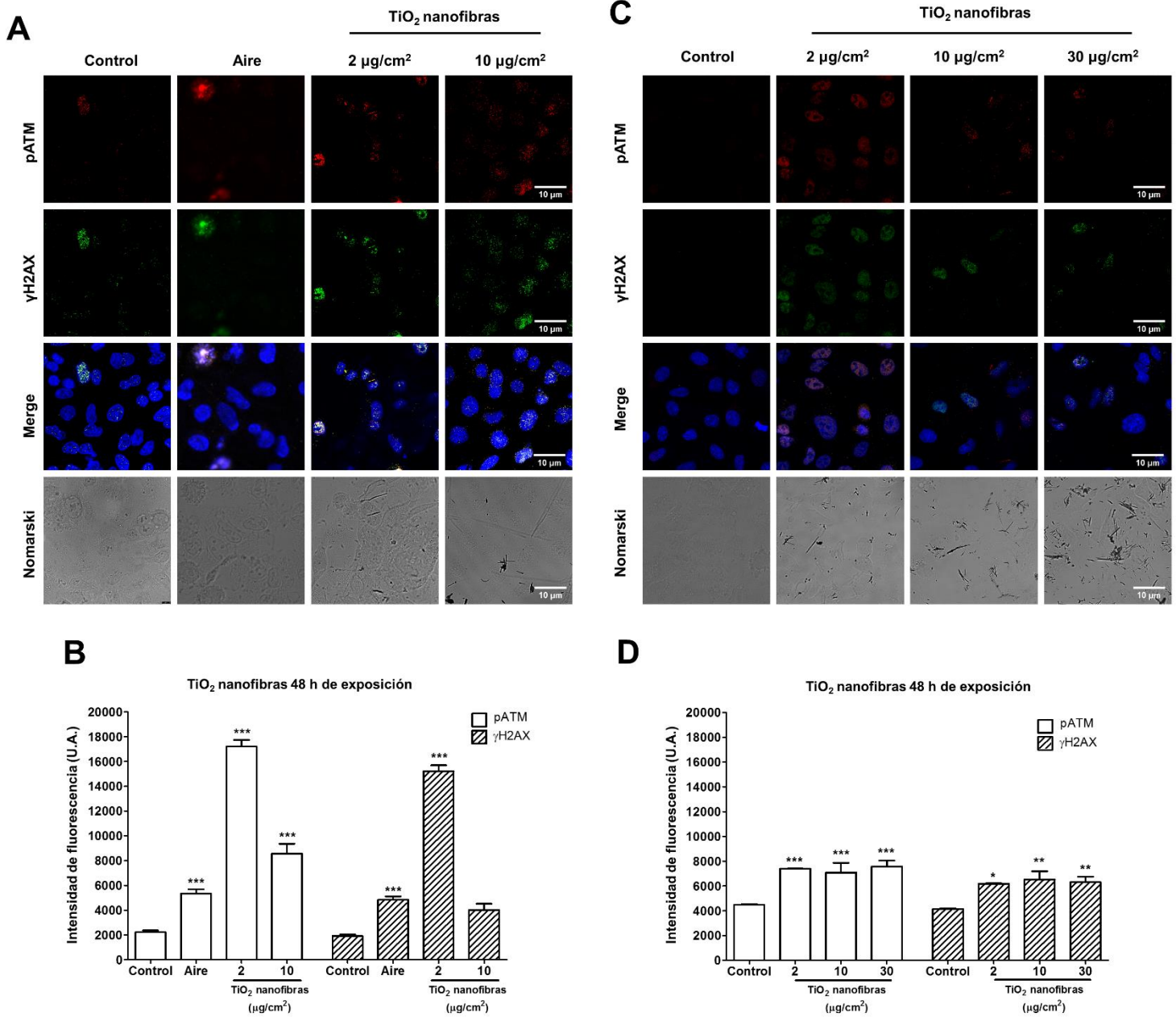


Figura 28. El cultivo celular de interface aire-líquido muestra mayor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 48 h a nanofibras de TiO₂. (A) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanofibras de TiO₂ en un cultivo celular de interface aire-líquido después de 48 h de exposición. (B) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanofibras de TiO₂ en un cultivo celular sumergido después de 48 h de exposición. (C) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular de interface aire-líquido. (D) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular sumergido. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar. *p<0.05 vs control, **p<0.01 vs control, ***p<0.001 vs control.

A las 72 h de exposición a nanofibras de TiO_2 , los cultivos mostraron exactamente el mismo comportamiento ya que la expresión de la proteína pATM, después de la exposición a 2 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 en el cultivo de interface aire-líquido fue de 6518 ± 668 U.A. y 10319 ± 936 U.A., lo que representa un incremento de $254 \pm 10\%$ y $403 \pm 9\%$ comparado con el control que mostró 2561 ± 206 U.A. de expresión (Figura 29A y C). Mientras que en el cultivo celular sumergido la expresión de pATM a las 72 h de exposición fue de 12812 ± 794 y de 14970 ± 1242 lo que representa un incremento de $230 \pm 6\%$ y $269 \pm 8\%$ comparado con el control que mostró 5553 ± 450 U.A. (Figura 29B y D). En cuanto a la expresión de γH2AX , las células expuestas a exposición a 2 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 en el cultivo de interface aire-líquido mostraron $256 \pm 10\%$ y $391 \pm 9\%$, respectivamente (Figura 29B), mientras que en el cultivo sumergido las células expuestas a estas dos mismas concentraciones mostraron una expresión de $235 \pm 6\%$ y $316 \pm 8\%$ (Figura 28D), lo cual repite el patrón observado en los tiempos de 24 h y 48 h. Nuevamente, ni siquiera la concentración de $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 en el cultivo sumergido alcanzó los efectos que el cultivo de doble interface, ya que en este tratamiento la expresión de pATM fue de $378 \pm 5\%$ mayor que el control y de γH2AX fue $203 \pm 7\%$ mientras que con una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanofibras de TiO_2 en el cultivo de interface aire-líquido alcanzó $403 \pm 9\%$ para pATM y $391 \pm 9\%$ para γH2AX (Figura 29B y D).

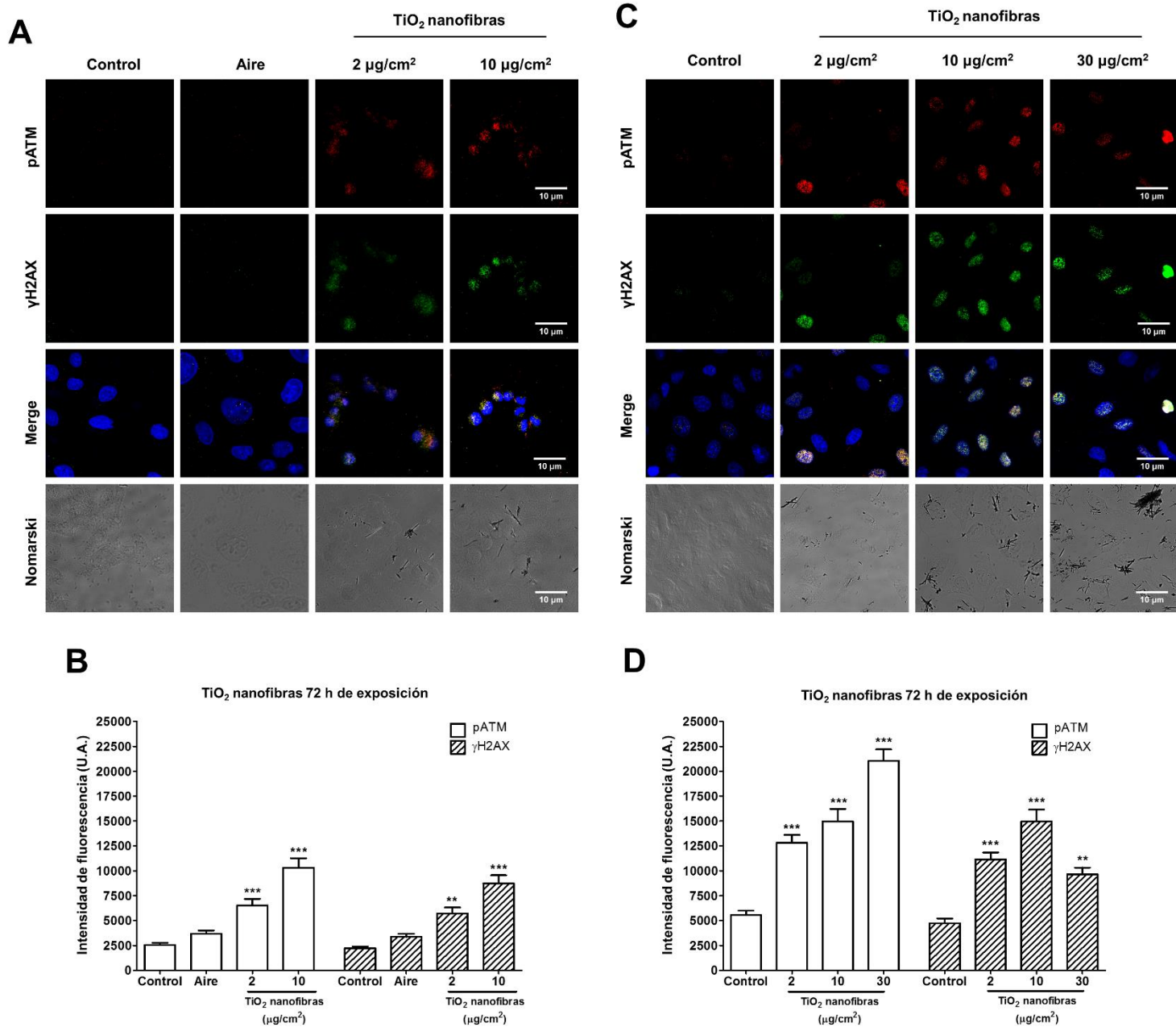


Figura 29. El cultivo celular de interface aire-líquido muestra mayor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 72 h a nanofibras de TiO₂. (A) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanofibras de TiO₂ en un cultivo celular de interface aire-líquido después de 72 h de exposición. (B) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanofibras de TiO₂ en un cultivo celular sumergido después de 72 h de exposición. (C) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular de interface aire-líquido. (D) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular sumergido. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar. *p<0.05 vs control, **p<0.01 vs control, ***p<0.001 vs control.

10.5.5 La genotoxicidad en células expuestas a nanoesferas de TiO₂ es menor en el cultivo de interface aire-líquido que en el cultivo celular sumergido

La exposición a nanoesferas de TiO₂ muestra menor expresión en los marcadores de daño a DNA en el cultivo de interface aire-líquido que en el cultivo sumergido a las 24 h de exposición (Figura 30A y C). En el cultivo de interface aire-líquido, las células control tuvieron una expresión de 3176±232 U.A. para la proteína pATM mientras que el tratamiento de 2 µg/cm² de nanoesferas de TiO₂ mostró 5985±307 U.A., lo que representa un incremento del 188±5% y el tratamiento de 10 µg/cm² de nanoesferas de TiO₂ no presentó cambios (Figura 30B). Por el contrario, la exposición de los cultivos en el modelo sumergido mostró en los controles una expresión de 1413±85 U.A. la cual se vio incrementada en los tratamientos de 2, 10 y 30 µg/cm² a 3201±128, 4793±349 y 3361±201 U.A., respectivamente, lo que representa un incremento del 226±4%, 339±7% y 238±6%, respectivamente (Figura 30D). La proteína γH2AX mostró un patrón un poco más heterogéneo al expresar 5985±307 U.A. en el tratamiento de 2 µg/cm² de nanoesferas de TiO₂ en comparación con el control que expresó 3176±232 U.A., lo que representa un incremento del 204±6% en células expuestas en el cultivo de interface aire-líquido, y al igual que en la expresión de pATM el tratamiento de 10 µg/cm² no mostró cambios en la expresión de γH2AX (Figura 30B). Por otro lado, en el cultivo sumergido las células expuestas a 2 µg/cm² de nanoesferas de TiO₂ no presentaron ningún cambio mientras que los tratamientos de 10 y 30 µg/cm² de nanoesferas de TiO₂ mostraron una expresión de 2497±188 U.A. y 2471±149 en comparación con el control quien mostró una expresión de 1263±68 U.A., lo que representa un incremento del 197±7% y 195±6 en los tratamientos, respectivamente (Figura 30D).

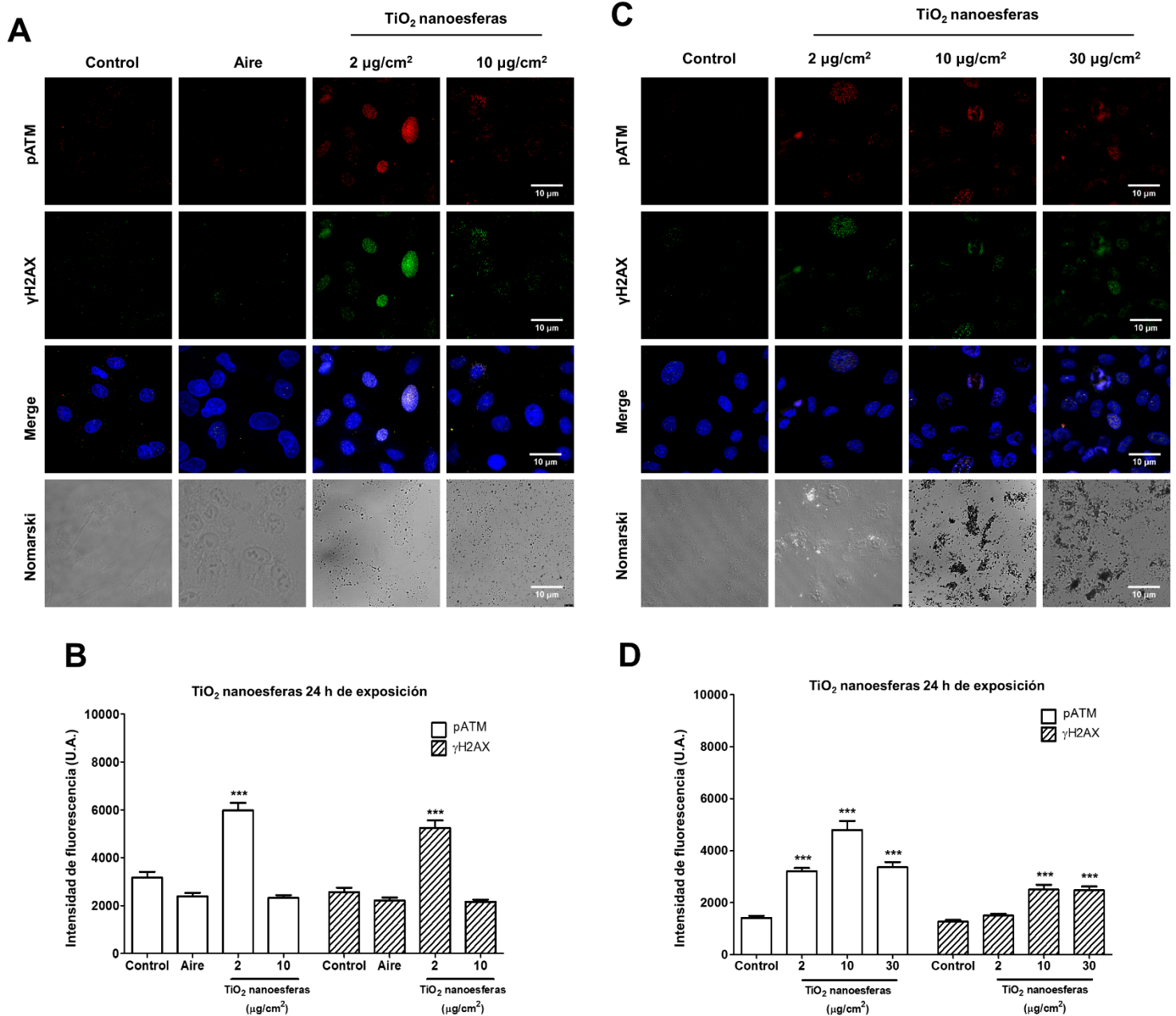


Figura 30. El cultivo celular de interface aire-líquido muestra menor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 24 h a nanoesferas de TiO₂. (A) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanoesferas de TiO₂ en un cultivo celular de interface aire-líquido después de 24 h de exposición. (B) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanoesferas de TiO₂ en un cultivo celular sumergido después de 24 h de exposición. (C) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular de interface aire-líquido. (D) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular sumergido. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar. ***p<0.001 vs control.

A las 48 h de exposición a las nanoesferas de TiO_2 en el cultivo de interface aire-líquido las células que se expusieron a solo aire limpio presentaron un incremento de $204\pm 6\%$ en la expresión de pATM y γH2AX lo cual a pesar de que los tratamientos de 2 y $10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ incrementaron la expresión de estas dos proteínas en un $278\pm 6\%$ y $284\pm 9\%$ para pATM, respectivamente, y $287\pm 6\%$ y $283\pm 9\%$ para γH2AX no podemos atribuirlo al tratamiento con las nanoesferas, sino al incremento que indujo la sola exposición al aire limpio (Figura 31A y B). Por otro lado, en el cultivo celular sumergido solo el tratamiento de $10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ incrementó la expresión de pATM y de γH2AX con una expresión de 11711 ± 465 U.A. y 8528 ± 328 , respectivamente, lo que representa un incremento de $336\pm 4\%$ y de $275\pm 4\%$, respectivamente (Figura 31C y D).

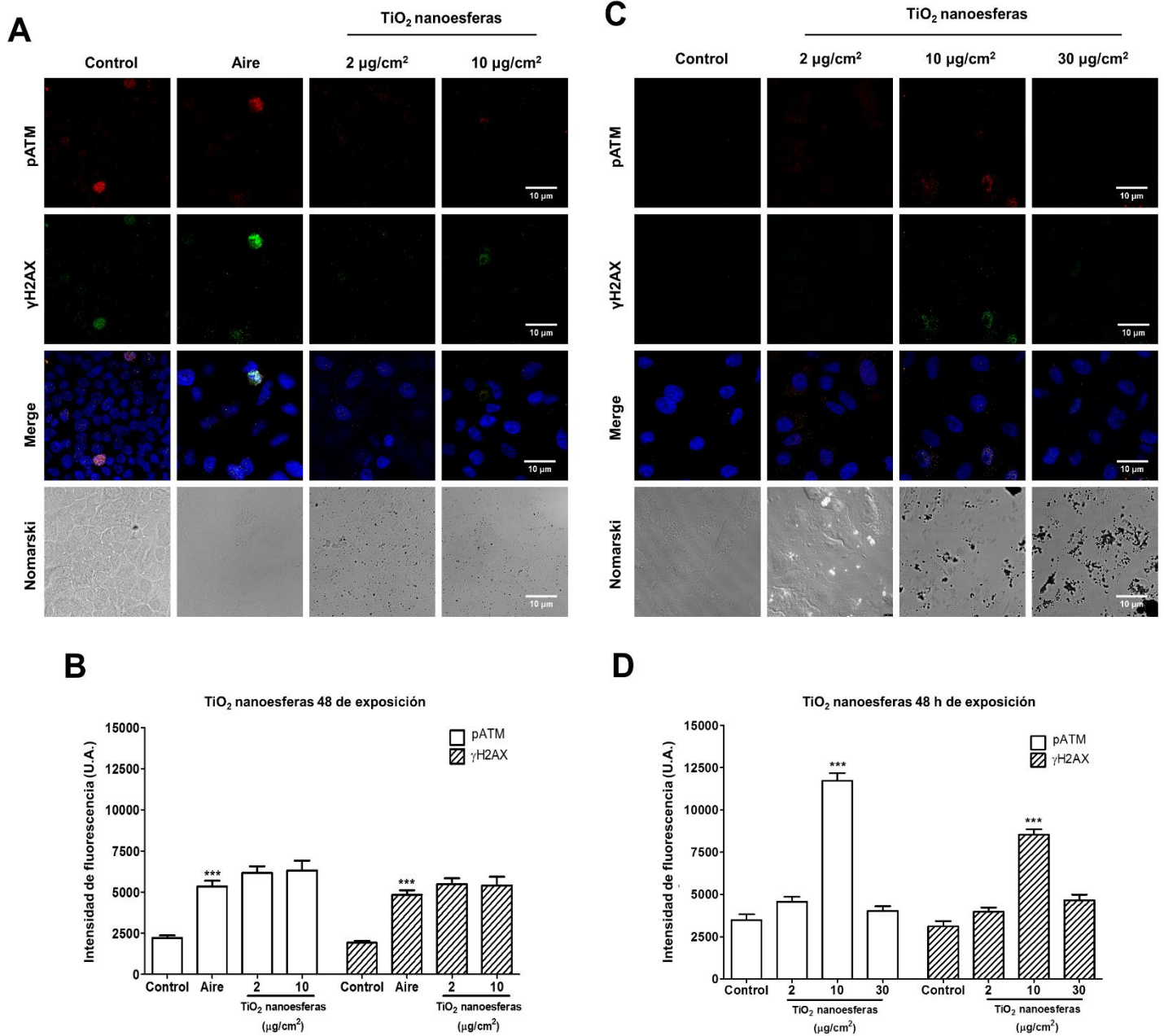


Figura 31. El cultivo celular de interface aire-líquido muestra menor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 48 h a nanoesferas de TiO₂. (A) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanoesferas de TiO₂ en un cultivo celular de interface aire-líquido después de 48 h de exposición. (B) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanoesferas de TiO₂ en un cultivo celular sumergido después de 48 h de exposición. (C) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular de interface aire-líquido. (D) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular sumergido. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar. ***p<0.001 vs control.

A las 72 h, las células expuestas en el cultivo de interface aire-líquido nuevamente mostraron incremento de $173\pm 8\%$ y $205\pm 6\%$ en la expresión de pATM y de γ H2AX, respectivamente, tan solo con la exposición al aire limpio (Figura 32A y B). Sin embargo, aun así el tratamiento de $10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ incrementó todavía $141\pm 7\%$ más la expresión de pATM, mientras que para la expresión de γ H2AX no hubo cambios en la expresión en las células del cultivo en interface aire-líquido (Figura 32B). Por el contrario, el cultivo sumergido mostró cambios en la expresión de pATM en los tratamientos de 2, 10 y $30\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ con $182\pm 8\%$, $192\pm 6\%$ y $189\pm 8\%$ de incremento (Figura 32C y D). γ H2AX también mostró incremento en la expresión a las 72 h de exposición a nanoesferas de TiO_2 con un aumento de $162\pm 10\%$, $214\pm 6\%$ y $170\pm 8\%$ en los tratamientos de 2, 10 y $30\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente (Figura 32D).

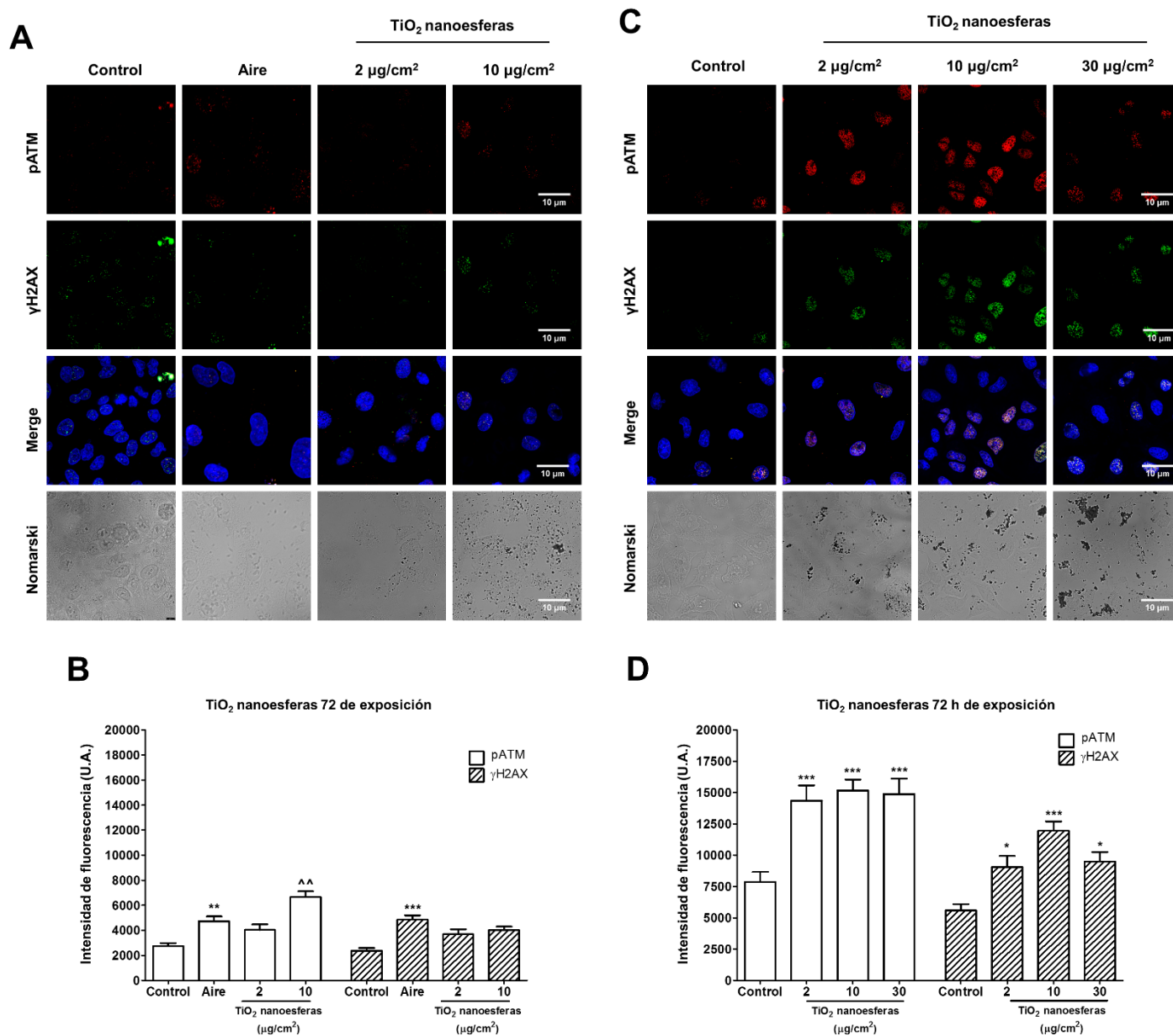


Figura 32. El cultivo celular de interface aire-líquido muestra menor genotoxicidad que el cultivo sumergido de células epiteliales de pulmón expuestas por 72 h a nanoesferas de TiO₂. (A) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanoesferas de TiO₂ en un cultivo celular de interface aire-líquido después de 72 h de exposición. (B) Expresión de pATM y γH2AX en células epiteliales expuestas a nanoesferas de TiO₂ en un cultivo celular sumergido después de 72 h de exposición. (C) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular de interface aire-líquido. (D) Cuantificación de la expresión de pATM y γH2AX en el cultivo celular sumergido. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes y los datos se expresan como media ± error estándar. ***p<0.001 vs control, ^^p<0.05 vs aire.

10.5.6 En el cultivo celular sumergido y en el cultivo celular de interface aire-líquido las nanofibras de TiO₂ logran entrar al núcleo celular

Para responder si parte de la genotoxicidad es inducida por la interacción directa entre el DNA y las nanopartículas nos preguntamos si era posible que estas partículas atravesaran el poro nuclear y quedar internalizadas en el núcleo de las células, para así interactuar de manera directa con el DNA. Lo primero que evaluamos fue el porcentaje de colocalización entre el núcleo y las partículas por microscopía confocal. Después de 72 h de exposición, se observa en las imágenes la presencia de nanofibras colocalizando con el núcleo (Figura 33Ai), aunque con estas imágenes no se puede determinar si las partículas están dentro o sobre el núcleo es por ello que lo primero que se realizó fue determinar el porcentaje de colocalización de las nanofibras en el núcleo de células expuestas, el cual en el modelo de interface aire-líquido fue de $13.5\pm 3\%$ para el tratamiento de $10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 33A ii) mientras que no hubo un porcentaje significativo de colocalización con las células expuestas a $2\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 33A ii). En el cultivo sumergido, la colocalización de las nanofibras en el núcleo es muchísimo más evidente, y el hecho de que también hay mayor número de partículas en el cultivo es indiscutible (Figura 33A iii). A pesar de haber más partículas en el cultivo, el porcentaje de colocalización para el tratamiento de $10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ es muy similar con $10.0\pm 0.5\%$, sin embargo el tratamiento de $2\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mostró también un porcentaje de $10.2\pm 0.7\%$, y en el tratamiento de $30\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $19.6\pm 1.5\%$ (Figura 33A iv).

En cuanto a las nanoesferas, se observa que en el cultivo de interface aire-líquido hay pocas partículas colocalizando con el núcleo (Figura 33B i) lo cual es confirmado por el bajo porcentaje de colocalización en las células expuestas a 2 y $10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ el cual fue de $4.4\pm 0.6\%$ y $4.2\pm 0.8\%$, respectivamente (Figura 33B ii). Por el contrario, en el cultivo celular sumergido se observa una gran cantidad de partículas en el cultivo (Figura 33B iii), de las cuales el $7.2\pm 1\%$ y $10.9\pm 1\%$ se encuentran colocalizando con el núcleo de las células expuestas a 2 y $10\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que para las células expuestas a la concentración de $30\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ el porcentaje de colocalización fue de $15.7\pm 1\%$ (Figura 33B iv).

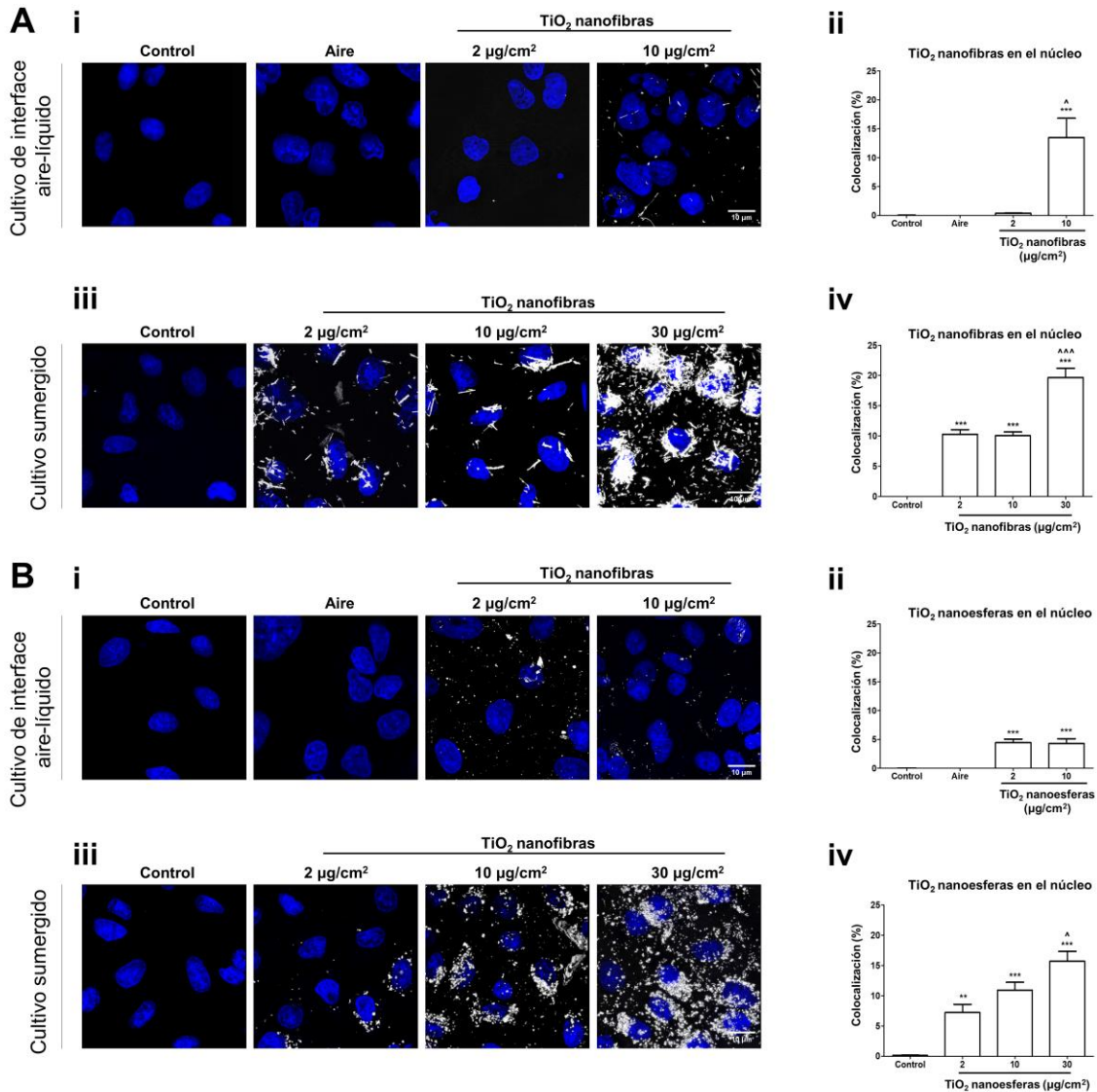


Figura 33. El modelo de interface aire-líquido muestra menor localización de ambas nanopartículas en el núcleo. (Ai) Cultivo de interface aire-líquido expuesto a nanofibras de TiO₂ por 72 h donde se observa que las partículas se encuentran alrededor o sobre el núcleo celular. (Aii) Cuantificación de la colocalización de las nanofibras con el núcleo celular. (Aiii) Cultivo celular sumergido expuesto a nanofibras de TiO₂ donde se observa una mayor cantidad de partículas en comparación con el modelo de aire-líquido las cuales se hallan alrededor o sobre el núcleo celular. (Aiv) Cuantificación de la colocalización de las nanofibras con el núcleo celular. (Bi) Cultivo de interface aire-líquido expuesto a nanoesferas de TiO₂ durante 72 h donde se observa que las partículas se encuentran alrededor o sobre el núcleo celular. (Bii) Cuantificación de la colocalización de las nanoesferas con el núcleo celular. (Biii) Cultivo celular sumergido expuesto a nanoesferas de TiO₂ donde se observa una mayor cantidad de partículas en comparación con el modelo de aire-líquido las cuales se hallan alrededor o sobre el núcleo celular. (Biv) Cuantificación de la colocalización de las nanoesferas con el núcleo celular. Tres experimentos independientes fueron realizados. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs control, *** $p < 0.001$ vs control, ^ $p < 0.01$ vs 2 µg/cm², ^^ $p < 0.01$ vs 2 µg/cm².

A pesar de tener esta evidencia, aún queda la interrogante de si las nanopartículas se encuentran por encima del núcleo o dentro de él. Por esta razón, y con ayuda del microscopio confocal, se tomaron múltiples fotografías a diferente altura de la laminilla, para así captar en cada imagen un sitio específico de la célula. Es decir, en una célula que mide 20 μm de ancho se tomaría una foto cada 2 μm teniendo como resultado 10 fotografías. Después de eso, se hace una reconstrucción 3D y se puede observar si las partículas están dentro del núcleo (Figura 34). Lo que observamos con este tipo de microfotografías es que las nanofibras de TiO_2 logran entrar en el núcleo celular sin importar si las células fueron expuestas en un cultivo celular de interface aire-líquido (Figura 34 Ai) o en un cultivo celular sumergido (Figura 34 Aii). Sin embargo, las imágenes no arrojan evidencia tan convincente para las nanoesferas de TiO_2 , sin importar si el modelo es de interface aire-líquido (Figura 34 Bi) o sumergido ya que las nanopartículas se ven sobre el núcleo pero no precisamente dentro del núcleo (Figura 34 Bii).

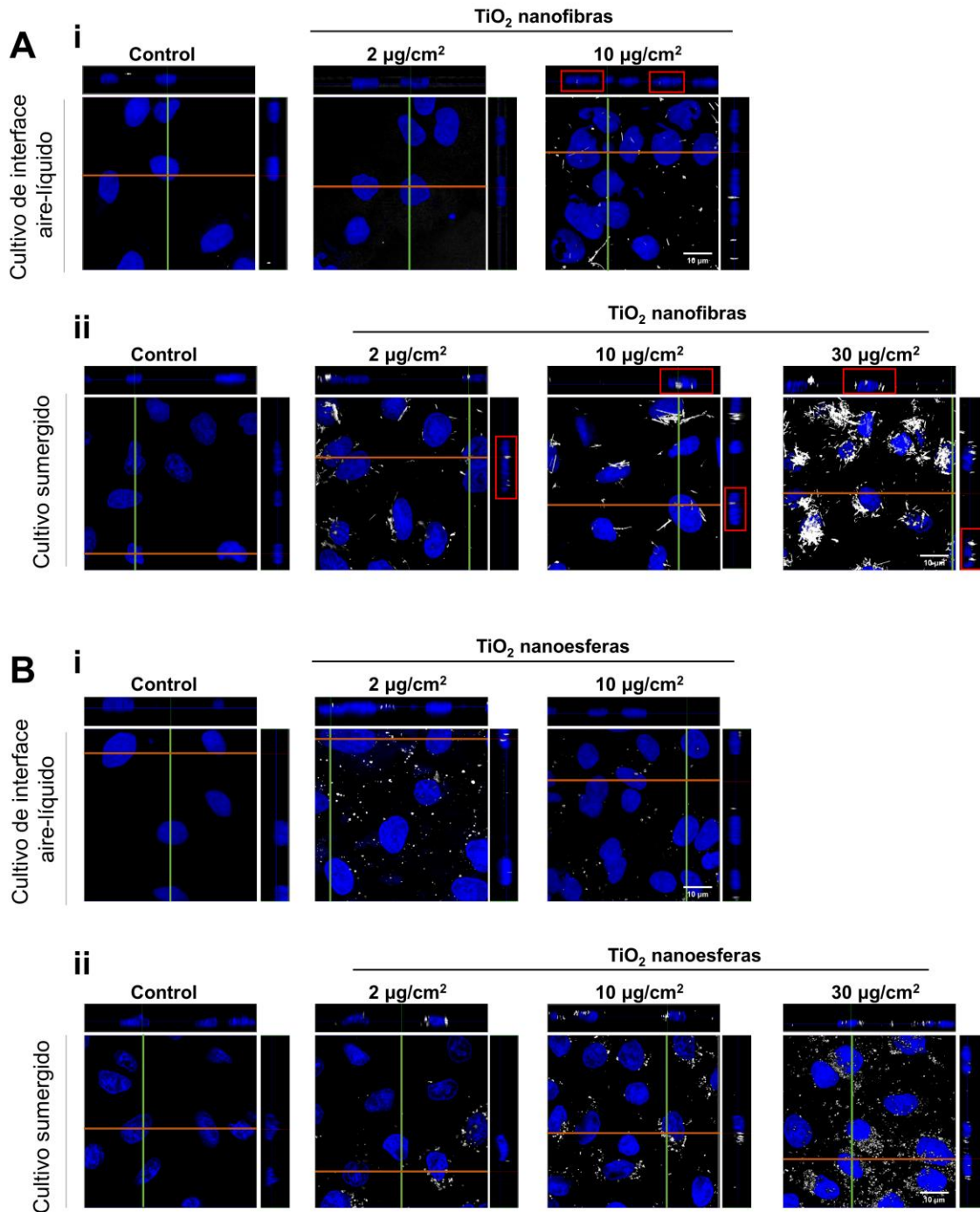


Figura 34. Tanto en el modelo de interface aire-líquido como en el sumergido las nanofibras de TiO₂ logran entrar en el núcleo. (Ai) Cultivo de interface aire-líquido expuesto a nanofibras de TiO₂ por 72 h donde se observa que las partículas se encuentran dentro del núcleo celular (recuadros rojos). (Aii) Cultivo celular sumergido expuesto a nanofibras de TiO₂ donde la internalización de las nanofibras también es evidente (recuadros rojos). (Bi) Cultivo de interface aire-líquido expuesto a nanoesferas de TiO₂ por 72 h donde no es clara la internalización en el núcleo. (Bii) Cultivo celular sumergido expuesto a nanoesferas de TiO₂ donde la internalización de las nanofibras tampoco es evidente.

10.6 DISCUSIÓN

La evaluación de la toxicidad de las nanopartículas se ha tornado un tanto complicada debido a las múltiples variables que se deben controlar como el tamaño, la forma, la carga, la densidad entre otras, a las cuales además se suman las características que las nanopartículas adquieren cuando son suspendidas en un líquido, como medio de cultivo, agua o fluidos biológicos. Tan solo comparar estudios *in vitro* se ha vuelto muy complejo ya que para que sean comparables, se debe tomar en cuenta el tipo de medio de cultivo, la concentración de suero fetal bovino y el tiempo que las partículas son sonicadas para su dispersión ya que de eso va a depender el tamaño hidrodinámico, el potencial Z y la densidad de las partículas lo cual tienen implicación en la toxicidad. Para ello, se ha buscado desarrollar métodos estandarizados como los propuestos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) que sugiere que la dispersión de las partículas debe ser en agua, sin embargo no se menciona el tiempo de sonicación por ejemplo. Los esfuerzos también han sido puestos en buscar sistemas con los que los animales o incluso los cultivos celulares puedan ser expuestos a los diferentes nanomateriales por aerosol, en donde las partículas no están suspendidas en un líquido, lo cual evita precisamente los inconvenientes ya mencionados. El más exitoso hasta ahora lo diseñó la marca InvitroCell® y lo llamó “*Air-Liquid Interface*” o interface aire-líquido, en donde las células son expuestas a nanopartículas en forma de aerosol, tal como sucede en los ambientes ocupacionales. Además, es importante mencionar que el depósito de las partículas no es igual en un cultivo sumergido que en un cultivo de interface aire-líquido, ya que en este último las partículas se encuentran en constante movimiento por el aire, mientras que en el cultivo sumergido todas las nanopartículas se depositan (Guo et al., 2018), lo cual se observó en nuestros cultivos. Mediante microscopía de contraste interdifereencial o microscopía confocal, se observó que en general, sin importar si las células habían sido expuestas a nanoesferas o nanofibras o a diferentes concentraciones, siempre en los cultivos sumergidos hubo un mayor depósito de partículas que en los cultivos de interface aire-líquido. Un análisis con ICP-MS determinó que la eficiencia de depósito en el cultivo de interfaces es del 40% (Aufderheide et al., 2011), sin embargo esto va a depender del tamaño y la masa de las partículas. Esto es importante a la hora de extrapolar condiciones entre un cultivo *in vitro* y un modelo *in vivo*, los cuales han mostrado gran similitud, al menos en cuanto al depósito de las partículas, tanto en cantidad como en el tipo celular (Guo et al., 2018).

Para determinar la toxicidad de las nanopartículas, el sistema de interface aire-líquido ha mostrado mayor sensibilidad, debido a que aunque el depósito de partículas no es el mismo que en el modelo sumergido los efectos son similares lo cual lo vuelve un sistema más sensibles, lo cual también ha sido demostrado con nanopartículas de níquel (Latvala et al., 2017) y en nuestro estudio con ambas nanopartículas de TiO₂.

Sin embargo, aunque este sistema tiene muchas ventajas, la principal desventaja es que la sola exposición al aire puede inducir efectos adversos como la expresión de genes relacionados al estrés (Guo et al., 2018) y en nuestro caso observamos que la sola exposición al aire, en un máximo tiempo de exposición que son 4 horas, hubo daño a DNA señalado por pATM y γ H2AX. Otra gran desventaja es que este sistema desarrollado por VitroCell® no está hecho para partículas fibrosas y es que está bien determinado que las condiciones aerodinámicas y el depósito entre las partículas esféricas o amorfas es muy diferente a las fibrosas. Las cuatro diferentes formas de depósito de las nanopartículas son: intercepción, impactación, sedimentación y difusión. Mientras que las partículas esféricas o amorfas se depositan principalmente por difusión, las fibras se depositan principalmente por intercepción, sin embargo determinar cómo, cuándo y dónde interceptarán no es sencillo de simular. Esto es importante porque el hecho de que haya menos fibras en los cultivos expuestos en el modelo de interface aire-líquido también puede deberse a que el sistema no está diseñado para controlar la intercepción de las fibras.

Este mismo problema lo presenta un software desarrollado hace aproximadamente 8 años por *Applies Research Associates Inc* una empresa de ingeniería e investigación científica dedicada a resolver problemas nacionales críticos para mejorar la seguridad y el estilo de vida. Este software llamado “Modelo de dosimetría de partículas de trayectoria múltiple” (MPPD por sus siglas en inglés) puede determinar el depósito de las partículas inhaladas (desde 1nm hasta 100 μ m) en las diferentes regiones de las vías respiratorias dependiendo del tamaño y la forma de las partículas, densidad, carga, la especie en cuestión (rata, ratón, humano, mono, cerdo o conejo), el número de inhalaciones por minuto entre otras variables. También, este software determina el tiempo que tarda la eliminación de estas partículas del pulmón y con todo eso puede calcular las cantidades que se depositan y ha sido de gran utilidad para la nanotoxicología ya que con él se han podido hacer extrapolaciones entre especies e incluso entre modelos *in vivo* y modelos *in vitro*, así como elegir concentraciones

más realistas para evaluar la toxicidad de las partículas. Sin embargo, este software no está diseñado para evaluar el depósito y la eliminación de partículas fibrosas.

Por otro lado, en los dos modelos de cultivo celular, nosotros mostramos que las nanofibras inducen mayor toxicidad que las nanoesferas a pesar de que las nanoesferas son muy pequeñas y por ende se esperaba que el daño a DNA fuera alto. Habría que comparar en el futuro, el área superficial de estos dos tipos de nanopartículas para ver qué tanto difieren y si la respuesta en la toxicidad está en parte determinada por este parámetro. Además de generar mayor especies reactivas de oxígeno que las nanoesferas, las nanofibras logran entrar en el núcleo celular en ambos modelos, lo cual es de suma relevancia ya que esto genera incluso mayor daño a DNA que el solo inducido por el estrés oxidante. Las nanoesferas de TiO_2 , también generan daño a DNA sin embargo, estas no logran entrar en el núcleo, por lo que su genotoxicidad se explica mediante el estrés oxidante.

Como ya se ha mencionado antes, los estudios con nanofibras de TiO_2 son limitados y en ninguno de ellos se había descrito la presencia de nanopartículas en el núcleo, ni siquiera en mi trabajo de tesis logramos ver con microscopía electrónica de transmisión la presencia de nanofibras en el núcleo, sin embargo la desventaja de esta última técnica mencionada es que los cortes que se realizan en las células son de aproximadamente 5 nm, por lo cual encontrar partículas en el núcleo puede ser aleatorio, dependiendo del sitio en donde se realice el corte de las células. Habría que realizar un análisis mucho más exhaustivo con microscopía electrónica de transmisión en donde se analicen múltiples cortes para determinar la presencia de nanofibras de TiO_2 en el núcleo, o ensayos en donde la telofase sea bloqueada y se busque la interacción directa entre el DNA y las partículas, aunque en este último estudio tendría que considerarse que durante la mitosis la envoltura nuclear se pierde.

En general, con este estudio podemos decir que el sistema de interface aire-líquido ofrece muchas ventajas que nos permiten estudiar la nanotoxicología en un escenario mucho más cercano a la exposición en ambientes ocupacionales, en donde la exposición es mediante aerosol y que permite descartar variables que influyen en la toxicidad de las nanopartículas. Este sistema, puede presentar grandes diferencias con el cultivo celular sumergido, empezando por el depósito de las nanopartículas.

10.7 CONCLUSIÓN

Las nanofibras de TiO_2 producen mayor cantidad de especies reactivas que las nanoesferas en el cultivo celular sumergido, sin embargo el cultivo celular de interface aire-líquido no permitió realizar esta determinación debido a que las células son sembradas en *transwells*, lo cual es una de las desventajas del modelo.

La citotoxicidad y la genotoxicidad de las nanofibras son más evidentes en el cultivo celular de interface aire-líquido después de 24 h, 48 h y 72 h en comparación con el cultivo celular sumergido, a pesar de que el depósito de partículas en el cultivo es muy mucho menor en el primer modelo. Por el contrario, la citotoxicidad y genotoxicidad de las nanoesferas es mucho más evidente en el cultivo celular sumergido que en el cultivo celular de aire-líquido lo cual podría deberse en parte al menor depósito de partículas en comparación con el cultivo sumergido. El daño a DNA mostró ser acumulativo con respecto al tiempo solo en las células expuestas a nanofibras de TiO_2 en el cultivo sumergido. Todos los demás tratamientos no mostraron un efecto dependiente del tiempo.

Además, las nanofibras de TiO_2 mostraron tener la capacidad de entrar en el núcleo de las células epiteliales de pulmón, sin importar el modelo por el cual son expuestas, lo cual explica en parte su genotoxicidad, mientras que la genotoxicidad de las nanoesferas no se debe a una interacción directa entre las partículas y el DNA sino a mecanismos secundarios como la alta producción de especies reactivas de oxígeno.

A pesar de que el cultivo de interface aire-líquido no está diseñado para evaluar la toxicidad de partículas fibrosas, mostró ser más sensible que el cultivo celular sumergido convencional.

10.8 PERSPECTIVAS

Una de las limitaciones de este trabajo fue que utilizamos una línea celular, lo que significa que estas células han sido cultivadas todo el tiempo de manera sumergida con medio de cultivo. Esto promueve que cuando son puestas en un cultivo de aire-líquido el medio al que están acostumbradas cambia de manera radical, por lo que la línea celular presenta un daño basal muy alto. Sería de gran aportación el uso del modelo *Air-Liquid Interface*, o interface aire-líquido, con células primarias de epitelio bronquial ya que una de las ventajas de este modelo es que al usar estas células primarias permite la diferenciación celular, lo que conlleva a la formación de un epitelio estratificado, como el de los bronquios pulmonares lo cual nos conduciría a un escenario mucho más cercano al real y la determinación de la toxicidad tanto de nanopartículas, como de partículas ambientales o humo de tabaco sería mucho más aproximada. Por otro lado, el modelo de interface aire-líquido debe ser mucho más explotado, ya que hasta el momento hay alrededor de 15 publicaciones utilizando este modelo y dentro de las cosas reportadas se encuentran la determinación de citotoxicidad y daño en el citoesqueleto. Nosotros aportamos la evaluación de daño a DNA pero sería de gran importancia hacer un perfil de respuesta inflamatoria, evaluar si hay hipoxia o hiperoxia al estar en contacto con el aire, determinar la cantidad de partículas que se depositan en los cultivos ya que eso no se tiene estandarizado y la concentración de partículas es un factor determinante en la respuesta citotóxica.

10.9 BIBLIOGRAFÍA

- Bonner JC, Silva RM, Taylor AJ, Brown JM, Hilderbrand SC, Castranova V, Porter D, Elder A, Oberdörster G, Harkema JR, Bramble LA, Kavanagh TJ, Botta D, Nel A, Pinkerton KE. Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environ Health Perspect* 2013;121:676–82.
- Doak SH, Manshian B, Jenkins GJ, Singh N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat Res*. 2012;745(1-2):104–11.
- Guo C, Buckley A, Marczylo T, Seiffert J, Römer I, Warren J, Hodgson A, Chung KF, Gant TW, Smith R, Leonard MO. The small airway epithelium as a target for the adverse pulmonary effects of silver nanoparticle inhalation. *Nanotoxicology*. 2018;12(6):539–53.
- Latvala S, Vare D, Karlsson HL, Elihn K. In vitro genotoxicity of airborne Ni-NP in air-liquid interface. *J Appl Toxicol*. 2017;37(12):1420-7.
- Porter. DW, Wu. N, Hubbs. AF, Mercer. RR, Funk. K, Meng. F, Li. J, Wolfarth. MG, Battelli. L, Friend. S, Andrew. M, Hamilton. R Jr, Sriram. K, Yang. F, Castranova. V and Holian. A, Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts, *Toxicol Sci*, 2013;131(1):179–93.

11. ARTÍCULOS PUBLICADOS



Cite this: DOI: 10.1039/c8en01078a

Titanium dioxide nanofibers induce angiogenic markers and genomic instability in lung cells leading to a highly dedifferentiated and fibrotic tumor formation in a xenograft model

Estefany I. Medina-Reyes,^{†a} Norma L. Delgado-Buenrostro,^{id a} Alejandro Déciga-Alcaraz,^{id †a} Verónica Freyre-Fonseca,^{id a} José O. Flores-Flores,^b Rogelio Hernández-Pando,^c Jorge Barrios-Payán,^c Julio C. Carrero,^d Yesennia Sánchez-Pérez,^{id e} Claudia M. García-Cuéllar,^{id e} Felipe Vaca-Paniagua^{id aef} and Yolanda I. Chirino^{id *a}

The synthesis of novel nanofibers has increased due to their broad spectrum of applications which have raised also the concern of toxicity mediated by inhalation. Titanium dioxide (TiO₂), classified as a possible carcinogen to humans by the International Agency for Research on Cancer regardless of size and shape, is being manufactured as nanofibers for waste water cleaning, extraction of enhanced miRNAs, glucose quantification and other devices. Toxicological studies of TiO₂ nanofibers have shown their capability to induce sustained inflammation, frustrated phagocytosis, and lysosomal disruption, but the capability to acquire or enhance aggressive characteristics, including angiogenesis, fibrosis or epithelial mesenchymal transition (EMT) has not been investigated. In this study, we synthesized TiO₂ nanofibers (anatase phase; 61.5 ± 4.9 nm width and 3.1 ± 0.2 μm length) to expose monolayers of lung epithelial cells (1 and 10 μg cm⁻²) for 7 days, and angiogenesis, fibrosis, EMT markers, genomic instability and cisplatin sensitivity were measured. Then, those cells were harvested and injected subcutaneously in a xenograft mouse model for tumor development. After 11 weeks, the same markers were measured in the tumors. The monolayers exposed to TiO₂ nanofibers induced angiogenic, fibrotic and EMT markers, genomic instability and loss of cisplatin sensitivity. The tumors developed from exposed cells to TiO₂ nanofibers were also positive for the same markers, and moreover, dedifferentiation, the remarkable presence of erythrocytes and loss of cisplatin sensitivity were higher, which suggests that TiO₂ nanofibers enhance the aggressive tumor phenotype in lung epithelial cells.

Received 25th September 2018,
Accepted 26th November 2018

DOI: 10.1039/c8en01078a

rsc.li/es-nano

Environmental significance

Titanium dioxide manufacture was estimated to be 6.6 million tons between 2008 and 2012, and some of this production was used for nanofiber synthesis with the purpose of developing water and air pollutant removal systems, biosensors and devices for molecular biology. However, the concern of nanofiber inhalation is increasing in occupational settings due to the evidence of shape toxicity. Beyond the cytotoxicity induced by nanofiber exposure, promotion of an aggressive phenotype has been less investigated. The originality of this study is based on the demonstration that lung adenocarcinoma cells exposed to TiO₂ nanofibers enhanced tumor characteristics including angiogenic markers and genomic instability, and these cells can even acquire a more aggressive phenotype when grown in a xenograft nude mouse model.

^a Laboratorio de Carcinogénesis y Toxicología, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, CP 54059, Estado de México, Mexico. E-mail: irasemachirino@gmail.com; Tel: +52 55 56231333

^b Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, AP 70-186, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^c Sección de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14000, Ciudad de México, Mexico

^d Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510 Ciudad de México, Mexico

^e Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando No. 22, Tlalpan, CP 14080 Ciudad de México, Mexico

^f Laboratorio Nacional en Salud: Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico-Degenerativas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, CP 54059, Estado de México, Mexico

[†] Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

This project was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN218015) and the National Council of Science and Technology (CONACYT 268769). **Medina-Reyes Estefany Ingrid is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by CONACYT (fellowship 576227).** Déciga-Alcaraz Alejandro is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by CONACYT (fellowship 582547). We thank the Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT, UNAM) for the support in the nanofibers synthesis and Biol. Tomás Ernesto Villamar Duque for his help in the animal experimentation.

References

- 1 Nanowerk Nanomaterial Database™ <https://www.nanowerk.com/nanomaterial-database.php> Accessed Sep 18, 2018.
- 2 USGS United States Geological Survey, *Titanium and titanium dioxide. Mineral commodity summaries*, 2013, pp. 172–173, <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2000/mcs2000.pdf> Accessed Sep 18, 2018.
- 3 F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger and B. Nowack, Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 1109.
- 4 IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Carbon black, titanium dioxide, and talc, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 2010, **93**, 1–413.
- 5 S. Pavasupree, S. T. Dubas and R. Rangkupan, Surface modification of polypropylene non-woven fibers with TiO₂ nanoparticles via layer-by-layer self assembly method: Preparation and photocatalytic activity, *J. Environ. Sci.*, 2015, **37**, 59–66.
- 6 S. Liu, L. Xie, J. Zheng, R. Jiang, F. Zhu, T. Luan and G. Ouyang, Mesoporous TiO₂ nanoparticles for highly sensitive solid-phase microextraction of organochlorine pesticides, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **878**, 109–117.
- 7 Q. Guo, L. Liu, M. Zhang, H. Hou, Y. Song, H. Wang, B. Zhong and L. Wang, Hierarchically mesostructured porous TiO₂ hollow nanofibers for high performance glucose biosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **92**, 654–660.
- 8 K. Ulubayram, S. Calamak, R. Shahbazi and I. Eroglu, Nanofibers based antibacterial drug design, delivery and applications, *Curr. Pharm. Des.*, 2015, **21**(15), 1930–1943.
- 9 L. A. Jimenez, M. A. Gionet-Gonzales, S. Sedano, J. G. Carballo, Y. Mendez and W. Zhong, Extraction of microRNAs from biological matrices with titanium dioxide nanofibers, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **410**(3), 1053–1060.
- 10 C. Dumitriu, A. B. Stoian, I. Titorencu, V. Pruna, V. V. Jinga, R. M. Latonen, J. Bobacka and I. Demetrescu, Electrospun TiO₂ nanofibers decorated Ti substrate for biomedical application, *Mater. Sci. Eng., C*, 2014, **45**, 56–63.
- 11 E. Beltrán-Partida, B. Valdéz-Salas, A. Moreno-Ulloa, A. Escamilla, M. A. Curiel, R. Rosales-Ibáñez, F. Villarreal, D. M. Bastidas and J. M. Bastidas, Improved in vitro angiogenic behavior on anodized titanium dioxide nanotubes, *J. Nanobiotechnol.*, 2017, **15**(1), 10.
- 12 L. A. Jimenez, M. A. Gionet-Gonzales, S. Sedano, J. G. Carballo, Y. Mendez and W. Zhong, Extraction of microRNAs from biological matrices with titanium dioxide nanofibers, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **410**(3), 1053–1060.
- 13 R. F. Hamilton, N. Wu, D. Porter, M. Buford, M. Wolfarth and A. Holian, Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity, *Part. Fibre Toxicol.*, 2009, **6**, 35.
- 14 R. F. Hamilton, N. Wu, C. Xiang, M. Li, F. Yang, M. Wolfarth, D. W. Porter and A. Holian, Synthesis, characterization, and bioactivity of carboxylic acid-functionalized titanium dioxide nanobelts, *Part. Fibre Toxicol.*, 2014, **11**, 43.
- 15 A. S. Reynolds, T. H. Pierre, R. McCall, J. Wu and W. E. Gato, Evaluating the cytotoxicity of tin dioxide nanofibers, *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 2018, **53**(11), 986–991.
- 16 V. Rapisarda, C. Loreto, C. Ledda, G. Musumeci, M. Bracci, L. Santarelli, M. Renis, M. Ferrante and V. Cardile, Cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by glass fibers on human alveolar epithelial cell line A549, *Toxicol. In Vitro*, 2015, **29**(3), 551–557.
- 17 J. A. Tamminen, M. Myllärniemi, M. Hyytiäinen, J. Keski-Oja and K. Koli, Asbestos exposure induces alveolar epithelial cell plasticity through MAPK/Erk signaling, *J. Cell. Biochem.*, 2012, **113**(7), 2234–2247.
- 18 T. Chen, H. Nie, X. Gao, J. Yang, J. Pu, Z. Chen, X. Cui, Y. Wang, H. Wang and G. Jia, Epithelial-mesenchymal transition involved in pulmonary fibrosis induced by multi-walled carbon nanotubes via TGF-beta/Smad signaling pathway, *Toxicol. Lett.*, 2014, **226**(2), 150–162.
- 19 M. Allegri, M. G. Bianchi, M. Chiu, J. Varet, A. L. Costa, S. Orтели, M. Blosi, O. Bussolati, C. A. Poland and E. Bergamaschi, Shape-Related Toxicity of Titanium Dioxide Nanofibres, *PLoS One*, 2016, **11**(3), e0151365.
- 20 D. W. Porter, N. Wu, A. F. Hubbs, R. R. Mercer, K. Funk, F. Meng, J. Li, M. G. Wolfarth, L. Battelli, S. Friend, M. Andrew, R. Hamilton Jr, K. Sriram, F. Yang, V. Castranova and A. Holian, Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts, *Toxicol. Sci.*, 2013, **131**(1), 179–193.
- 21 E. I. Medina-Reyes, A. Déciga-Alcaraz, V. Freyre-Fonseca, N. L. Delgado-Buenrostro, J. O. Flores-Flores, G. F. Gutiérrez-López, Y. Sánchez-Pérez, C. M. García-Cuellar, J. Pedraza-Chaverri and Y. I. Chirino, Titanium dioxide nanoparticles induce an adaptive inflammatory response and invasion and proliferation of lung epithelial cells in chorioallantoic membrane, *Environ. Res.*, 2015, **136**, 424–434.



Novel thiosemicarbazones induce high toxicity in estrogen-receptor-positive breast cancer cells (MCF7) and exacerbate cisplatin effectiveness in triple-negative breast (MDA-MB231) and lung adenocarcinoma (A549) cells

Estefany Ingrid Medina-Reyes¹ · Marco Antonio Mancera-Rodríguez¹ · Norma Laura Delgado-Buenrostro¹ · Adriana Moreno-Rodríguez² · Juan Luis Bautista-Martínez² · Clara Estela Díaz-Velásquez³ · Stefania Andrea Martínez-Alarcón¹ · Hugo Torrens⁴ · María de los Ángeles Godínez-Rodríguez⁵ · Luis Ignacio Terrazas-Valdés^{1,3} · Yolanda Irasema Chirino¹ · Felipe Vaca-Paniagua^{1,3,6}

Received: 25 February 2019 / Accepted: 6 May 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Summary

Cis-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP), known as cisplatin, has been extensively used against breast cancer, which is the most frequent cancer among women, and lung cancer, the leading cancer that causes death worldwide. Novel compounds such as thiazole derivatives have exhibited antiproliferative activity, suggesting they could be useful against cancer treatment. Herein, we synthesized two novel thiosemicarbazones and an aldehyde to combine with CDDP to enhance efficacy against ER-positive breast MCF7 cancer cells, triple-negative/basal-B mammary carcinoma cells (MDA-MB231) and lung adenocarcinoma (A549) human cells. We synthesized 2,3,5,6-tetrafluoro-4-(2-mercaptoethanethiolyl)benzaldehyde (ALD), 5-[(2,3,5,6-tetrafluoro-4-(trifluoromethyl)phenyl)thio]-2-furaldehyde thiosemicarbazone (TSC1) and 5-[(4-(trifluoromethyl)phenyl)thio]-2-furaldehyde thiosemicarbazone (TSC2) and used them alone or in combination with subtoxic CDDP concentrations to evaluate cytotoxicity, cytoskeleton integrity and mitochondrial function. We found that none of the synthesized compounds improved CDDP activity against MCF7 cell cultures; however, TSC2 was effective in enhancing the cytotoxicity of CDDP against MDA-MB231 and A549 cancer cell cultures. We demonstrated that the cytotoxic effect is related to the TSC2 capacity to induce disruption in the cytoskeleton network and to decrease mitochondrial function.

Keywords Thiosemicarbazones · Cytoskeleton disruption · Mitochondrial dysfunction · Breast cancer cells · Lung cancer cells

Highlights

- The compound 5-[(2,3,5,6-tetrafluoro-4-(trifluoromethyl)phenyl)thio]-2-furaldehyde thiosemicarbazone (TSC1) is highly cytotoxic in ER-positive breast and lung adenocarcinoma cancer cells.
- Due to its high toxicity, TSC1 was not able to synergize with cisplatin.
- 5-[(4-(trifluoromethyl)phenyl)thio]-2-furaldehyde thiosemicarbazone (TSC2) showed synergistic effects with cisplatin in triple-negative/basal-B mammary carcinoma cells.
- The synergistic mechanism of TSC2 cytotoxicity involves disorganization of the cytoskeleton and mitochondrial dysfunction in ER-positive breast, triple-negative/basal-B mammary carcinoma and lung adenocarcinoma cancer cells.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10637-019-00789-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Felipe Vaca-Paniagua
felipe.vaca@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 08 June 2019

Introduction

Cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP), known as cisplatin, was first discovered as an inhibitor of cell division in *Escherichia coli* in 1965, but it was not until 1978 when it was approved by the Federal Drug Agency for cancer treatment [1]. After 40 years and despite the improvements in cancer therapy, CDDP is still used alone or in combination with other drugs for lung, breast and brain cancer treatment, among others. For instance, CDDP in combination with paclitaxel is used for head and neck, ovarian, breast and lung carcinoma treatment, while a combination with Anvirel is used for breast, colon, lung, prostate and pancreatic cancer treatment. In addition, in recent years, novel combinations with CDDP have been screened for other types of cancer, which are in clinical trials. One example is a phase II trial for muscle-

Springer

problems, including freckles, melasma, post-inflammatory melanoderma, age spots and melanoma [26]. Additionally, many studies of novel thiosemicarbazones provided theoretical information on biological activities, such as anti-tubercular effects; however, not all of the studies provide biological support [27].

The thiosemicarbazone mechanism of cytotoxicity has been linked to ribonucleotide reductase inhibition, including Triapine [28], but also to its function as a metal chelator [29]. Nevertheless, specific studies are needed for each novel derivative because not all thiosemicarbazones inhibit ribonucleotide reductase. For instance, (+)-N(1)-4-fluorobenzaldehyde-N(4)-[1-methyl-1-[(1R)-4-methylcyclohexene-3-yl]-ethyl]-thiosemicarbazone (4-FTSC) induced cytotoxicity on PC-3 adenocarcinoma prostate cells [30]. This compound increases ROS production, decreases mitochondrial membrane potential, induces DNA fragmentation and increases caspase 3 and 9 expression without affecting cell cycle distribution [31], suggesting that the main biological effect is not related to ribonucleotide reductase inhibition.

In the present study, based on the necessity to enhance or synergize the effect of CDDP, a well-known antineoplastic agent used against breast and lung cancer, we synthesized 3 novel compounds, which were combined with low and high CDDP treatments in cell cultures of breast and lung cancer cells. We demonstrated that from the 3 compounds synthesized, **TSC2** was successful in enhancing CDDP effectiveness, and its mechanism of cytotoxicity was related to actin cytoskeleton disruption and mitochondrial dysfunction in triple-negative breast cancer (MDA-MB231) and lung adenocarcinoma (A549) cells, and it was highly cytotoxic in estrogen-receptor-positive breast cells without enhancing CDDP effectiveness. The cell has hundreds of mitochondria, and they, as bioenergetic organelles, play a central and multifunctional role in cancer progression. Targeting mitochondria provides therapeutic opportunities since mitochondria modulate metabolism, cell cycle, gene expression, cell growth and proliferation and stress responses. In this way, we propose **TSC2** as a good alternative to combine with CDDP to target mitochondria since the incubation with CDDP for 2 h was successful in sensitizing cancer cell cultures for further effect with **TSC2** in triple-negative breast cancer (MDA-MB231) and lung adenocarcinoma (A549) cells. We highlight that triple-negative breast tumors are insensitive to endocrine therapy, which complicates the treatment for patients [32], and compounds such as **TSC2** in combination with non-endocrine drugs such as CDDP could be a new therapeutic strategy. However, we do not discard the possibility of using **TSC1** or **TSC2** as a treatment against ER-positive breast cancer because they showed high toxicity at 50 μ M, and the effect was apparently slightly specific against this type of cell. However, the cytoskeleton plays an important role in cancer to promote

cell motility, which is absolutely necessary in processes such as migration and invasion involved in metastasis. Furthermore, some drugs in chemotherapy with the cytoskeleton as targets are still successful, for example, paclitaxel, docetaxel and other derivatives from taxanes that stabilize microtubules, causing cell-cycle arrest and apoptosis, which inhibit mitosis. Actin filaments are also imperative for mitosis during cytokinesis, and **TSC2** can disrupt this network, which could be a worthy alternative for treatment.

We recognize that some compounds that are highly cytotoxic in several cell lines might have low cell specificity; however, these compounds could be conjugated with other molecules to provide tissue specificity, for instance, using nanoparticles as thiosemicarbazone carriers [33].

Conclusions

We synthesized 3 compounds, from which **TSC2** (5-[(4-(trifluoromethyl)phenyl)thio]-2-furaldehyde thiosemicarbazone) enhanced CDDP effectiveness in triple-negative breast cancer (MDA-MB231) and lung adenocarcinoma (A549) cells. In addition, **ALD** and **TSC1** were highly cytotoxic in estrogen-receptor-positive breast (MCF7) cancer cells but were unable to enhance CDDP effectiveness. The cytotoxicity of **TSC2** was related to cytoskeletal disruption and mitochondrial dysfunction.

Funding This research was supported by Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para Promover Grupos de Investigación (PAPCA, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; FESI-DIP-PAPCA-2014-36) and the National Council of Science and Technology (CONACYT 268769). **Medina-Reyes Estefany Ingrid is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 576227 from CONACYT.**

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205:698–699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>
- Iyer G, Balar AV, Milowsky MI, Bochner BH, Dalbagni G, Donat SM, Herr HW, Huang WC, Taneja SS, Woods M, Ostrovskaya I, al-Ahmadie H, Arcila ME, Riches JC, Meier A, Bourque C, Shady M, Won H, Rose TL, Kim WY, Kania BE, Boyd ME, Cipolla CK,



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

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

Influence of shape and dispersion media of titanium dioxide nanostructures on microvessel network and ossification

Verónica Freyre-Fonseca^{a,b}, Estefany I. Medina-Reyes^{a,c}, Darío I. Téllez-Medina^d, Gloria L. Paniagua-Contreras^e, Eric Monroy-Pérez^e, Felipe Vaca-Paniagua^{a,f,h}, Norma L. Delgado-Buenrostro^a, José O. Flores-Flores^g, Edgar O. López-Villegas^d, Gustavo F. Gutiérrez-López^d, Yolanda I. Chirino^{a,*}

^a Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, CP 54090, Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

^b Doctorado en Ciencias en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, CP 11340, Ciudad de México, Mexico

^c Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^d Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, CP 11340, Ciudad de México, Mexico

^e Clínica Universitaria de Salud Integral, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, CP 54090, Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

^f Subdirección de Investigación básica, Instituto Nacional de Cancerología, Subdirección de Investigación Básica, San Fernando No. 22, CP14080, Tlalpan, Ciudad de México, Mexico

^g Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria AP 70-186, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^h Laboratorio Nacional en Salud, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2017

Received in revised form 25 October 2017

Accepted 20 November 2017

Available online 23 November 2017

Keywords:

Titanium dioxide nanoparticles

Bloodstream

Microvascular density

Femur ossification

Belts

E171 additive

Chorioallantoic membrane

Angiogenesis

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) production has been used for pigment, food and cosmetic industry and more recently, shaped as belts for treatment of contaminated water, self-cleaning windows and biomedical applications. However, the toxicological data have demonstrated that TiO₂ NPs inhalation induce inflammation in *in vivo* models and *in vitro* exposure leads to cytotoxicity and DNA damage. Dermal exposure has limited adverse effects and the possible risks for implants used for tissue regeneration is still under research. Then, it has been difficult to establish a straight statement about TiO₂ NPs toxicity since route of exposure and shapes of nanoparticles play an important role in the effects. In this study we aimed to investigate the effect of three different types of TiO₂ NPs (industrial, food-grade and belts) dispersed in fetal bovine serum (FBS) and saline solution (SS) on microvessel network, angiogenesis gene expression and femur ossification using a chick embryo model after an acute exposure of NPs on the day 7 after eggs fertilization. Microvascular density of chorioallantoic membrane (CAM) was analyzed after 7 days of NPs injection and vehicles induced biological effects *per se*. NPs dispersed in FBS or SS have slight differences in microvascular density, mainly opposite effect on angiogenesis gene expression and no effects on femur ossification for NPs dispersed in SS. Interestingly, NPs shaped as belts dramatically prevented the alterations in ossification induced by FBS used as vehicle.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) shaped as spheres belong to one of the most versatile structures used in nanotechnology with a worldwide market for paint, cosmetic and food industry, labelled as E171 in Europe, and one of the biggest target seems to be

application in the biomedicine field in which TiO₂ NPs could be used as delivery systems, medical devices and as biomaterials for human implants [1]. Further promising applications for resistant papers against degradation and UV-light are under investigation [2] but also novel shapes as fibers are intended to be used for wastewater treatment or to upgrade previous properties such as photocatalytic and antibacterial activity [3].

However, inhalation of TiO₂ NPs leads to NPs internalization triggering inflammation, oxidative stress, DNA damage [4] and hypoxia. As expected, there is a concern about the risk of TiO₂ NPs

* Corresponding author.

E-mail address: irasemachirino@gmail.com (Y.I. Chirino).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.049>

0927-7765/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

20110236435 A1). This invention uses murine calvaria-derived MC3T3-E1 osteoblast-like cells, which are cultured over a surface of TiO₂ nanotubes sized at 80 nm–107 nm. Similar invention under the title of “A method of inducing mineralization in a bone cell” used TiO₂ NPs (purchased in Nanostructured & Amorphous Materials, Inc but with no detail on which type of TiO₂ was used and what type of dispersed medium was used), claimed to induce mineralization of bone cells (Patent Number registered as US 9074187 B2) also used cell cultures to test the invention. This suggests, that the experimental model that was used in this study could be helpful to confirm that TiO₂ nanotubes or similar nanostructures are able to prevent or revert ossification alterations, especially because some of this promising patents are registered using cell cultures in monolayer as evidence of cell growth.

The inclusion of a sham group in the present study allowed to identify the differences among surgical manipulation and vehicles and also to identify the effect of two different vehicles. SS induced less effects on microvascular network, induced some variances in the expression of the studied genes and had no effect on femur ossification. The advantage of using FBS as vehicle was to obtain a better dispersion of particles (Table 2); however, MVD and femur ossification showed the highest degree of alterations when NPs were dispersed in FBS. The literature suggests that FBS retarded the osteogenic differentiation as has been previously demonstrated [43] and apparently, the nano-biointerface between NPs and FBS prevented this effect. In this regard, it was remarkable that belts showed a protective effects against alterations in ossification induced by FBS and justly, and this effect is associated to a 27-times smaller hydrodynamic diameter compared with SS.

As a final point, it may be proposed that the toxicity induced by NPs is not a widespread effect in all tissues and attention must be paid in the conditions of experimentation since the evidence shows that the same NPs might be safe for one tissue while they could be toxic for another. This information is useful to design drugs in the nanomedicine field among other areas of science.

5. Conclusions

We conclude that bio-nano interface of the three different types of TiO₂ NPs dispersed in SS displayed a more negative ζ potential values, which means higher anionic charge, than NPs dispersed in FBS. Among NPs dispersed in FBS, spheres and belts were closer to neutral charge while food-grade TiO₂ had negative charge.

In this study we found that surgical manipulation have effects and at least for this CAM model, sham group was useful to distinguish from effects attributed exclusively to surgical manipulation. FBS used as vehicle for all types of NPs had no effect on the average of braches length neither on average of maximum branches length. However, FBS decreased the MVD and spheres and belts reverted this decrease while food-grade TiO₂ had no effect. However, all types of NPs dispersed in SS decreased the average of braches length with no effect on the average of maximum branches length neither on MVD, except for belts, which increased the MVD. In general terms, gene expression of angiogenesis related genes showed opposite regulation, meaning that, while samples from FBS vehicle and its treatments had positive expression of MMP2, SS and its treatments had negative expression and similar effect was seen in NF- κ B expression. SS had no effect on ossification in the chicken femurs and FBS used as vehicle disrupted the ossification while spheres and food-grade TiO₂ showed no additional effect. TiO₂ shaped as belts showed a protective effect in which bones showed normal surface. This study demonstrated the importance of vehicle used for dispersion of NPs, which in spite of having the same chemical composition differs on the physical shape and modifies the bio-nano interface.

Conflict of interest

All authors declared no conflict of interest regarding to this manuscript.

Acknowledgments

Yolanda I. Chirino acknowledges Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM (comunicado no. 105/2016) for the received support. This study was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN218015). This work was part of doctoral thesis of Verónica Freyre-Fonseca in Doctorado en Ciencias en Alimentos (IPN). Estefany I. Medina-Reyes is doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and both received fellowship (202805 and 579881, respectively) from CONACYT. We thank to Dr. Mayahuel Ortega and from the Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías-IPN for her technical help in the images acquisition, and Paola Rodriguez Oviedo nanotechnology student from Universidad Autónoma de San Luis Potosi for her help in qRT-PCR.

References

- [1] H. Tsuchiya, J.M. Macak, L. Muller, J. Kunze, F. Muller, P. Greil, S. Virtanen, P. Schmuki, Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes, *J. Biomed. Mater. Res. A* 77 (2006) 534–541.
- [2] K. Fujiwara, Y. Kuwahara, Y. Sumida, H. Yamashita, Fabrication of photocatalytic paper using TiO₂ nanoparticles confined in hollow silica capsules, *Langmuir* 33 (2017) 288–295.
- [3] P.S. Saud, B. Pant, A.P. Twari, Z.K. Ghouri, M. Park, H.Y. Kim, Effective photocatalytic efficacy of hydrothermally synthesized silver phosphate decorated titanium dioxide nanocomposite fibers, *J. Colloid Interface Sci.* 465 (2016) 225–232.
- [4] Y. Li, J. Yan, W. Ding, Y. Chen, L.M. Pack, T. Chen, Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles, *Mutagenesis* 32 (2017) 33–46.
- [5] M.J. Osmond-McLeod, Y. Oytam, A. Rowe, F. Sobhanmanesh, G. Greenoak, J. Kirby, E.F. McInnes, M.J. McCall, Long-term exposure to commercially available sunscreens containing nanoparticles of TiO₂ and ZnO revealed no biological impact in a hairless mouse model, *Part. Fibre Toxicol.* 13 (2016) 44.
- [6] L.C. Pele, V. Thoree, S.F. Bruggaber, D. Koller, R.P. Thompson, M.C. Lomer, J.J. Powell, Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers, *Part. Fibre Toxicol.* 12 (2015) 26.
- [7] I. Pujalte, D. Dieme, S. Haddad, A.M. Serventi, M. Bouchard, Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles after inhalation in rats, *Langmuir: ACS J. Surf. Colloids* 265 (2017) 77–85.
- [8] A.B. Abukabda, P.A. Stapleton, C.R. McBride, J. Yi, T.R. Nurkiewicz, Heterogeneous vascular bed responses to pulmonary titanium dioxide nanoparticle exposure, *Front. Cardiovasc. Med.* 4 (2017) 33.
- [9] J. Han, B.J. Zern, V.V. Shuvaev, P.F. Davies, S. Muro, V. Muzykantov, Acute and chronic shear stress differently regulate endothelial internalization of nanocarriers targeted to platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, *ACS Nano* 6 (2012) 8824–8836.
- [10] J.H. Park, G. von Maltzahn, L. Zhang, A.M. Derfus, D. Simberg, T.J. Harris, E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, M.J. Sailor, Systematic surface engineering of magnetic nanoworms for in vivo tumor targeting, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 5 (2009) 694–700.
- [11] P.A. Stapleton, V.C. Minarchick, J. Yi, K. Engels, C.R. McBride, T.R. Nurkiewicz, Maternal engineered nanomaterial exposure and fetal microvascular function: does the Barker hypothesis apply? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 209 (2013) e221–e227.
- [12] J. Baharara, F. Namvar, M. Mousavi, T. Ramezani, R. Mohamad, Anti-angiogenesis effect of biogenic silver nanoparticles synthesized Using Salvia officinalis on chick chorioallantoic membrane (CAM), *Molecules (Basel, Switzerland)* 19 (2014) 13498–13508.
- [13] D. Ho, J.W. Leong, R.C. Crew, M. Norret, M.J. House, P.J. Mark, B.J. Waddell, K.S. Iyer, J.A. Keelan, Maternal-placental-fetal biodistribution of multimodal polymeric nanoparticles in a pregnant rat model in mid and late gestation, *Sci. Rep.* 7 (2017) 2866.
- [14] K. Yamashita, Y. Yoshioka, K. Higashisaka, K. Mimura, Y. Morishita, M. Nozaki, T. Yoshida, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, Y. Monobe, T. Imazawa, H. Aoshima, K. Shishido, Y. Kawai, T. Mayumi, S. Tsunoda, N. Itoh, T. Yoshikawa, I. Yanagihara, S. Saito, Y. Tsutsumi, Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 321–328.
- [15] D.W. Porter, N. Wu, A.F. Hubbs, R.R. Mercer, K. Funk, F. Meng, J. Li, M.G. Wolfarth, L. Battelli, S. Friend, M. Andrew, R. Hamilton Jr., K. Sriram, F. Yang, V. Castranova, A. Holian, Differential mouse pulmonary dose and time course

Applications and Risks of Nanomaterials Used in Regenerative Medicine, Delivery Systems, Theranostics, and Therapy

Estefany I. Medina-Reyes,^{a,b} García-Viacobo Danae,^a Franklin A. Carrero-Martínez,^c & Yolanda I. Chirino^{a*}

^aLaboratorio 10, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 54090, Estado de México, México; ^bPrograma de Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; ^cDepartment of Anatomy and Neuroscience, School of Medicine, University of Puerto Rico, P.O. Box 365067, San Juan, PR 00936-5067

*Address all correspondence to: Yolanda I Chirino, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de Los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, Estado de México, México; Tel.: +52 55 56231333 Ext. 39817, E-mail: irasemachirino@gmail.com

ABSTRACT: Recent advances in nanotechnology have transformed the biomedicine field, in which the use of engineered nanomaterials (ENMs) has provided the foundation for novel applications. For this reason, the number of ENMs has increased rapidly, and here we provide a classification of ENMs based on chemical composition and biomedical applications, which include regenerative medicine, delivery systems, theranostics, and therapy. These have been identified as the most advanced and promising areas for further studies with humans. In addition, we discuss possible side effects related to ENM uses. We identify carbon, metal, and metal oxides as the most versatile ENM material groups, used in bone and neuronal regenerative medicine, thermal therapy, theranostics, drug delivery, gene therapy, and biosensors. However, the majority of drugs approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) are lipid-based ENMs. We conclude that biomedical applications of ENMs offer potential benefits while side effects are mainly associated with occupational exposure. Finally, we suggest that in the future, nanocomposites, subnanometric structures, and biodegradable and biocorona formation could be used to improve the biomedical field by focusing on infectious diseases, early detection, and precision medicine.

KEY WORDS: engineered nanomaterials, biomedical applications, regenerative medicine, delivery systems, nanotheranostics, therapy

I. INTRODUCTION

Engineered nanomaterials (ENMs) are manufactured from nanoparticles (NPs) sized 1 to 100 nm in at least one external dimension in an unbound state, as aggregates or as agglomerates. They have a broad spectra of applications in medicine, biology, physics, chemistry, pharmacology, ecology, computing, and electronic devices. Presently there are more than 216 companies worldwide manufacturing and/or supplying ENMs according to Nanowerk database.¹

One of the most attractive uses of ENMs is related to biomedical applications in which conventional drugs exhibit side effects, low sensitivity, low specificity, and high

additives and nanopharmaceuticals, will eventually be successfully predicted. Predictive systems will require outstanding extrapolative methods given that ENM deposits in the environment, which can take decades to break down, may cause irreversible effects.

The second challenge is the research needed to achieve the goal of ENMs in biomedical applications. For instance, most of the toxicity mechanisms of NPs after internalization can be used for induction of apoptosis or can be designed to be internalized by a specific cell type for drug release. In this category fall carbon-based and metal- and metal oxide-based NPs. However the most advanced ENMs currently approved for humans are lipid based.

Nanocomposites, which are not addressed in this article, are composed of a matrix and a discontinuous phase or filler at nanoscale. Nanocomposite research has been slow to develop, but uses related to food packaging¹⁴² and biomedical devices have been proposed.¹⁴³ Research on nanocomposites must be accelerated and should focus on clinical trials to achieve proper formulations for human use. Also, more research must be carried out focusing not just on cancer but on infectious diseases, including those caused by parasites and viruses.

The third challenge is the design of personalized therapy. Studies are lacking in potential therapeutic approaches that take into account age, sex, weight, genetic and epigenetic profiles, and life style.

The fourth challenge is to increase the published data on subnanometric particles^{144,145,146} and their biomedical applications. These applications include precise detection of specific alterations in DNA, RNA, and proteins; malfunction of organelles; and variations in cellular processes such as anticipated termination of translation or changes in the rate of ATP production, all related to infectious and genetic, among other, diseases. For example, through the use of subnanoparticles, the biocorona, which is formed by the interaction between NPs and the surrounding environment, might be recovered from blood samples and analyzed to determine disease stage.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 166727) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN218015). E.I. Medina-Reyes, is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received Fellowship 579881 from CONACyT. D. García-Viacobo received a fellowship from PAPIIT (075215). Yolanda I Chirino acknowledges Programa de Apoyos para la Superación del Persona Académico de la UNAM (comunicado no. 105/2016) for the received support.

REFERENCES

1. Garduño-Balderas LG, Urrutia-Ortega IM, Medina-Reyes EI, Chirino YI. Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an imbalance between benefits and risks. *J Appl Toxicol.* 2015;35(10):1073–1085.
2. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:975–999.
3. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine.* 2013;9(1):1–14.

Role of Wasp and the Small GTPases RhoA, RhoB, and Cdc42 During Capacitation and Acrosome Reaction in Spermatozoa of English Guinea Pigs

NORMA L. DELGADO-BUENROSTRO,^{1,2} ADELA MÚJICA,^{3†} NATALIA CHIQUETE-FELIX,⁴ ALEJANDRO DÉCIGA-ALCARAZ,^{1,5} ESTEFANY I. MEDINA-REYES,^{1,5} SALVADOR URIBE-CARVAJAL,⁴ AND YOLANDA I. CHIRINO^{1*}

¹ Unidad de Biomedicina UBIMED, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepanitla, Estado de México, CP 54090

² Sección de Bioquímica y Farmacología Humana, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán, Estado de México, CP 54743

³ Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México DF, México, CP 07360

⁴ Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México, CP 04510

⁵ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 07360

SUMMARY

Cytoskeleton remodeling is necessary for capacitation and the acrosome reaction in spermatozoa. F-actin is located in the acrosome and equatorial region during capacitation, but is relocated in the post-acrosomal region during the acrosome reaction in spermatozoa from bull, rat, mice, and guinea pig. Actin polymerization and relocalization are generally regulated by small GTPases that activate Wasp protein, which coordinates with Arp2/3, profilin I, and profilin II to complete cytoskeletal remodeling. This sequence of events is not completely described in spermatozoa, though. Therefore, the aim of this study was to determine if Wasp interacts with small GTPases (RhoA, RhoB, and Cdc42) and proteins (Arp2/3, profilin I, and profilin II) that co-localize with F-actin during capacitation and the acrosome reaction in English guinea pig spermatozoa obtained from the vas deferens. The spermatozoa were capacitated in calcium-free medium, incubated with an activator or an inhibitor of GTPases, and then induced to acrosome react using calcium. The distribution patterns of F-actin were compared to the patterns of Wasp and its putative interaction partners: Wasp and RhoB, but not RhoA or Cdc42, localization overlap with F-actin during capacitation and the acrosome reaction. Activation of small GTPases localized RhoB to the post-acrosomal region whereas their inhibition prevented acrosome exocytosis. Arp2/3 and profilin II appear to interact with Wasp in the post-acrosomal region and flagellum, while profilin I and Wasp could be found in the equatorial region. Thus, Wasp and F-actin distribution overlap during capacitation and acrosome reaction, and small GTPases play an important role in cytoskeleton remodeling during these processes in spermatozoa.



*Corresponding author:
Unidad de Biomedicina
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. de Los Barrios 1
Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla 54090
Estado de México, México.
E-mail: irasemachirino@gmail.com

†Posthumous authorship.

Grant sponsor: National Council of Science and Technology;
Grant number: CONACyT 166727

Published online 6 June 2016 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/mrd.22657

Mol. Reprod. Dev. 83: 927–937, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Received 25 January 2016; Accepted 7 May 2016

Abbreviations: C3 EXO, C3 exoenzyme; F-actin, filamentous actin; LPA, lysophosphatidic acid 1-acyl-glycerol 3-phosphate; Wasp, Wiskott-Aldrich syndrome protein

© 2016 WILEY PERIODICALS, INC.

(TRITC)-Phalloidin (P-1951) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). Identification of specific proteins with antibodies involved blocking permeabilized samples with 1% bovine serum albumin in PBS, followed by a 1-hr incubation at 37°C with anti-Wasp, anti-RhoB, anti-RhoA, or anti-Cdc42 (each diluted 1:100 in blocking solution). Samples were thoroughly washed with PBS, and then incubated at 37°C for 1 hr with the secondary goat anti-rabbit IgG conjugated rhodamine or fluorescein (diluted 1:100 in blocking solution). Samples were mounted on glass slides, and cells were imaged by confocal microscopy Leica TCS SP-2 (Mannheim/Germany). Patterns not associated with F-actin distribution were ignored in the analysis phase, although the individual spermatozoan was counted in the total, thus the sum of the five patterns (Patterns I, II, III, IV, and V; see Fig. 1) is not 100%. Results are expressed as the percentage of spermatozoa positive for Wasp, RhoB, RhoA, and Cdc42.

Activation and Inhibition of Small GTPases

Spermatozoa from vas deferens were collected and washed in saline solution, then 1×10^6 cells were incubated for 45 min at 37°C in 1 mL of calcium-free Tyrode medium (116.7 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.36 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.49 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 11.9 mM NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 20 mM lactic acid and 5.56 mM glucose, pH 7.6) (Rogers and Yanagimachi, 1975). 400 U of streptolysin-O were immediately added to the medium (Hernández-González et al., 2000), and incubated at 37°C for 15 min. Then, LPA (Sigma–Aldrich) or toxin C3 EXO (Calbiochem, San Diego, CA) were added for a final concentration of 50 μM each, followed by incubation at 37°C for 30 min. The acrosome reaction was immediately elicited by adding a calcium solution for a final concentration of 2 mM. The total time of processing samples from the start of capacitation to the acrosome reaction was 90 min. All spermatozoa samples were fixed, stained for F-actin or Wasp, RhoA, RhoB, or Cdc42, and quantified by distribution pattern as above.

Spermatozoa Wasp Co-Localization With Arp2/3, Profilin I, and Profilin II

Capacitated spermatozoa were fixed and permeabilized, followed by double immunostaining to co-localize Wasp with Arp2/3, F-actin (TRITC-phalloidin) (P1951) (Sigma–Aldrich), profilin I, or profilin II. Samples with only primary or secondary antibody were used to confirm the observed signal was derived from specific protein detection. Spermatozoa were mounted on a glass slides, covered with coverglass, and analyzed by on a Leica TCS SP-2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim/Germany).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Data are presented as mean \pm standard error of at least three independent experiments. Frequency of patterns was

compared by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test. Differences at $*P < 0.05$ were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

Alejandro Déciga-Alcaraz (694548) and Estefany I. Medina-Reyes (579881) are doctoral students from *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)* and received fellowship from CONACYT.

REFERENCES

- Agbani EO, van den Bosch MT, Brown E, Williams CM, Matheij NJ, Cosemans JM, Collins PW, Heemskerk JW, Hers I, Poole AW. 2015. Coordinated membrane ballooning and procoagulant spreading in human platelets. *Circulation* 132:1414–1424.
- Aitken RJ, Nixon B. 2013. Sperm capacitation: A distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod* 19:785–793.
- Baltérrez-Hoyos R, Roa-Espitia AL, Hernández-González EO. 2012. The association between CDC42 and caveolin-1 is involved in the regulation of capacitation and acrosome reaction of guinea pig and mouse sperm. *Reproduction* 144:123–134.
- Bennet D, Kim S. 2015. Evaluation of UV radiation-induced toxicity and biophysical changes in various skin cells with photo-shielding molecules. *Analyst* 140:6343–6353.
- Bezanilla M, Gladfelter AS, Kovar DR, Lee WL. 2015. Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane. *J Cell Biol* 209:329–337.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Breitbart H, Finkelstein M. 2015. Regulation of sperm capacitation and the acrosome reaction by PIP 2 and actin modulation. *Asian J Androl* 17:597–600.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 129:263–268.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternalk K, Rivlin J, Breitbart H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 68:837–845.
- Buffone MG, Hirohashi N, Gerton GL. 2014. Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol Reprod* 90:112.
- Camatini M, Anelli G, Casale A. 1986. Identification of actin in boar spermatids and spermatozoa by immunoelectron microscopy. *Eur J Cell Biol* 42:311–318.
- Carlier MF, Pernier J, Montaville P, Shekhar S, Kühn S. 2015. Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility. *Cell Mol Life Sci* 72:3051–3067.

Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an unbalance between benefits and risks

Luis Guillermo Garduño-Balderas^a, Ismael Manuel Urrutia-Ortega^{a,b},
Estefany Ingrid Medina-Reyes^{a,b} and Yolanda Irasema Chirino^{a*}

ABSTRACT: Current evidence of engineered nanomaterials' (ENM) toxicity has led to a latent concern about hazards for both humans and the environment. For this reason, some efforts have been made to suggest frameworks or other guidance to regulate ENM handling; however, the real exposure risk to humans has not been well established. The aims of this work were to analyze the difficulties in establishing regulations for ENM and to discuss some considerations that may be helpful for policy makers involved in the regulation of ENM. Difficulties in establishing regulations are based on the novel properties of ENM associated with cytotoxic effects, the insufficiency of standardized methods to test those effects and the lack of epidemiological evidence of ENM toxicity, especially in occupational settings. Nevertheless, we offer some suggestions for establishing regulations, which include frameworks oriented towards protecting personnel exposed to ENM without decreasing production. In addition, we propose an ENM data sheet to offer available information of ENM. Finally, ethical aspects should also be considered in developing ENM regulations because every person who is working around or consuming ENM has the right to be informed about the potential risk. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: engineered nanomaterials; regulations; standardized methods; technical ENM data sheet; ethical considerations

Introduction

In the last decade, evidence of the toxicity of nanomaterials (NM) and engineered nanomaterials (ENM) has led to a latent concern about hazards for humans and the environment, and several surveys regarding usage (Schmid and Riediker 2008), precautions (Helland *et al.*, 2008), safety practices (Conti *et al.*, 2008) and risk perception (Engeman *et al.*, 2012) have been conducted in companies related to ENM. Those studies note the uncertainty in ENM risk knowledge, suggest a preference for adapting safe handling practices and recognize that there is insufficient information to establish specific regulations. The main concern of ENM lies in the toxicological evidence, which is not easily translated into recommendations for several reasons. Another important fact is that the astonishing level of ENM production in the world expands the debate about their effects not only in human occupational settings but also on the environment. Moreover, the pace of ENM development overcomes the possibility of designing proper regulations because until now, there has been a deficit of realistic evidence regarding the effects of ENM on human health and the environment. Nevertheless, guidance documents provided by knowledgeable agencies, including the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Health, Safety and the Environment (HSE) and the National Institute for Occupational Safety and Health, Japan (JNIOOSH), are available to implement or adapt practices for the safe development and handling of ENM. ENM regulation has multiple components, which complicates its success and requires maintaining a balance between the benefits of ENM and the safety of humans

and the environment. However, even although the landscape looks convoluted, we can take advantage of what we have learned in the past from other compounds/substances to try to avoid disrupting the balance between the benefits and risk of ENM. Here, we analyze some difficulties in establishing regulations for ENM and suggest some considerations that could be helpful for policy makers. In addition, we use several examples from the past as an analytical tool to keep our considerations in perspective, including how agencies have launched documents and how we have previously handled the toxicological evidence of substances when developing regulations, among others.

NM and ENM Definition

Natural NM have existed much longer than humans, but intentionally manufactured NM, called ENM, have only recently been synthesized. The wide spectrum of applications of ENM has attracted attention across the world in fields of medicine,

*Correspondence to: Y. I. Chirino, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de Los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, Estado de México, México.
E-mail: irasemachirino@gmail.com

^aUnidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 54090, Estado de México, México

^bPrograma de Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Acknowledgments

This work was supported by National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT 166727) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN218015). IMUO (489350) and EIMR (576227) have fellowship from CONACyT in the PhD Program of Biomedical Sciences at UNAM.

Conflict of interest

The authors did not report any conflict of interest.

References

- Baan RA. 2007. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal. Toxicol.* **19**: 213–228.
- Bellmann S, Carlander D, Fasano A, Momcilovic D, Scimeca JA, Waldman WJ, Gombau L, Tsytiskova L, Canady R, Pereira DI, Lefebvre DE. 2015. *Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol; In press.
- Bonner JC, Silva RM, Taylor AJ, Brown JM, Hilderbrand SC, Castranova V, Porter D, Elder A, Oberdörster G, Harkema JR, Bramble LA, Kavanagh TJ, Botta D, Nel A, Pinkerton KE. 2013. Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environ. Health Perspect.* **121**: 676–682.
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part. Fibre Toxicol.* **14**: 3–11.
- Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith SC Jr, Whitsett L, Kaufman JD. 2010. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **121**: 2331–2378.
- Chang LY. 2002. *Industrial Minerals: Materials, Processes and Uses*. Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ.
- Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Artificial sweeteners - a review. 2014. *J Food Sci Technol.* **51**: 611–621.
- Conti J, Killpack K, Killpack K, Gerritzen G, Huang L, Mircheva M, Delmas M, Harthorn B, Appelbaum R, Holden P. 2008. Health and Safety Practices in the Nanomaterials Workplace: Results from an International Survey. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 3155–3162.
- Cui P, Huang Y, Han J, Song F, Chen K. 2015. Ambient particulate matter and lung cancer incidence and mortality: a meta-analysis of prospective studies. *Eur. J. Public Health* **25**: 324–329.
- Thompson DT. 2007. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nanotoday* **2**: 4.
- De Temmerman PJ, Van Doren E, Verleysen E, Van der Stede Y, Francisco MA, Mast J. 2012. Quantitative characterization of agglomerates and aggregates of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanomaterials by transmission electron microscopy. *J Nanobiotechnology* **10**: 24.
- Dhanaraj SA, Muralidharan S, Santhi K, Hui AL, Wen CJ, Teng HC. 2014. Targeted drug delivery system: Formulation and evaluation of chitosan nanospheres containing Doxorubicin hydrochloride. *International Journal of Drug Delivery* **6**: 186–193.
- Duncan TV. 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *J Colloid Interface Sci.* **363**: 1–24.
- Engeman CD, Baumgartner L, Carr BM, Fish AM, Meyerhofer JD, Satterfield TA, Holden PA, Harthorn BH. 2012. Governance implications of nanomaterials companies' inconsistent risk perceptions and safety practices. *J Nanopart Res.* **14**: 749.
- Fraas L, Partain L. 2010. *Solar Cells and Their Applications*. John Wiley: New Jersey, NY.
- Frank AL, Joshi TK. 2014. The Global Spread of Asbestos. *Ann Glob Health.* **80**: 257–262.
- Fröhlich E. 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **7**: 5577–5591.
- Giovanni M, Tay CY, Setyawati MI, Xie J, Ong CN, Fan R, Yue J, Zhang L, Leong DT. 2014. *Toxicity profiling of water contextual zinc oxide, silver, and titanium dioxide nanoparticles in human oral and gastrointestinal cell systems*. *Environ Toxicol.* doi: 10.1002/wnan.1333.
- Guan W, Li SX, Reed MA. 2014. Voltage gated ion and molecule transport in engineered nanochannels: theory, fabrication and applications. *Nanotechnology* **25**: 122001.
- Haberl N, Hirn S, Holzer M, Zuchtriegel G, Rehberg M, Krombach F. 2015. Effects of acute systemic administration of TiO₂, ZnO, SiO₂, and Ag nanoparticles on hemodynamics, hemostasis and leukocyte recruitment. *Nanotoxicology* **11**: 1–9.
- Hamilton RF, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M, Holian A. 2009. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part. Fibre Toxicol.* **6**: 35.
- Hamilton RF, Wu N, Xiang C, Li M, Yang F, Wolfarth M, Porter DW, Holian A. 2014. Synthesis, characterization, and bioactivity of carboxylic acid-functionalized titanium dioxide nanobelts. *Part. Fibre Toxicol.* **11**: 43.
- Helland A, Scheringer M, Siegrist M, Kastenzholz HG, Wiek A, Scholz RW. 2008. Risk assessment of engineered nanomaterials: a survey of industrial approaches. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 640–646.
- Hendren CO, Mesnard X, Dröge J, Wiesner MR. 2011. Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 2562–2569.
- Hummel TZ, Kindermann A, Stokkers PC, Benninga MA, ten Kate FJ. 2014. Exogenous pigment in Peyer patches of children suspected of having IBD. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **58**: 477–480.
- Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Bergamaschi A. 2011. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles; a review of in vitro mammalian studies. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**: 481–508.
- Iavicoli I, Leso V, Ricciardi W, Hodson LL, Hoover MD. 2014. Opportunities and challenges of nanotechnology in the green economy. *Environ. Health* **13**: 78.
- Klaper R, Arndt D, Bozich J, Dominguez G. Molecular interactions of nanomaterials and organisms: defining biomarkers for toxicity and high-throughput screening using traditional and next-generation sequencing approaches. 2014. *Analyst* **139**: 882–895.
- Kim T, Hyeon T. 2014. Applications of inorganic nanoparticles as therapeutic agents. *Nanotechnology* **25**: 012001.
- Kim JH, Bohra M, Singh V, Cassidy C, Sowwan M. 2014. Smart composite nanosheets with adaptive optical properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**: 13339–13343.
- Liu Z, Miao YE, Liu M, Ding Q, Tjui WW, Cui X, Liu T. 2014. Flexible polyaniline-coated TiO₂/SiO₂ nanofiber membranes with enhanced visible-light photocatalytic degradation performance. *J Colloid Interface Sci.* **424**: 49–55.
- Liu R, Lal R. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Sci. Total Environ.* **514C**: 131–139.
- Mano SS, Kanehira K, Taniguchi A. 2013. Comparison of Cellular Uptake and Inflammatory Response via Toll-Like Receptor 4 to Lipopolysaccharide and Titanium Dioxide Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 13154–13170.
- Medina-Reyes EI, Déciga-Alcaraz A, Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro NL, Flores-Flores JO, Gutiérrez-López GF, Sánchez-Pérez Y, García-Cuellar CM, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. 2015. Titanium dioxide nanoparticles induce an adaptive inflammatory response and invasion and proliferation of lung epithelial cells in chorioallantoic membrane. *Environ. Res.* **136**: 424–434.
- Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol. Sci.* **101**: 239–253.
- Nel AE. 2013. Implementation of alternative test strategies for the safety assessment of engineered nanomaterials. *J. Intern. Med.* **274**: 561–77.
- Peters RJ, van Bommel G, Herrera-Rivera Z, Helsper HP, Marvin HJ, Weigel S, Tromp PC, Oomen AG, Rietveld AG, Bouwmeester H. 2014. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **62**: 6285–6293.
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res.* **14**: 1109.
- Pichat P. 2014. Are TiO₂ nanotubes worth using in photocatalytic purification of air and water?. *Molecules* **19**: 15075–15087.

12. ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN O BAJO REVISIÓN

1
2
3
4 **Food-grade titanium dioxide (E171) by solid or liquid matrix administration**
5 **induces inflammation, germ cells sloughing in seminiferous tubules and blood-**
6 **testis barrier disruption in mice**
7
8
9

10 Juan Carlos Rodríguez-Escamilla^{1&}, Estefany I. Medina-Reyes^{1,2,&}, Carolina Rodríguez-
11 Ibarra^{1,2}, Alejandro Déciga-Alcaraz^{1,2}, José O. Flores-Flores³, Adriana Ganem-
12 Rondero⁴, Miriam Rodríguez-Sosa¹, Luis I. Terrazas¹, Norma L. Delgado-Buenrostro^{1@},
13 Yolanda I Chirino^{1@}
14

15
16
17 ¹ Unidad de Biomedicina. Facultad de Estudios Superiores, Universidad Nacional
18 Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, CP
19 54059, Estado de México, México.
20

21
22 ² Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de
23 México.
24

25 ³ Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de
26 México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México.
27

28 ⁴División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Universidad Nacional
29 Autónoma de México, Estado de México, México
30

31
32 **& These authors contributed equally to this work.**
33
34
35

36
37 **@Corresponding author.** Laboratorio de Carcinogénesis y Toxicología, Unidad de
38 Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional
39 Autónoma de México, Av. de Los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090,
40 Estado de México, México. Tel.: +52 55 56231333 Ext. 39817. E-mail address:
41 nlbuenrostro@gmail.com & irasemachirino@gmail.com
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(Santonastaso et al., 2019). Perhaps, the following research must be conducted in human sperm from volunteers exposed to E171 contained in solid and liquid foods.

5. Conclusions

The daily dose reached by consumption of re-baked pellets containing 0.1% E171, 0.5% E171 and 1% E171 was 102 mg/kg_{bw}, 682 mg/kg_{bw} and 1379 mg/kg_{bw}, respectively, while the dose administered daily by intragastric gavage was 5 mg/kg_{bw}. The E171 administration in the re-baked pellets (solid matrix) and by intragastric gavage (liquid matrix) had no influence on body weight of mice during the study. Interestingly, regardless of the reached dose, both types of E171 administration, the oral consumption dosed at 682 mg/kg_{bw} and 1379 mg/kg_{bw} or intragastric administration of 5 mg/kg_{bw}, induced germ cells sloughing and increase of MHC-II expression, which demonstrated inflammatory cell infiltration in testis. The decrease of N-cadherin and collagen type I was also found in both types of administration indicating disruption of blood-testis barrier (effects summarized in table 4). This means that similar effects in testis were reached in spite of solid matrix was 136 times higher than liquid matrix.

This study highlights the importance of matrix of E171 consumption and liquid foods might have higher biological effects than expected. Finally, since children are having higher E171 consumption, this could lead to longer E171 exposure with impact on spermatozoa function or fertility during the adulthood.

6. Acknowledgments

This project was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT RN224119). Confocal microscopy images were acquired with a SP8 confocal Leica microscope granted by and the National Council of Science and Technology (CONACyT 268769). ADA, EIMR and CRI are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 582547, 576227 and 626239, respectively, from CONACYT. We thank Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) from Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT, UNAM) for the E171 characterization and also to Biol. Tomás