



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

**EFFECTOS TOXICOLÓGICOS DE DIÓXIDO DE SILICIO, DIÓXIDO DE TITANIO
E INDIO/DIÓXIDO DE ESTAÑO EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE
PULMÓN: IMPORTANCIA DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE
NANOMATERIALES MANUFACTURADOS**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:**

ALEJANDRO DÉCIGA ALCARAZ

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
UNIDAD DE BIOMEDICINA, FES-IZTACALA**

**COMITÉ TUTOR
DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DRA. EMMA BERTA GUTIERRES CIRLOS MADRID
UNIDAD DE BIOMEDICINA, FES-IZTACALA**

LOS REYES IZTACALA, EDO DE MEX. OCTUBRE 2020



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.

Directora de tesis

Dra, Yolanda Irasema Chirino López. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biomedicina, UNAM. Tlalnepantla de Baz. Estado de México.

Comité tutor

Dra. Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad Universitaria, CDMX.

Dra. Emma Berta Gutierrez Cirlos Madrid Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biomedicina, UNAM. Tlalnepantla de Baz. Estado de México.

Jurado de examen de grado

Dr. Ávila Moreno Federico
Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos-Madrid
Dra. Patricia Segura Medina
Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Dra. Patricia Ramírez Noguera

INDICE

Resumen general.....	1
Capítulo 1	
Propiedades fisicoquímicas de tres diferentes tipos de nanomateriales manufacturados: dióxido de silicio, dióxido de titanio e indio/dióxido de estaño	3
Resumen	5
1. Introducción.....	6
1.1 Nanopartículas de dióxido de silicio	8
1.2 Nanopartículas de dióxido de titanio	9
1.3 Nanopartículas de dióxido de indio/dióxido de estaño.....	11
1.4 Modificaciones en la superficie de las NPs	12
a) Proteína corona	12
b) Conjugación con rojo de alizarina.....	14
2. Antecedentes	16
3. Justificación	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivo general	19
5.1 Objetivos particulares	19
5.1.1 Propiedades fisicoquímicas e intrínsecas	19
5.1.2 Internalización y viabilidad	19
6. Materiales y métodos	20
6.1 Nanomateriales óxido metálicos	20
6.2 Caracterización de ENM	20
6.3 Formación de proteína corona	21
6.4 Producción de especies reactivas de oxígeno acelular.....	21
6.5 Conjugación con rojo de alizarina y análisis UV/Vis.....	22
6.6 Internalización de ENM en células epiteliales de pulmón.....	22
6.7 Reducción de MTT.....	23
7. Resultados	24
7.1 Propiedades fisicoquímicas de ENM.....	24
7.2 Patrón de la proteína corona sobre la superficie de ENM	25
7.3 NFs de TiO ₂ forma ROS de manera acelular	26
7.4 ARS tiene la capacidad de unirse a las NPs de SiO ₂ , NFs de TiO ₂ y NPs de ITO	28

7.5 ENM poseen la capacidad de internalizarse en células epiteliales de cáncer de pulmón.....	30
7.6 NPs de SiO ₂ y NFs de TiO ₂ afectan la viabilidad celular	32
8. Discusión	35
9. Conclusiones	41
10. Referencias	42
Capítulo 2.....	48
Comparación de los efectos citotóxicos inducidos por la exposición a ENM en células epiteliales de pulmón.....	48
Resumen	50
1. Introducción.....	52
1.1 Endocitosis y exocitosis de los ENM	54
1.2 ENM producen daño a citoesqueleto de actina afectando estructura y funciones celulares	57
1.3 Alteraciones del ciclo celular por ENM	59
2. Antecedentes	62
3. Justificación	64
4. Hipótesis	65
5. Objetivo general	65
5.1 Objetivos particulares	65
6. Materiales y Métodos	66
6.1 Caracterización de ENM mediante FTIR.....	66
6.2 ENM y tratamientos en células epiteliales de pulmón	66
6.3 Viabilidad celular	67
6.4 Granularidad y tamaño celular	67
6.5 Inmunofluorescencia de actina	68
6.6 Ciclo de celular de células epiteliales de pulmón	68
6.7 Ensayo de migración.....	69
6.8 Huellas moleculares de DNA, proteínas y lípidos de células epiteliales de pulmón expuestas a ENM.....	69
6.9 Análisis estadístico	70
7. Resultados	71
7.1 Propiedades fisicoquímicas de ENM.....	71
7.2 Viabilidad celular	72
7.3 ENM causan cambios en la granularidad y el tamaño celular.....	73
7.4 El citoesqueleto de actina es afectado por los ENM.....	75

7.5 Disminución de la fase G1 causada por los tres tipos de ENM y acumulación de la fase G2/M en células expuestas a NFs de TiO ₂ y NPs de ITO	77
7.6 La migración celular disminuye por la exposición a ENM.....	78
7.7 NFs de TiO ₂ promueven el aumento de alteraciones moleculares del DNA, proteínas y lípidos en comparación con las NPs de SiO ₂ e ITO.....	82
8. Discusión	88
9. Conclusiones	92
10. Referencias	93
Capítulo 3.....	98
Las nanopartículas de dióxido de titanio afectan la red del citoesqueleto disminuyendo el número de sus estructuras de manera irreversible.....	98
Resumen	101
1. Introducción.....	102
1.2 Citoesqueleto.....	104
a) Filamentos de actina	106
b) Filamentos intermedios.....	106
c) Microtúbulos	107
1.3. Enfermedades pulmonares asociadas a citoesqueleto	108
2. Antecedentes	110
3. Justificación	112
4. Hipótesis	113
5. Objetivo general	113
5.1 Objetivos particulares	113
6. Materiales y métodos	114
6.1 Caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio	114
6.2 Cultivo celular y exposición a nanopartículas de dióxido de titanio	114
6.3 Análisis de la ultraestructura de células epiteliales de pulmón.....	115
6.4 Viabilidad celular	116
6.5 Inmunofluorescencia de tubulina y actina.....	116
6.6 Western blot de tubulina y actina.....	117
6.7 Tamaño celular y granularidad.....	118
6.8 Migración celular	118
6.9 Expresión de los genes Ki67, SFTPB y MMP2.....	119
6.10 Análisis estadístico	120
7. Resultados	121

7.1 Caracterización de las NPs de TiO₂.....	121
7.2 Ultraestructura de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂	122
7.3 NPs de TiO₂ no afectan la viabilidad de células epiteliales de pulmón	123
7.4 NPs de TiO₂ afecta la polimerización de tubulina y actina de células epiteliales de pulmón de manera irreversible.....	124
7.5 NPs de TiO₂ afecta la expresión de actina a los 7 días de exposición en elevadas concentraciones	127
7.6 El tamaño y la granularidad celular son afectados por las NPs de TiO₂ ..	129
7.7 NPs de TiO₂ disminuye la migración celular	132
7.8 La expresión de Ki67 y SFTPb incrementa después de la exposición a NPs de TiO₂.....	135
8. Discusión	137
9. Conclusiones	142
10 Referencias	143
Apéndice	149

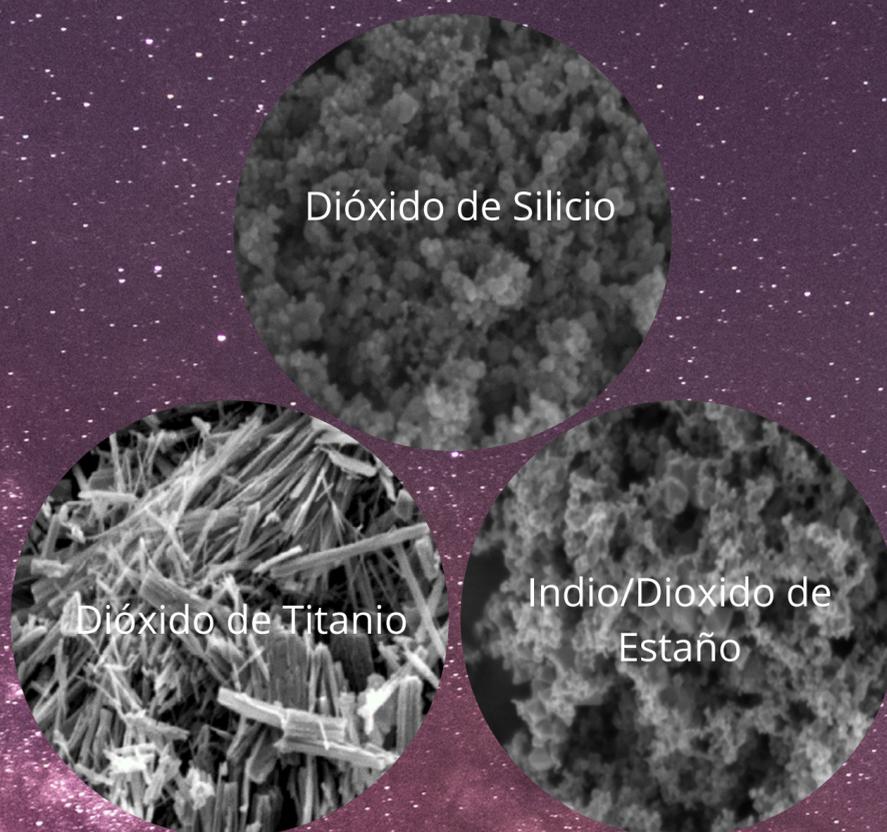
Resumen general

Los nanomateriales manufacturados (por sus siglas en inglés, ENM) han ido en incremento alrededor del mundo debido a que son materiales con características novedosas que hacen que los productos en donde se utilizan sean mucho más eficientes con grandes ventajas. Estas características que mejoran los productos son debido a las propiedades fisicoquímicas de los ENM como su tamaño, forma, área superficial y potencial zeta por mencionar algunas. Debido a este gran avance de manipular la materia a escalas nanométricas numerosas investigaciones se enfocan en sintetizar nuevas formas de ENM que tienen gran potencial para ser introducidas en el mercado. Sin embargo, las investigaciones se enfocan principalmente en la síntesis y pocos grupos se dedican a investigar los efectos tóxicos que estos pueden ocasionar en la salud humana. Como objetivo de esta investigación se utilizaron tres diferentes ENM como las nanopartículas (NPs) de dióxido de silicio (SiO_2), dióxido de titanio (TiO_2) en forma de nanofibras (NFs) y amorfas y NPs de indio/dióxido de estaño (ITO). El trabajo de investigación fue dividido en tres secciones iniciando con el estudio de las propiedades fisicoquímicas que los diferentes tipos de ENM analizando la capacidad que tienen de interactuar con proteínas del medio y si esta interacción afecta sus propiedades intrínsecas como la producción de ROS y la conjugación con otros componentes como el rojo de alizarina (ARS). Además, fue evaluada la capacidad que tienen los ENM de ser internalizados en células epiteliales de pulmón y si la viabilidad de las células se ve afectada por dicha exposición a los diferentes tipos de ENM. La segunda parte del estudio se enfocó en analizar los efectos citotóxicos de los ENM una vez que son internalizados por células epiteliales de pulmón. Se evaluó, la viabilidad de las células, así como la granularidad y el tamaño celular la cual se vio afectada por la exposición a los diferentes ENM. Debido a que el tamaño celular fue afectado por la exposición a los ENM se decidió evaluar el citoesqueleto de actina debido a que es el organelo que da forma y estructura a las células encontrando que es afectado por los ENM comprometiendo funciones esenciales para las células como la migración y el ciclo celular. Además, se encontró que las NFs de TiO_2 seguido por

las NPs de SiO₂ afectan el DNA, proteínas y lípidos. Por otro lado, debido a que se observó que las NFs de TiO₂ son mayormente citotóxicas en comparación con las NPs de SiO₂ e NPs de ITO y que el citoesqueleto es el principal afectado se decidió evaluar los efectos citotóxicos de NPs de TiO₂ para saber si los daños ocasionados al citoesqueleto persisten o son reversibles. Por lo que la tercera parte del estudio fue enfocada en analizar componentes del citoesqueleto como tubulina y actina exponiendo células epiteliales de pulmón a 1 µg/cm² y 10 µg/cm² 24 horas, 24 horas y 6 días libres de NPs y 7 días. Los resultados mostraron que la exposición a NPs de TiO₂ a los tres diferentes tiempos afecta la estructura del citoesqueleto de tubulina y actina además de alterar la morfología y la migración celular. Estas alteraciones causadas por las NPs de TiO₂ comprometieron la expresión de genes encargados de funciones primordiales de las células de pulmón como la proliferación (Ki67) y la producción de la proteína surfactante (SFTPB). Además, también fue analizada la expresión de la metaloproteasa 2 (MMP2) en donde no se encontraron cambios, resultados que sugieren que el daño causado por las NPs de TiO₂ es principalmente en citoesqueleto y no en la matriz extracelular. En conclusión, los tres tipos de ENM no pierden sus propiedades intrínsecas una vez que interaccionan con componentes biológicos como las proteínas, además, se encontró que las NFs de TiO₂ son mayormente citotóxicas seguido de las NPs de SiO₂ y las NPs de ITO alterando principalmente el citoesqueleto de actina. Finalmente, los resultados mostraron que los efectos causados al citoesqueleto de tubulina y actina por NPs de TiO₂ no son reversibles por lo que basta una primera interacción con las NPs de TiO₂ para generar daño que pueda persistir.

CAPÍTULO 1

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE TRES DIFERENTES TIPOS DE NANOMATERIALES MANUFACTURADOS: DIÓXIDO DE SILICIO, DIÓXIDO DE TITANIO E INDIO/DIÓXIDO DE ESTAÑO



Morfología de nanomateriales (Déciga-Alcaraz et al., 2020).

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos.”

— Marie Curie

Índice de figuras

Figura 1. Estudios realizados sobre ENM y sus aplicaciones y toxicidad.

Figura 2. Representación esquemática de la proteína corona.

Figura 3. Rojo de alizarina.

Figura 4. Morfología de ENM.

Figura 5. Patrón de proteínas adsorbidas del suero fetal bovino (SFB) sobre los ENM.

Figura 6. Producción de ROS acelular.

Figura 7. Análisis de espectros UV/Vis de NPs de SiO₂.

Figura 8. Análisis de espectros UV/Vis de NFs de TiO₂.

Figura 9. Análisis de espectros UV/Vis de NPs de ITO.

Figura 10. Internalización de ENM en células epiteliales de pulmón.

Figura 11. Viabilidad de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs.

Resumen

La producción de los nanomateriales manufacturados (ENM) ha alcanzado un aumento significativo en los últimos años a nivel mundial, siendo el dióxido de silicio (SiO_2) y el dióxido de titanio (TiO_2) aquellos ENM que encabezan la lista de producción a nivel mundial. Sin embargo, se han comenzado a sintetizar nuevos ENM con características novedosas que prometen mejorar los productos ya existentes en el mercado como lo es en el caso de las nanopartículas (NPs) de indio/dióxido de estaño (NPs de ITO). En la presente investigación, la cual se divide en tres capítulos, en su primera parte se describe la evaluación de las características fisicoquímicas de los ENM de las nanopartículas de dióxido de silicio (NPs de SiO_2), nanofibras (NFs) de TiO_2 y las NPs de ITO y su impacto en la formación de la proteína corona sobre la internalización y la viabilidad de células de origen epitelial de cáncer pulmonar. Además, fue evaluada la toxicidad de los diferentes ENM utilizados en células epiteliales de pulmón a diferentes concentraciones. Los resultados demostraron que al ser incubados con suero fetal bovino las NFs de TiO_2 poseen mayor capacidad de adsorber proteínas sobre su superficie seguido por las NPs de SiO_2 e NPs de ITO. Posteriormente, con el objetivo de evaluar la capacidad de conjugación de los ENM fue analizado el uso del rojo de alizarina (ARS) mostrando que las proteínas adsorbidas sobre la superficie de los ENM no afectan dicha conjugación ni con las propiedades intrínsecas de los ENM como la producción de ROS. Por otro lado, los ENM fueron internalizados por las células epiteliales de pulmón de manera concentración dependiente causando mayor toxicidad las NFs de TiO_2 seguido por las NPs de SiO_2 , sin embargo, con las NPs de ITO no mostraron efectos citotóxicos con las condiciones utilizadas en este estudio. Basado en los resultados se concluye que las propiedades intrínsecas de los ENM no se alteran aun siendo recubiertas por la proteína corona cuyo fenómeno se ha sugerido como una opción para disminuir los efectos citotóxicos de los ENM.

1. Introducción

Actualmente la nanotecnología ha incrementado rápidamente con el potencial de ser utilizada en una amplia variedad de aplicaciones de diferentes sectores. La Unión Europea ha definido a los nanomateriales como cualquier material natural, incidental o manufacturado que contiene al menos el 50% de partículas en un estado no unido o como agregado o aglomerado en donde una o más dimensiones externas están en el rango de tamaño de 1 nm-100 nm. A estas partículas se les denomina nanomateriales manufacturados (por sus siglas en inglés, ENM).

Debido a esta particular característica de los ENM sobre su tamaño, son utilizados en diferentes áreas como por ejemplo en la industria alimenticia la cual los emplea para la producción de aditivos/suplementos alimenticios y en la producción de empaques con propiedades térmicas los cuales alertan a los consumidores cuando los productos han expirado (Shafiq et al., 2020). También son empleadas en la agricultura para el crecimiento de las plantas y la resistencia al estrés (Zhao et al., 2020). Además, son estudiadas dentro de la medicina para ser utilizadas como acarreadores de fármacos y recientemente se estudian sus propiedades para ser una alternativa en terapias no invasivas (Wong et al., 2020).

Además, un número considerable de productos de uso común contienen ENM. La mayoría de los productos que los contienen son productos para la salud y acondicionamiento físico, cerca de 2000 productos, y aproximadamente una sexta parte de todos los productos caen dentro de la categoría para la casa y el jardín. Más de 700 productos son de cuidado personal y cerca de 400 son utilizados en ropa. Los ENM más utilizados para estos propósitos son los ENM de plata, principalmente por su actividad bactericida seguida por ENM de dióxido de titanio (TiO_2) y dióxido de silicio (SiO_2 ; <http://nanodb.dk/en/>).

Los ENM son atractivos para los diferentes sectores debido a sus propiedades fisicoquímicas como el tamaño primario, tamaño hidrodinámico, forma y potencial zeta las cuales son características que hacen que los productos finales sean mejores dentro del mercado. Sin embargo, los estudios sobre los ENM han sido mayormente sobre la búsqueda de las aplicaciones desarrollando nuevas formas y

tamaños para darles un uso y poco se ha estudiado sobre los efectos tóxicos que estos puedan llegar a tener en la salud humana.

De acuerdo con la base de datos PubMed los estudios de la última década acerca de los ENM es mayor para encontrar o proponer aplicaciones en comparación con estudios relacionados a la toxicidad (Figura 1).

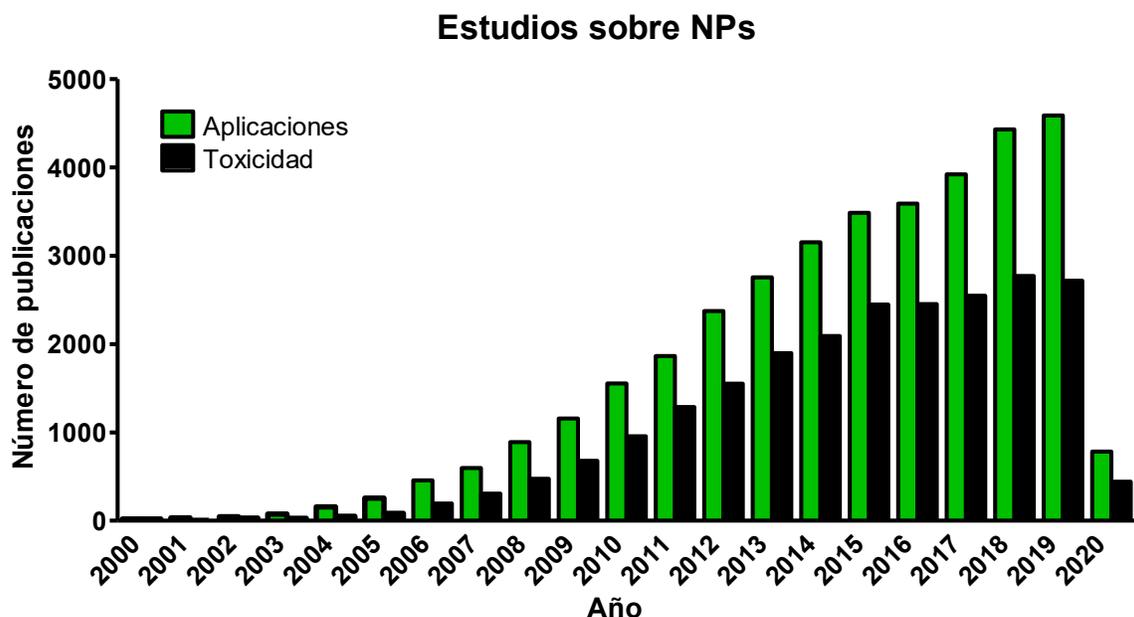


Figura 1. Estudios publicados en las últimas dos décadas sobre las aplicaciones y toxicidad de los ENM. Información extraída de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Estos datos son importantes ya que es claro que las investigaciones sobre NPs están principalmente enfocadas en encontrar una aplicación y desarrollar nuevas formas, que los daños que estas puedan ocasionar.

Por otro lado, cabe remarcar que los ENM más producidos a nivel mundial son de dióxido de titanio (TiO_2) seguidas por dióxido de silicio (SiO_2 ; Garduño-Balderas et al., 2015). Además, por la búsqueda de nuevas formas para las aplicaciones recientemente se han comenzado a sintetizar combinaciones de ENM como dióxido de indio/dióxido de estaño ($\text{In}_3\text{O}_2/\text{SnO}_2$; ITO) en una proporción 9:1 respectivamente. Por lo que es de gran importancia empezar a estudiar a los ENM por sus propiedades fisicoquímicas para poder predecir cuáles serán los efectos que estas puedan ocasionar a las personas que se encuentren expuestas a ellas.

1.1 Nanopartículas de dióxido de silicio

El silicio (Si) es uno de los elementos más abundantes de la Tierra y el sílice cristalino en forma de cuarzo es el mineral más abundante sobre la corteza terrestre (Yang et al., 2018). El SiO₂ es un óxido metálico del grupo IV el cual se encuentra naturalmente en forma cristalina y amorfa.

Las propiedades físicas y químicas del SiO₂ lo hacen adecuado para muchos usos por lo que su producción ha ido en aumento. De acuerdo con la US Geological Survey en 2017 se estimó una producción de 273 mil toneladas de SiO₂ en todo el mundo (<https://www.usgs.gov/>).

La mayoría del SiO₂ utilizado de manera comercial es obtenido de fuentes naturales y es categorizado en tres tipos por la industria como: arena y grava, cristales de cuarzo y diatomitas (NTP, 2005).

El SiO₂ categorizado como arena ha sido utilizado para diferentes propósitos a través de la historia, el más antiguo y principal uso ha sido para la manufacturación de cristal por ejemplo las ventanas y la fibra de vidrio, además de ser utilizado también en cerámica. Los cristales de cuarzo han sido utilizados por cientos de años en la joyería, además, actualmente es utilizado en la electrónica y componentes ópticos para dispositivos especializados (IARC, 1997). El SiO₂ en forma de diatomitas es principalmente utilizado como relleno para pinturas, papel, absorbentes de laboratorio y agentes anti aglomerantes (IARC, 1997).

Por otro lado, para aprovechar al máximo las propiedades del SiO₂ la nanotecnología se ha encargado de sintetizar SiO₂ en tamaño nanométrico produciendo nanopartículas (NPs) con diferentes formas. Para esto se realizan diferentes métodos de síntesis dependiendo la forma deseada.

Existen NPs de SiO₂ con diferentes formas como las NPs de SiO₂ no porosas las cuales son sintetizadas mediante el método llamado Aerosil en donde las NPs de SiO₂ no porosas se producen a elevadas temperaturas que van de 1000°C a 2500°C mediante la hidrólisis de SiCl₄ (tetracloruro de silicio). Para sintetizar NPs de SiO₂ coloidales se utiliza el proceso sol-gel el cual consiste en un sistema de reacciones químicas utilizando amonio como catalizador proceso que resulta en la formación

controlada de NPs de SiO₂ en forma de esferas (Stöber et al., 1968). El método de microemulsiones es ampliamente utilizado para formar NPs de SiO₂ porosas ya que es fácil de controlar y consiste en la solubilidad de silicatos utilizando solventes orgánicos (Yamauchi et al., 1989). Para la síntesis de NPs de SiO₂ amorfas se utiliza el método de precipitación y gelificación. Estos son algunos ejemplos de síntesis de diferentes formas de NPs de SiO₂ las cuales se emplean en diferentes productos como en la industria alimenticia que utiliza las NPs de SiO₂ amorfas como agentes antiaglomerantes y antiespumantes denominadas también como aditivo E551 por la Unión Europea.

Las NPs de SiO₂ de diferentes formas y tamaños están presentes en los productos utilizados en la vida cotidiana. Sin embargo, los estudios que respaldan su seguridad son insuficientes y en algunos casos controvertidos. Por lo que es importante estudiar los efectos que las NPs de SiO₂ puedan tener en la salud humana con relación a su forma y tamaño.

1.2 Nanopartículas de dióxido de titanio

El titanio (Ti) es el noveno elemento más abundante de la corteza terrestre con una amplia distribución. Se estima que la concentración promedio de Ti en la corteza terrestre es de 4,400 mg/kg. Debido a su gran afinidad con el oxígeno el Ti no existe en estado metálico en la naturaleza. Existen cuatro diferentes tipos de TiO₂ de manera natural debido a su forma cristalina: rutilo, anatasa, brookita y dióxido de titanio B. Rutilo y anatasa tienen una forma cristalina tetragonal mientras que la brookita es ortorrómbica y el dióxido de titanio B tiene una forma cristalina monoclinica la cual consiste en tres ejes, todos ellos son desiguales en longitud. De estas formas cristalinas solo anatasa y rutilo son económicamente importantes. De acuerdo con la US Geological Survey en 2016, se estimó una producción de 1,730,000 toneladas de TiO₂ en todo el mundo (<https://www.usgs.gov/>).

El TiO₂ es manufacturado a partir de un mineral llamado ilmenita para posteriormente ser utilizado como pigmento blanco por su alto índice de refracción

y se emplea en pinturas, recubrimientos, plásticos, papel, tintas, cosméticos y pastas de dientes (Shi et al., 2013).

El TiO_2 es sintetizado por dos diferentes métodos para poder ser utilizado como pigmento. Uno de estos métodos es el proceso de cloruro en donde el rutilo es convertido a tetracloruro de titanio que es oxidado a una temperatura de 1000°C y el TiO_2 restante es calcinado para eliminar el cloro residual y cualquier ácido clorhídrico que pueda haberse formado en la reacción. Otro método de síntesis de TiO_2 es por el proceso de sulfato en donde la ilmenita se hace reaccionar con ácido sulfúrico formando hidróxido de titanio el cual es precipitado por hidrólisis filtrado y calcinado (IARC, 2010).

El TiO_2 también es producido en escalas nanométricas formando NPs de TiO_2 las cuales son sintetizadas de diferentes formas como esferas, fibras, tubos, anillos entre otras muchas formas (Chen & Mao, 2007; Wang et al., 2014). Las diferentes formas de NPs de TiO_2 que son sintetizadas tienen diferentes aplicaciones. Una característica por las cuales son muy utilizadas las NPs de TiO_2 , es por su actividad fotocatalítica en productos para la filtración de la luz UV (EPA 2010). Ya que las NPs de TiO_2 tienen la capacidad de dispersar la luz visible o luz UV dependiendo de su tamaño. Se ha demostrado que NPs de TiO_2 con un tamaño promedio de 230 nm pueden dispersar la luz visible y con un tamaño de 60 nm dispersan la luz UV (Skocaj et al., 2011).

Las NPs de TiO_2 han sido utilizadas ampliamente en diferentes productos de uso común incluso es utilizado en aditivo para alimentos denominado como E171 además, de ser utilizado como excipiente para medicamentos. Sin embargo, nuevas formas de NPs de TiO_2 siguen apareciendo para ser propuestas como novedosos materiales dentro del mercado prometiendo mejorar las características de los productos.

1.3 Nanopartículas de dióxido de indio/dióxido de estaño

El indio/óxido de estaño (ITO, por sus siglas en inglés) no se encuentra de manera natural en la Tierra, sin embargo, el indio (In) es el elemento que se encuentra presente naturalmente en un porcentaje muy pequeño en la corteza terrestre.

ITO es una mezcla sólida de dióxido de indio (In_2O_3) y de óxido de estaño (SnO_2) en una proporción de 90% y 10% respectivamente.

La síntesis de ITO es mediante un proceso llamado sinterizado en el cual se utiliza calor y presión para combinar el óxido de indio y el óxido de estaño para formar discos comprimidos llamados objetivos de pulverización catódica (Cummins et al., 2016). El proceso introduce una alta densidad de electrones libres y vacantes de oxígeno en la estructura cristalina del In_2O_3 impartiendo las propiedades electrónicas específicas del ITO (Lison et al., 2009).

Las estadísticas de producción de ITO no están públicamente disponibles. Sin embargo, se tiene el dato de producción del In_2O_3 el cual se estimó para el 2015 una producción de 755 toneladas a nivel mundial (USGS, 2016). Debido a que la información de la producción del ITO no está disponible se estimó que en 2015 existió una producción mayor a 500 toneladas por año. Esto por el alto consumo de In_2O_3 el cual es utilizado para la producción de ITO registrado por los cinco principales países productores de In_2O_3 los cuales son, en orden descendiente de importancia, China, República de Corea, Japón, Canadá y Francia (USGS, 2016).

ITO es principalmente utilizado en películas conductoras transparentes las cuales se colocan en paneles de vidrio o plástico de dispositivos electrónicos como paneles táctiles, pantallas de plasma, pantallas planas, paneles solares, y sensores de gas (NTP, 2009).

Resulta de gran importancia conocer los efectos que ITO pueda tener sobre la salud humana debido a que es un nuevo compuesto que es utilizado en diferentes dispositivos, a los cuales la mayoría de la población tiene acceso. La exposición a ITO ocurre principalmente en entornos ocupacionales donde se produce o procesa el ITO.

1.4 Modificaciones en la superficie de las NPs

Debido a la enorme producción y a su amplio uso de las NPs los humanos nos encontramos expuestos a las NPs. La exposición puede ser de varias formas como por ejemplo por el consumo de medicamentos y productos alimenticios, por medio de inhalación en lugares ocupacionales o por el uso de cosméticos en heridas abiertas. Al estar expuestos las NPs pueden atravesar los límites celulares e interactuar con los fluidos biológicos e incluso llegar a torrente sanguíneo e interactuar con la sangre. Cuando las NPs no tienen ninguna modificación superficial se les conoce como NPs prístinas, sin embargo, existen modificaciones como la formación de la proteína corona.

a) Proteína corona

Las NPs tienen un área superficial altamente específica, así como reactividad superficial, fuerte interacción entre partículas, propiedades eléctricas y ópticas, además también tienen propiedades electrocatalíticas y fotocatalíticas aplicadas ampliamente en energía y el ambiente (Li et al., 2019), en la comida y medicina (Chan et al., 2018; Wang et al., 2018). En el campo de la biomedicina las NPs pueden ser utilizadas como acarreadores de fármacos, vacunas, diagnósticos e imágenes, sin embargo, aún existen obstáculos dentro de estas aplicaciones clínicas.

Actualmente se sabe que al momento de que las NPs interactúan con los fluidos biológicos éstas inmediatamente son recubiertas por biomoléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos entre otros muchos componentes y a este fenómeno se le conoce como “corona” (Lundqvist et al., 2011). La formación de la corona alrededor de las NPs es modulada por la entrada de las NPs en el cuerpo. La composición de la corona depende de las características de las NPs como su tamaño, carga superficial y su morfología (Monopoli et al., 2011). Todas las biomoléculas interactúan con la superficie de las NPs compitiendo entre ellas, sin embargo, las que mayormente interactúan con las NPs son las proteínas debido a su elevada cantidad en los fluidos por lo que a la corona se le conoce como “proteína corona”.

La proteína corona se divide en hard-corona y soft-corona. La hard-corona está formada por las proteínas que tienen alta afinidad e interacciones fuertes con la superficie de las NPs. En contraste, la soft-corona involucra a las proteínas que tienen menor afinidad con la superficie de la NPs presentando una rápida tasa de intercambio (Figura 2; Pareek et al., 2018).

Las diferencias de las propiedades de las NPs y el ambiente son importantes para la proteína corona ya que va a interactuar con lo que exista en los fluidos vía adsorción. Además, la proteína corona es compleja y única para cada NPs tomando en cuenta también la cantidad de componentes que se encuentren en el medio. Por lo que es difícil predecir la composición exacta de la proteína corona (Nguyen & Lee., 2017).

Por otro lado, se ha propuesto que las NPs recubiertas con la proteína corona sean utilizadas en la nanomedicina debido a que la toxicidad de las NPs disminuye con la recubierta (Nguyen & Lee., 2017). Sin embargo, hacen falta más estudios para poder entender este fenómeno y poder emplearlo en el campo de la biomedicina como las investigaciones lo indican.

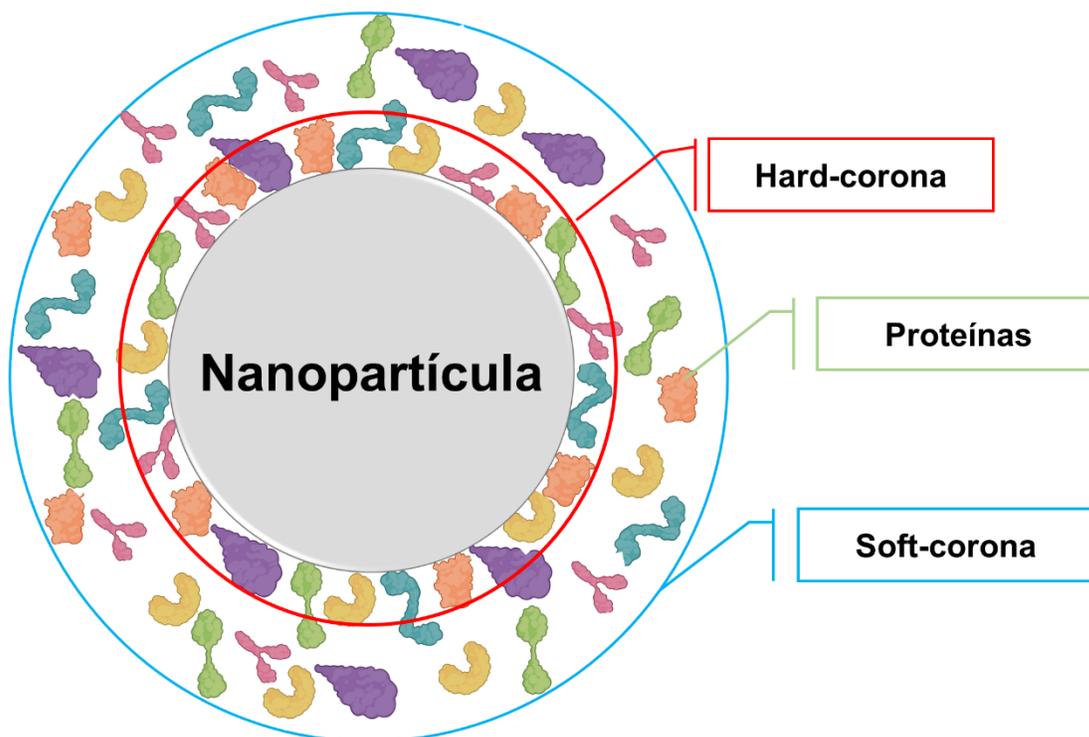


Figura 2. Representación esquemática de la proteína corona. La superficie de las NPs es recubierta por proteínas del medio. Las proteínas forman dos capas sobre la superficie de las NPs conocidas como hard-corona (círculo rojo), que son proteínas con mayor afinidad hacia la superficie de las NPs. La soft-corona (círculo azul) la componen proteínas que tienen menor afinidad a la superficie de las NPs y se encuentran en constante dinamismo uniéndose y separándose de las proteínas que forman la hard-corona.

b) Conjugación con rojo de alizarina

Dentro del área de la biomedicina las NPs han tomado un papel importante como tratamiento para diferentes enfermedades. Sin embargo, se ha demostrado que las NPs una vez administradas pueden depositarse en diferentes tejidos y provocar daños (Janßen et al., 2020).

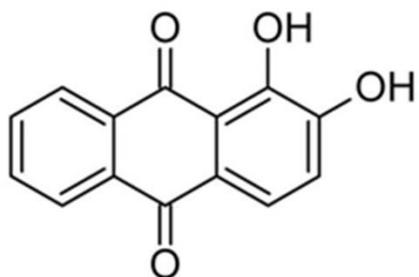
Para poder conocer la localización y el destino de las NPs, existen estudios que se han enfocado en modificar su superficie utilizando diferentes compuestos fluorescentes (McCabe-Lankford et al., 2018; Mekuria et al., 2018). Por otro lado, se ha estudiado la interacción que tienen las NPs con las células y se ha cuestionado si las NPs son internadas por las células debido a que los mecanismos de internalización no son del todo claros.

Los métodos utilizados para conocer la localización de las NPs dentro de las células son escasos y el más utilizado es la microscopía electrónica de transmisión (por sus siglas en inglés TEM; Srijampa et al., 2020; Palacios-Hernandez et al. 2020). Sin embargo, existe un método sencillo para poder localizar a las NPs de manera *in vitro* realizando una tinción con rojo de alizarina (por sus siglas en inglés ARS), método por el cual las NPs quedan marcadas y pueden ser observadas mediante microscopía confocal.

La ARS es una sal monosódica (Figura 3) extraída originalmente de la raíz de la planta *Rubia perigrina* que es una especie de liana herbácea perteneciente a la familia de las rubiáceas. La ARS ha sido ampliamente utilizada para teñir depósitos de calcio (Bensimon-Brito et al., 2016; Solomon et al., 2018). Sin embargo, recientemente se ha utilizado la ARS en NPs de TiO₂ para poder detectarlas en células y saber si son capaces de internalizarse (Thurn et al., 2009; Thurn et al., 2011). Este tipo de conjugación entre ARS y NPs solo se ha realizado con NPs de

TiO₂ y no existen estudios en donde se pruebe la ARS con algun otro tipo de NPs de naturaleza oxido metaloide/metálica como el SiO₂ e ITO respectivamente.

A



B



Figura 3. Rojo de alizarina. A) estructura química del rojo de alizarina. **B)** ARS comercial.

2. Antecedentes

Las interacciones biológicas de las NPs dependen de sus propiedades fisicoquímicas como se abordó previamente. Algunos estudios se han enfocado en establecer correlaciones entre las características de las NPs y los resultados biológicos para poder predecir el comportamiento biológico de las NPs sin experimentación previa (Shaw et al, 2008). Debido a la enorme cantidad de NPs que existen con propiedades fisicoquímicas diferentes y la complejidad de los sistemas biológicos es un gran reto realizar una correlación entre las propiedades fisicoquímicas de las NPs y las respuestas celulares tales como las modificaciones morfológicas celulares, la viabilidad de las células, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Estudios se han enfocado en investigar los efectos celulares de las NPs recubiertas con la proteína corona concluyendo que la proteína corona disminuye la citotoxicidad de las NPs posiblemente porque la proteína corona formada sobre la superficie de las NPs hace que sean más biocompatibles con el cuerpo humano (Wang et al., 2013; Clift et al., 2010; Tedja et al 2012).

Debido a que diferentes tipos de NPs se han propuesto como acarreadores de fármacos se ha estudiado la importancia de la proteína corona para hacer más efectivas a las NPs para cumplir su propósito como acarreadoras. Por ejemplo, se ha estudiado la adsorción de albúmina sérica humana y de bovino en NPs de TiO_2 y NPs de SiO_2 en donde encontraron que las NPs adsorben en diferente cantidad la albúmina, además, de que la albúmina al interactuar con las NPs de SiO_2 y con NPs de TiO_2 tiene cambios conformacionales dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las NPs. Este estudio proporciona un análisis comparativo entre las diferentes características de las NPs y la proteína corona para desarrollar NPs seguras para su aplicación como acarreadores de fármacos (Cristian et al., 2019).

Se ha estudiado el efecto que tienen las proteínas séricas sobre el rompimiento de membrana causado por NPs de SiO_2 con un tamaño primario de 55-68 nm en cuatro diferentes tipos celulares como eritrocitos, linfocitos, melanomas y macrófagos. Se estudiaron los efectos de las NPs de SiO_2 pristinas y NPs de SiO_2 recubiertas con la proteína corona la cual fue formada con suero fetal bovino (SFB). Los resultados

mostraron que las NPs de SiO₂ desnudas causaron rompimiento de la membrana celular en comparación con las NPs de SiO₂ recubiertas con la proteína corona las cuales interaccionaron con las membranas celulares sin producir rompimiento debido a la adsorción de proteínas sobre la superficie de las NPs de SiO₂ que son específicas para las membranas celulares (Shinto et al., 2019).

Por otro lado, se ha estudiado el efecto de las NPs de TiO₂ sobre las membranas celulares. Se ha demostrado que las NPs de TiO₂ tienen la capacidad de oxidar membranas lipídicas determinando la cantidad de malondialdehído de células de carcinoma cervical (HeLa) con solo 12 horas de exposición a NPs de TiO₂. Sin embargo, cuando las NPs de TiO₂ son recubiertas con SFB formando la proteína corona la lipoperoxidación de las membranas disminuye (Runa et al., 2017).

Una de las características principales de las NPs de TiO₂ es su capacidad fotocatalítica, razón por la cual se utiliza en pigmentos y cosméticos como se mencionó anteriormente. Esta característica es la responsable de la producción de ROS en modelos celulares cuando las NPs de TiO₂ son expuestas a luz UV, efecto ampliamente estudiado. Sin embargo, cuando las NPs de TiO₂ son internadas en el cuerpo estos procesos ocurren en la oscuridad sin exposición a luz UV. Por lo que se ha investigado la capacidad de generar ROS de TiO₂ grado alimenticio y NPs de TiO₂ demostrando que ambos tipos de TiO₂ generan bajos niveles de ROS, específicamente radical hidroxilo y superóxido, en oscuridad. Además, cuando las NPs de TiO₂ son recubiertas con la proteína corona esta es oxidada desencadenando estrés oxidante en células HeLa (Jayaram et al. 2017).

3. Justificación

La nanotecnología ha ido en incremento en la última década desarrollando nuevas formas y tamaños de ENM a los cuales se les busca una aplicación para mejorar las características de los productos existentes en el mercado. Esto es muy claro debido a los estudios que se realizan sobre la síntesis de nuevas formas de ENM los cuales se enfocan principalmente en proponer nuevas aplicaciones. Sin embargo, existen estudios los cuales se enfocan en estudiar los efectos tóxicos que los ENM puedan llegar a tener en la salud humana.

Por otro lado, es muy poca la información que se tiene sobre las propiedades intrínsecas de los ENM. Además, se sabe que los ENM al entrar en contacto con fluidos biológicos se forma una cubierta llamada proteína corona la cual ha comenzado a estudiarse con mayor detalle observando que puede disminuir los efectos tóxicos de los ENM en modelos celulares. Sin embargo, no se han estudiado las propiedades intrínsecas de los ENM junto con la proteína corona de manera celular.

Por lo anterior, es de nuestro interés estudiar las propiedades intrínsecas de los ENM y la influencia que tiene la proteína corona sobre ellos.

En esta primera parte del estudio se compararon las propiedades intrínsecas de tres diferentes tipos de ENM como NPs de SiO_2 y NFs de TiO_2 las cuales se encuentran en los primeros lugares de producción a nivel mundial y las NPs de ITO que comienzan a sintetizarse teniendo un gran impacto en el mercado. Por lo que es importante realizar estudios sobre sus propiedades fisicoquímicas para poder predecir sus efectos en sistemas biológicos.

4. Hipótesis

Las propiedades intrínsecas de los ENM se verán afectadas por la formación de la proteína corona disminuyendo la producción de ROS y la capacidad de interactuar con otros compuestos como el rojo de alizarina. Además, la proteína corona no impedirá que los ENM sean internalizados por las células epiteliales de pulmón y no afectarán su viabilidad.

5. Objetivo general

-Evaluar las propiedades fisicoquímicas e intrínsecas de los ENM así como su capacidad de internarse y su potencial tóxico en células epiteliales de pulmón cuando están recubiertas con la proteína corona y el rojo de alizarina.

5.1 Objetivos particulares

5.1.1 Propiedades fisicoquímicas e intrínsecas

1. Sintetizar NFs de TiO₂ a partir de NPs de TiO₂ amorfas.
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas en suspensión de los ENM como el tamaño hidrodinámico, potencial zeta y la polidispersión.
3. Inducir la formación de proteína corona en ENM mediante incubación con SFB.
4. Analizar la formación de la proteína corona en la superficie de los ENM mediante electroforesis.
5. Cuantificar la producción de ROS de manera acelular de los ENM prístinos y recubiertos con la proteína corona.
6. Evaluar el efecto de la formación de la proteína corona en la conjugación del rojo de alizarina con los tres tipos de ENM.

5.1.2 Internalización y viabilidad

1. Evaluar la internalización de los ENM prístinos y recubiertos con la proteína corona en células epiteliales de pulmón.
2. Evaluación de la viabilidad de células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes tipos de ENM prístinos y recubiertos con la proteína corona.

6. Materiales y métodos

6.1 Nanomateriales óxido metálicos

Se utilizaron tres tipos de ENM con diferente composición química tales como NPs de SiO₂ con un tamaño primario de 10-20 nm (Aldrich Cat. No. 637238), NPs de ITO con un tamaño primario <50 nm (Sigma Aldrich Cat. No. 544876). Además, fueron utilizadas TiO₂ NF las cuales no están disponibles comercialmente y fueron sintetizadas a partir de NPs de TiO₂ amorfas (Sigma Aldrich Cat. No.637254) mediante un proceso hidrotérmico. Brevemente, se pesaron 0.5 g de NPs de TiO₂ las cuales fueron resuspendidas en 35 mL de una solución 10 M de NaOH durante 10 minutos. Para dispersar las NPs de TiO₂ la solución fue ultrasonicada durante 15 minutos en un recipiente de teflón. Posteriormente, la solución fue puesta en un contenedor de acero el cual fue sellado completamente y calentado a 200 °C durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas las NPs de TiO₂ fueron lavadas exhaustivamente con agua desionizada y centrifugadas a 3,500 rpm entre cada lavado. El pH de la solución fue ajustado a pH 7 mediante lavados con 0.1 M de HCl centrifugando a 3,500 rpm entre cada lavado. Finalmente, el TiO₂ fue calcinado a 700 °C por 30 min., con una rampa de temperatura a una velocidad de 1 °C/minuto (Hamilton et al., 2009).

6.2 Caracterización de ENM

El tamaño primario de los ENM fue analizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés; JEOL 5800-LV, Japón; QUANTA FEG 3D), 80 000X, 30 KV, 26 pixeles/nm². El tamaño hidrodinámico y el potencial zeta de los tres tipos de ENM fue determinado mediante dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés; Zetasizer nano-zs90, Malvern Instruments). Brevemente, se pesó 1 mg de cada tipo de ENM el cual fue resuspendido en 1 mL de diferentes medios líquidos tales como SFB (Gibco Cat. No. 10438026) medio de cultivo celular (F12K; Sigma Aldrich Cat. No. N3520) y medio F12K suplementado con 10 % de SFB. Posteriormente, los ENM fueron resuspendidos en los diferentes medios líquidos y fueron sonicados durante 30 minutos a 40 Hz. Inmediatamente, las muestras fueron diluidas en una proporción 1:100 y el tamaño hidrodinámico y

potencial zeta fueron analizados. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.3 Formación de proteína corona

Para formar la proteína corona en los tres diferentes tipos de ENM se preparó un stock pesando 1 mg de cada ENM el cual fue resuspendido en 1 mL de SFB. Los tres diferentes stocks fueron sonicados a temperatura ambiente durante 30 minutos a 40 Hz (Branson 1800H, Emerson Industrial Automation). Posteriormente, los ENM fueron incubados a 37°C durante 24 horas. La adsorción de las proteínas sobre los ENM fue analizada mediante electroforesis considerando como hard-corona el pellet y soft-corona el sobrenadante. Brevemente, después de la incubación con SFB los tubos fueron centrifugados a 2.5 x g durante 5 minutos, posteriormente, 10 µL de muestra (pellet o del sobrenadante) fue cargada en un gel de poliacrilamida al 12% corriéndose a 130 mV por 180 minutos. El gel de poliacrilamida fue teñido con azul brillante de Coomassie G-250 (JT Baker No. Cat. 6104-58-1) durante toda la noche. Finalmente, el gel de poliacrilamida fue desteñido de acuerdo con Sreeramulu y Singh, 1995 y analizado mediante un fotodocumentador Gel Doc EZ System (Bio-Rad).

6.4 Producción de especies reactivas de oxígeno acelular

La producción de especies reactivas (ROS por sus siglas en inglés) fue determinada de manera acelular con la finalidad de conocer si los ENM tienen la capacidad de producir ROS de manera independiente. La técnica se realizó de acuerdo con lo reportado por Venkatachari en 2005 (Venkatachari et al., 2005) realizando pequeñas modificaciones. Brevemente, 0.5 mL de 1 mM de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA; Cayman, No. Cat. 85155) disuelta en alcohol etílico fue mezclada con 2 mL de 0.01 N NaOH e incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos y neutralizada con 10 mL de PBS pH 7.2. Posteriormente, la solución fue mantenida en oscuridad a 4°C hasta su uso. Antes de cada análisis 1 µM de DCFH fue mezclado con peroxidasa de rábano (HRP; Pierce Chemical, IL, U.S.A.)

en una proporción de 0.5 unidades de HRP/mL de DCFH. Posteriormente los ENM fueron resuspendidos de manera independiente en agua desionizada estéril en una proporción 1:1. Inmediatamente, 1 μM del complejo DHCF-HRP fue adicionado a las diferentes concentraciones de los ENM (1, 5, 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en placas oscuras con fondo transparente de 96 pozos e incubadas durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, la placa fue analizada mediante espectrofluorimetría (FLx800™ Fluorescence Reader) con una onda de excitación de 486 nm y una onda de emisión de 530 nm. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.5 Conjugación con rojo de alizarina y análisis UV/Vis

Los ENM fueron conjugados con ARS como lo reportado por Thurn et al., 2009 realizando pequeñas modificaciones. Brevemente, se disolvieron 10 mM de fosfato disódico (Na_2HPO_4) en agua destilada, posteriormente, 0.9 mM de ARS fueron agregados a la solución de Na_2HPO_4 y la mezcla fue agitada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez preparada la ARS, 500 μM de cada ENM fue resuspendido en ARS, por separado, e incubados durante 24 y 48 horas. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante espectrometría UV/Vis (ultravioleta/visible) realizando barridos de 200-700 nm (Epoch™ BioTek Instruments, Inc.). Este procedimiento se realizó con los tres tipos de ENM, prístinas y con la previa formación de proteína corona. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.6 Internalización de ENM en células epiteliales de pulmón

Células epiteliales de pulmón fueron expuestas durante 24 horas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de ENM previamente conjugados con ARS. Posteriormente, las células epiteliales de pulmón fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 60 minutos y lavadas con PBS 1X. Inmediatamente, las células epiteliales de pulmón fueron permeabilizadas con PBS-0.5% tritón durante 8 min y lavadas con PBS 1X tres veces para retirar el exceso de tritón. Posteriormente, las células epiteliales de pulmón fueron incubadas durante 1 hora con 1% de albúmina sérica bovina. Las

muestras fueron incubadas con Hoechst (Life Technologies, Cat. No.62249) en una dilución 1:1000 para detectar el núcleo. Finalmente, las células se observaron mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP8). Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.7 Reducción de MTT

La viabilidad de células epiteliales de pulmón fue analizada mediante la reducción de 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium (MTT). Brevemente, células epiteliales de pulmón fueron sembradas en placas de 96 pozos en una densidad de 10,000 células por pozo y expuestas a 1, 5, 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de cada ENM durante 24 horas, prístinos y recubiertos con la proteína corona. Posteriormente, el sobrenadante fue retirado y las células epiteliales de pulmón fueron lavadas tres veces con PBS 1X para retirar el exceso de ENM. Inmediatamente, las células epiteliales de pulmón fueron incubadas con medio F12K suplementado con 10% de SFB y 0.5 mg/mL de MTT a 37°C durante 2 horas. Transcurrido el tiempo de incubación fue retirado el MTT del cultivo celular y los cristales de formazán que se formaron en la monocapa celular fueron disueltos con 100 μL de isopropanol. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos con la finalidad de descartar ENM que puedan interferir con la lectura de la absorbancia. Finalmente, los sobrenadantes fueron analizados mediante espectrometría a una longitud de onda de 540 nm (Epoch™ BioTek Instruments, Inc.). Tres experimentos independientes fueron realizados.

7. Resultados

7.1 Propiedades fisicoquímicas de ENM

Los ENM fueron analizados mediante SEM y los resultados mostraron que las NPs de SiO₂ son amorfas con un tamaño primario >100 nm (Figura 4A). Las NFs de TiO₂ que fueron sintetizadas a partir de las NPs de TiO₂ comerciales mostraron una forma de fibra con una longitud <100 nm (Figura 4B). Finalmente, NPs de ITO fueron amorfas con un tamaño primario >100 nm (Figura 4C). El tamaño hidrodinámico de los tres diferentes tipos de ENM fueron analizados en diferentes medios tales como medio de cultivo F12k, SFB y medio de cultivo F12k suplementado con 10% de SFB para conocer el tamaño de aglomerados que pueden formar en dichos medios. NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y NPs de ITO resuspendidas en medio de cultivo F12k formaron aglomerados de 444 nm, 722 nm y 586 nm respectivamente (Tabla 1). Cuando NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y las NPs de ITO fueron resuspendidas en SFB formaron aglomerados de 516 nm, 519 nm y 390 nm respectivamente (Tabla 1). Sin embargo, al ser resuspendidas las NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y las NPs de ITO en el medio F12k suplementado con 10% de SFB tuvieron la capacidad de formar aglomerados de 328 nm, 366 nm y 278 nm respectivamente (Tabla 1; se realizaron tres experimentos independientes). El potencial zeta de los ENM oscilo entre -6.6 y -15.2 mV y la polidispersión fue menor a 1.0 para los tres tipos de ENM (Tabla 1).

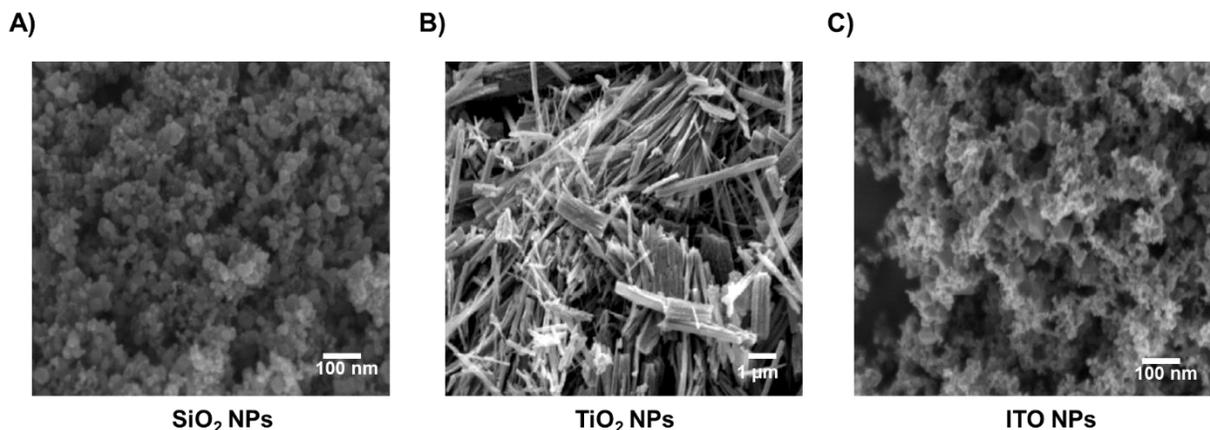


Figura 4. Morfología de ENM. Tres tipos de NPs fueron analizadas mediante SEM. Imágenes representativas muestran la morfología de **A)** nanopartículas de dióxido de silicio (NPs de SiO₂), **B)** nanofibras de dióxido de titanio (NFs de TiO₂) y **C)** nanopartículas de ITO con una forma amorfa, de fibras y amorfa respectivamente.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de ENM.

Nanopartícula	Medio	Tamaño hidrodinámico (nm)	Potencial zeta (mV)	Polidispersión (PDI)
SiO ₂ NPs	F12K	444.7 ± 37.6	-15.2 ± 2.0	0.6 ± 0.1
	FBS	516.6 ± 74.3	-7.0 ± 1.0	0.7 ± 0.01
	F12K + 10% FBS	328.6 ± 61.9	-7.3 ± 0.9	0.7 ± 0.2
TiO ₂ NFs	F12K	722.9 ± 44.6	-10.3 ± 1.0	0.8 ± 0.008
	FBS	519 ± 86.8	-6.6 ± 0.8	0.7 ± 0.05
	F12K + 10% FBS	366.9 ± 72.3	-7.6 ± 0.6	0.9 ± 0.02
ITO NPs	F12K	586.1 ± 31.1	-8.3 ± 0.9	0.8 ± 0.3
	FBS	390.5 ± 60.8	-7.3 ± 0.7	0.6 ± 0.1
	F12K + 10% FBS	278.6 ± 31.1	-8.6 ± 1.0	0.6 ± 0.08

7.2 Patrón de la proteína corona sobre la superficie de ENM

El patrón de bandeo de las proteínas adsorbidas sobre la superficie de los ENM fue analizado mediante electroforesis después de 24 horas de incubación considerando como la hard-corona las proteínas unidas a la superficie de los ENM. El patrón de proteínas adsorbidas por las NPs de SiO₂ mostraron un patrón de bandeo entre 200 kDa a 45 kDa. El patrón de bandeo observado de la hard-corona de las NFs de TiO₂ fue encontrado predominantemente entre 80 kDa a 50 kDa. Sin embargo, para las NPs de ITO se observó un leve patrón de bandeo con proteínas de alto peso molecular indetectables (Figura 5). La soft-corona la cual está formada por las proteínas adsorbidas ligeramente a la superficie de los ENM mostraron un patrón de bandeo similar entre NPs de SiO₂ e NPs de ITO entre 70 kDa y 50 kDa mientras que las NFs de TiO₂ mostraron una acumulación de bandas en este mismo rango de peso molecular (Figura 5). Con este ensayo nosotros demostramos que los ENM tienen la capacidad de interactuar con las proteínas del medio, en este caso con proteínas del SFB. Además, estos resultados sugieren que la hard-corona, la cual está formada por proteínas fuertemente unidas a la superficie de los ENM, tiene diferentes capacidades de adsorción para cada ENM mostrando mayor afinidad por las NFs de TiO₂ seguido de las NPs de SiO₂ y las NPs de ITO. Además, se observó una proteína cerca de los 67 kDa la cual podría ser albúmina debido a que es la

más abundante en el SFB (concentración de 2.3 g/mL) detectando una fuerte afinidad por la superficie de las NFs de TiO₂ y NPs de SiO₂ (Cristian et al., 2019).

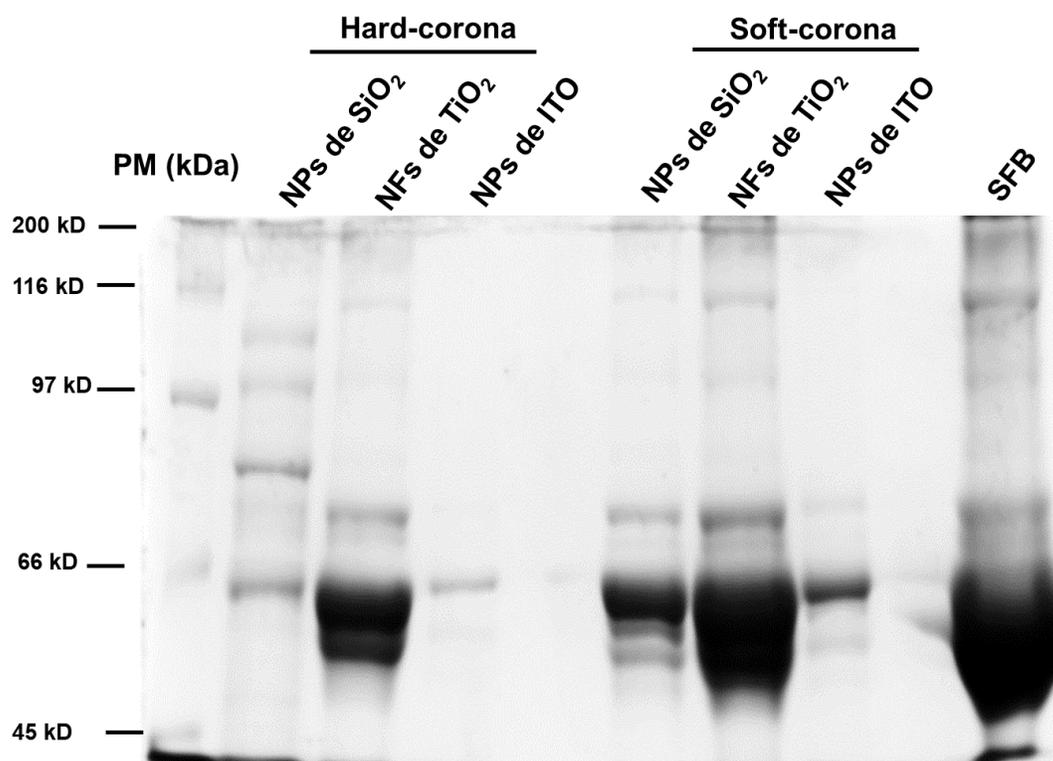


Figura 5. Patrón de proteínas adsorbidas del suero fetal bovino (SFB) sobre los ENM. Imagen representativa del patrón de bandeo de los ENM incubados durante 24 horas con SFB. Seguido de la incubación, los ENM fueron lavados para descartar las proteínas que no estuvieran unidas a su superficie. Posteriormente, la hard y soft-corona fueron separadas mediante centrifugación. Las proteínas colectadas en el sobrenadante son consideradas la soft-corona mientras que las proteínas colectadas en el pellet son consideradas la hard-corona.

7.3 NFs de TiO₂ forma ROS de manera acelular

Para saber si los tres diferentes tipos de ENM forman ROS de manera acelular y si la proteína corona influye en la formación de ROS se realizaron ensayos acelulares con DHCF-HRP como se describe en la sección 6.4. Como control positivo fue utilizado H₂O₂ y como control negativo se utilizó agua destilada. Los resultados mostraron que las NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y NPs de ITO prístinas producen aproximadamente 50% menos ROS en comparación con el H₂O₂ (Figura 6). Sin

embargo, lo más interesante es que las NFs de TiO_2 al ser recubiertas por la proteína corona a las concentraciones de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ produjeron un 89%, 81% y 91% respectivamente en comparación con las NFs de TiO_2 prístinas (Figura 6). Estos resultados sugieren que, si bien los ENM de manera independiente producen ROS, cuando son recubiertos con la proteína corona su capacidad de producir ROS aumenta. Lo anterior nos indica que al momento de que las NFs de TiO_2 entran en contacto con las proteínas del medio en donde se encuentren pueden generar mayor toxicidad generando un aumento de oxidantes en el medio.

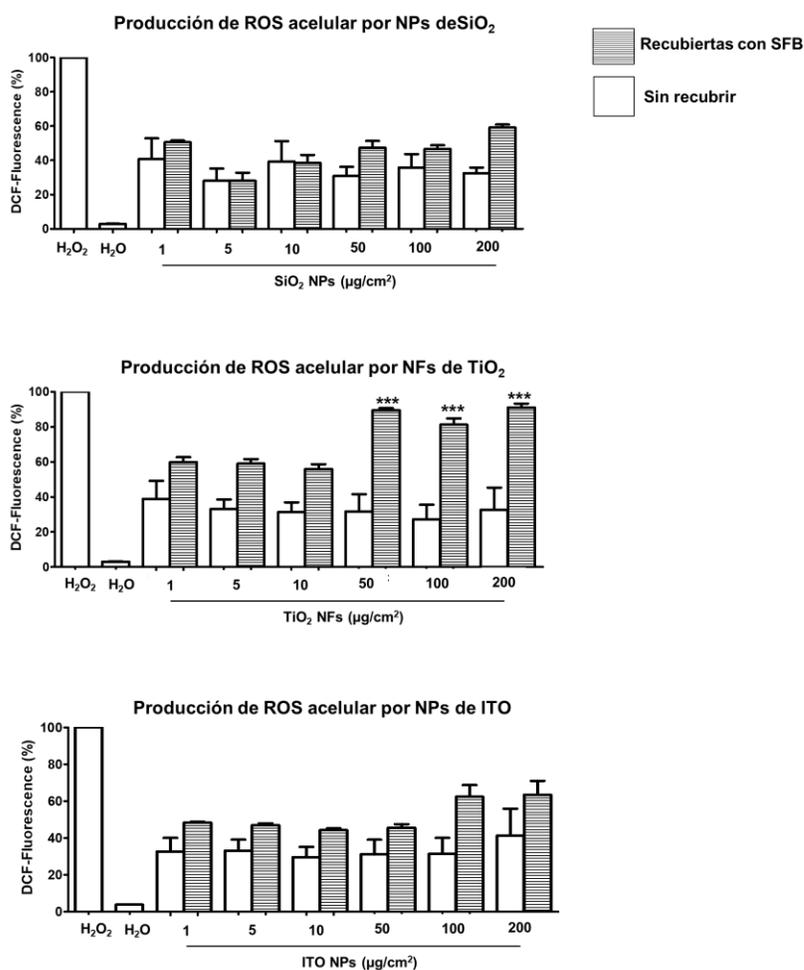


Figura 6. Producción de ROS acelar. Capacidad de formar ROS de forma acelar con NPs prístinas y NPs recubiertas con la proteína corona. NFs de TiO_2 a concentraciones elevadas son las que elevan la producción de ROS en comparación con NPs de SiO_2 e NPs de ITO. Tres experimentos fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar; *** $p < 0.001$ recubiertas con SFB vs sin recubrir.

7.4 ARS tiene la capacidad de unirse a las NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y NPs de ITO

Los ENM fueron conjugados con ARS como se indicó en la sección 6.5 con la finalidad de marcarlos para poder saber su localización dentro de las células. Los resultados mostraron que las NPs de SiO₂ al ser incubadas durante 24 horas con ARS alcanzaron una absorbancia de 0.319 (Figura 7Ai). Sin embargo, cuando las NPs de SiO₂ fueron incubadas previamente con SFB para la formación de la proteína corona y después conjugadas con ARS la absorbancia fue de 0.242 (Figura 7Aii) disminuyendo la unión de NPs de SiO₂ con la ARS en un 24.8% (Figura 7Aiii). Cuando las NPs de SiO₂ fueron incubadas durante 48 horas la absorbancia fue de 0.345 (Figura 7Bi). La absorbancia de las NPs de SiO₂ con la proteína corona previamente formada e incubadas 48 horas con ARS tuvieron una absorbancia de 0.238 (Figura 7Bii) lo que indica que la absorbancia disminuyó en un 29.8%. Para las NFs de TiO₂ incubadas 24 horas con ARS la absorbancia máxima fue de 0.425 (Figura 8Ai). La absorbancia de las NFs de TiO₂ con la proteína corona formada y la incubación con ARS durante 24 horas fue de 0.337 (Figura 8Aii) disminuyendo la interacción NFs de TiO₂ y ARS en un 22.3% (Figura 8Aiii). NFs de TiO₂ incubadas durante 48 horas con ARS tuvieron una absorbancia de 0.408 (Figura 8Bi) y las NFs de TiO₂ con la proteína corona previamente formada tuvieron una absorbancia de 0.335 (Figura 8Bii) disminuyendo en un 21.1% su interacción con la ARS (Figura 8Biii). El mismo comportamiento fue observado cuando las NPs de ITO se incubaron con ARS durante 24 horas ya que su absorbancia fue de 0.331 (Figura 9Ai). Sin embargo, cuando las NPs de ITO fueron incubadas previamente con SFB para la formación de la proteína corona seguidas por 24 horas de incubación con ARS la absorbancia fue de 0.284 (Figura 9Aii) disminuyendo la interacción en un 14.7% (Figura 9Aiii). Finalmente, las NPs de ITO incubadas con ARS durante 48 horas mostraron una absorbancia de 0.320 (Figura 9Bi) y la absorbancia que se obtuvo con las NPs de ITO previamente incubadas con SFB fue de 0.283 (Figura 9Bii) lo cual la interacción de NPs de ITO y ARS disminuyó en un 30.9% (Figura 9Biii). Estos resultados sugieren si bien los tres tipos de ENM utilizados en este estudio pueden ser conjugados con ARS y la formación de la proteína corona en la superficie de los ENM no impide que pierdan la afinidad con la ARS para poder ser conjugadas.

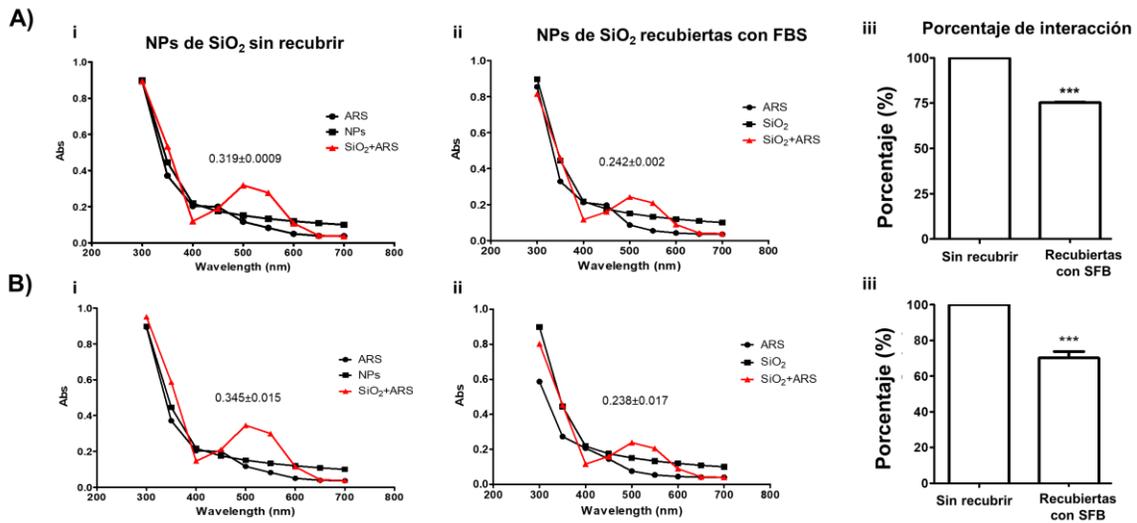


Figura 7. Análisis de espectros UV/Vis de NPs de SiO₂. La interacción de NPs de SiO₂ con ARS fue analizada mediante UV/Vis. NPs de SiO₂ fueron incubadas con ARS durante **A)** 24 horas y **B)** 48 horas. El ensayo se realizó con NPs de SiO₂ sin recubrir y NPs de SiO₂ previamente recubiertas con la proteína corona. Cuatro experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar; ***p<0.001 recubiertas con SFB vs sin recubrir.

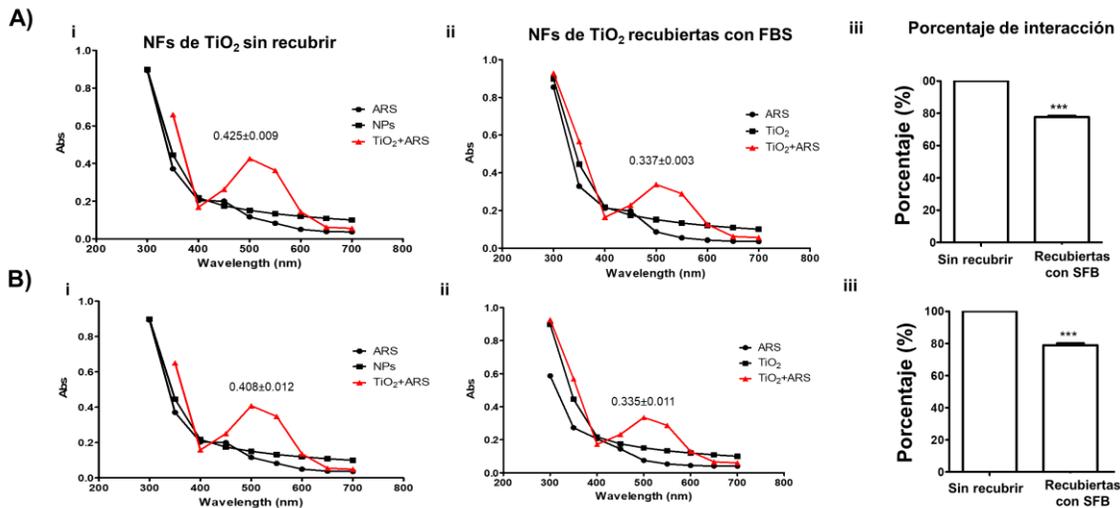


Figura 8. Análisis de espectros UV/Vis de NFs de TiO₂. La interacción de NFs de TiO₂ con ARS fue analizada mediante UV/Vis. NFs de TiO₂ fueron incubadas con ARS durante **A)** 24 horas y **B)** 48 horas. El ensayo se realizó con NFs de TiO₂ sin recubrir y NFs de TiO₂ previamente recubiertas con la proteína corona. Cuatro experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar; ***p<0.001 recubiertas con SFB vs sin recubrir.

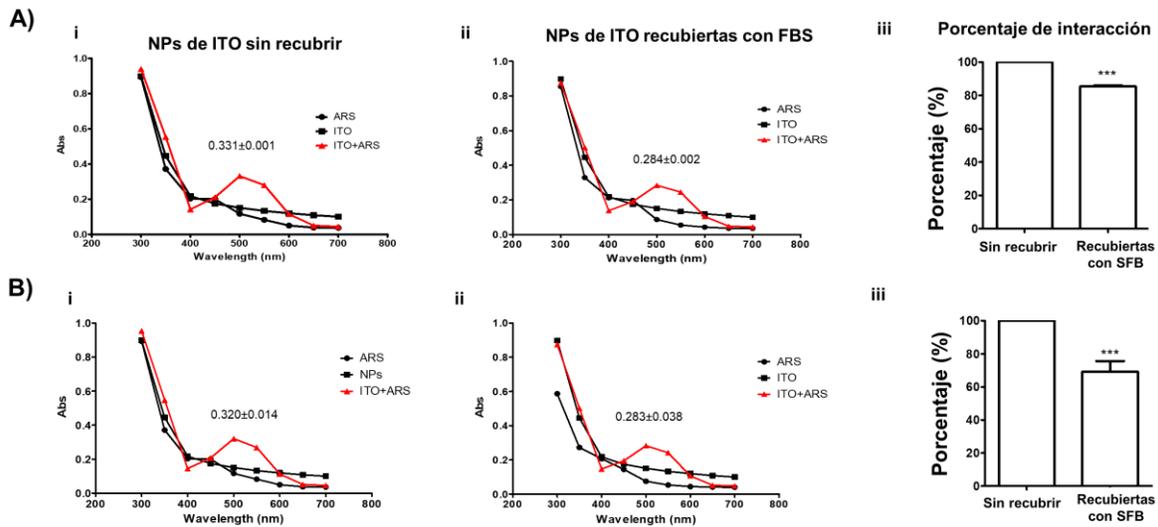
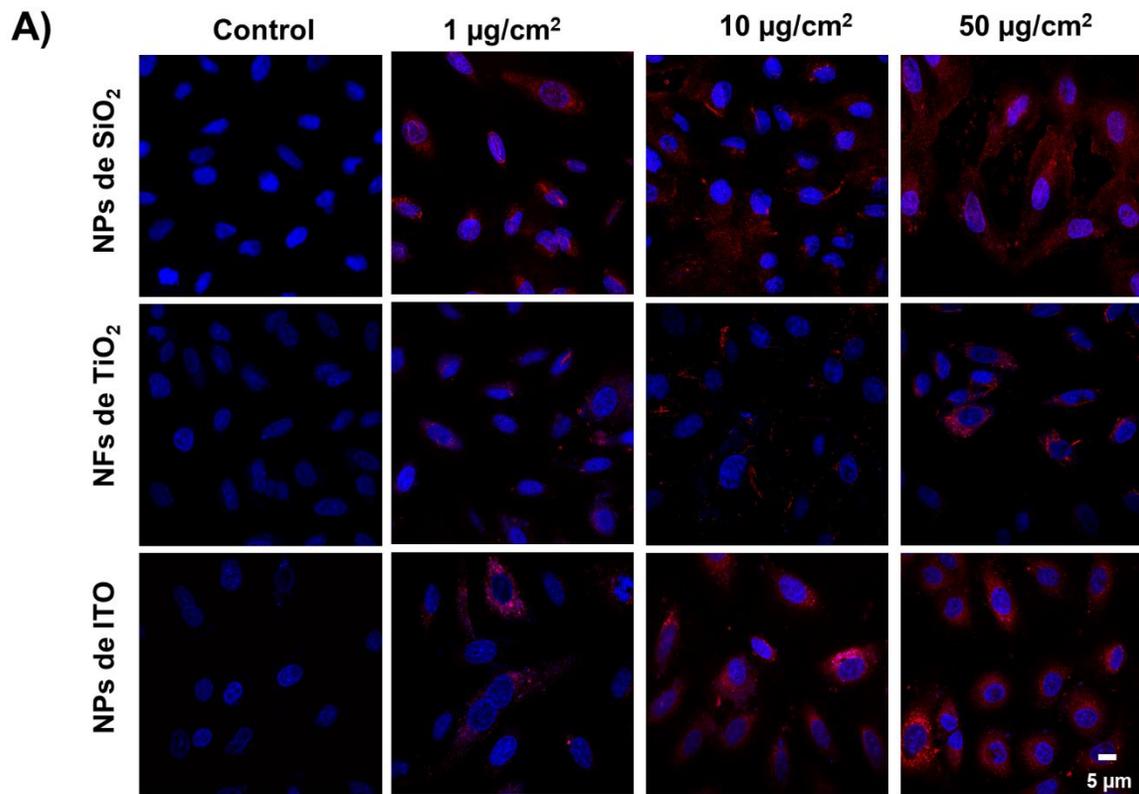


Figura 9. Análisis de espectros UV/Vis de NPs de ITO. La interacción de NPs de ITO con ARS fue analizada mediante UV/Vis. NPs de ITO fueron incubadas con ARS durante **A)** 24 horas y **B)** 48 horas. El ensayo se realizó con NPs de ITO sin recubrir e NPs de ITO previamente recubiertas con la proteína corona. Cuatro experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar; *** $p < 0.001$ recubiertas con SFB vs sin recubrir.

7.5 ENM poseen la capacidad de internalizarse en células epiteliales de cáncer de pulmón

Células epiteliales de pulmón de la línea A549 fueron expuestas a los diferentes ENM a concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas con ENM previamente conjugados con ARS y con ENM recubiertos de la proteína corona y conjugados con ARS con la finalidad de observar si la recubierta de la proteína corona influye en la internalización de los mismos. Los resultados mostraron que las células epiteliales de pulmón expuestas con NPs de SiO_2 a concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas tienen la capacidad de internalizar a las NPs de manera concentración dependiente y fueron localizadas dentro del citoplasma de las células epiteliales de pulmón (Figura 10A). Para las NPs de SiO_2 que fueron previamente recubiertas con la proteína corona las NPs fueron internadas de manera concentración dependiente y localizadas a lo largo del citoplasma (Figura 10B). TiO_2 NFs que solo fueron incubadas con ARS fueron observadas dentro de la célula en el citoplasma (Figura 10A). El mismo fenómeno sucedió para las NFs de TiO_2 que fueron recubiertas previamente con la proteína corona ya que se observaron las NFs de TiO_2 conjugadas con ARS dentro

de las células epiteliales de pulmón (Figura 10B). NPs de ITO conjugadas con ARS fueron localizadas alrededor del núcleo (Figura 10A). Sin embargo, las NPs de ITO que fueron previamente incubadas con SFB para la formación de la proteína corona también fueron internadas por las células epiteliales de pulmón, pero su localización fue a lo largo del citoplasma para las concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ con excepción de la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ que se observaron de manera perinuclear (Figura 10B).



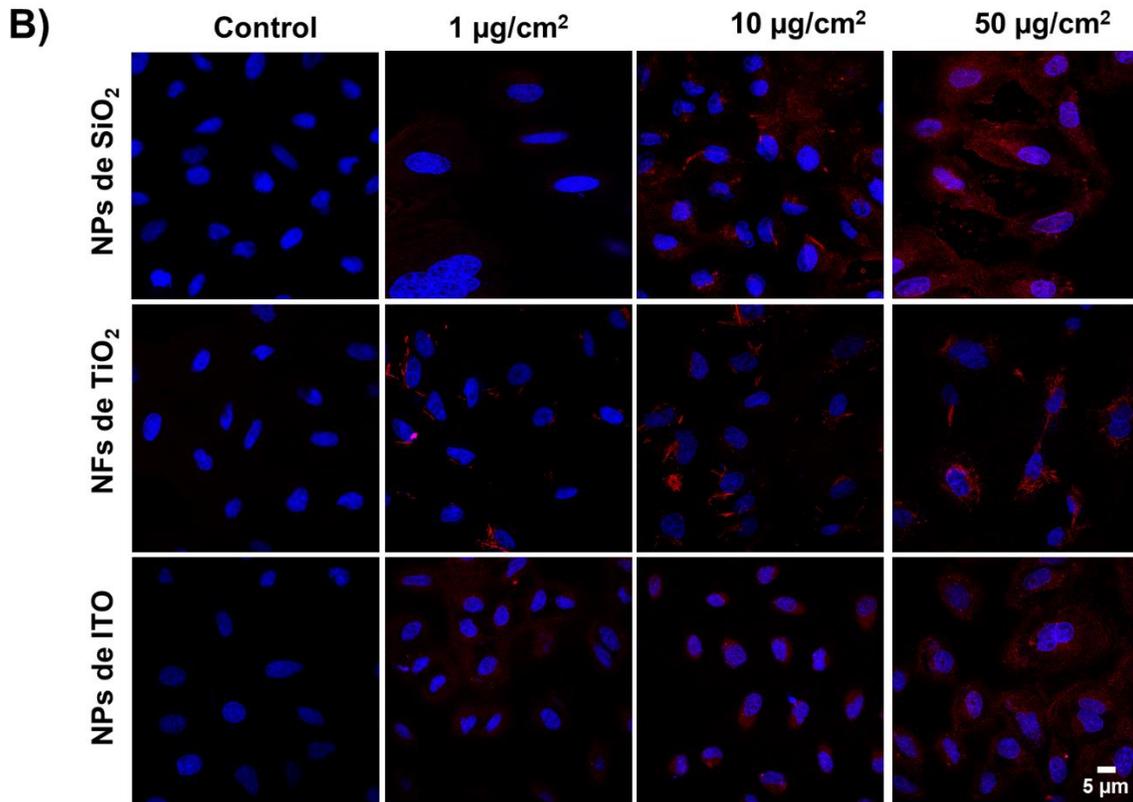


Figura 10. Internalización de ENM en células epiteliales de pulmón. Imágenes representativas de células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes ENM a concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas. **A)** Células epiteliales de pulmón expuestas a ENM sin recubrir y **B)** recubiertas con la proteína corona. El núcleo de las células fue teñido con Hoechst el cuál se muestra en color azul y de color rojo se muestran los ENM conjugados con ARS. Tres experimentos independientes fueron realizados.

7.6 NPs de SiO_2 y NFs de TiO_2 afectan la viabilidad celular

Para conocer si la formación de la proteína corona influye en la viabilidad de las células epiteliales de pulmón expuesta a los diferentes tipos de ENM y se realizaron ensayos de reducción de MTT como se describe en la sección 6.7. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a los diferentes ENM a diferentes concentraciones sin la formación de la proteína corona y con la formación de la proteína corona. Las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a NPs de SiO_2 prístinas tuvieron un incremento en la reducción del MTT con las concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en un 18.02%, 25.5% y 52.8% respectivamente (Figura 11A). Sin embargo, cuando las NPs de SiO_2 fueron

recubiertas previamente con la proteína corona la reducción del MTT disminuyó con las concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en un 31.4%, 21.8% y 40.9% respectivamente. La reacción de óxido reducción a través de ensayos de MTT empleando células epiteliales de pulmón expuestas a NFs de TiO_2 prístinas disminuyó con las concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en un 47.6%, 45.6%, 53.3% y 53.9% respectivamente (Figura 11B). Sin embargo, cuando las células fueron expuestas a NFs de TiO_2 con la formación de la proteína corona no se observaron cambios en la reducción del MTT (Figura 11B). Finalmente, las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a NPs de ITO prístinas y con la formación de la proteína corona no se encontraron cambios en la reducción del MTT en comparación con las células control (Figura 11C). Estos resultados sugieren que la formación de la proteína corona posee diferentes comportamientos dependiendo el tipo de ENM como la producción de ROS y la conjugación de ARS, procesos que pueden influir o no en la viabilidad de las células epiteliales de pulmón.

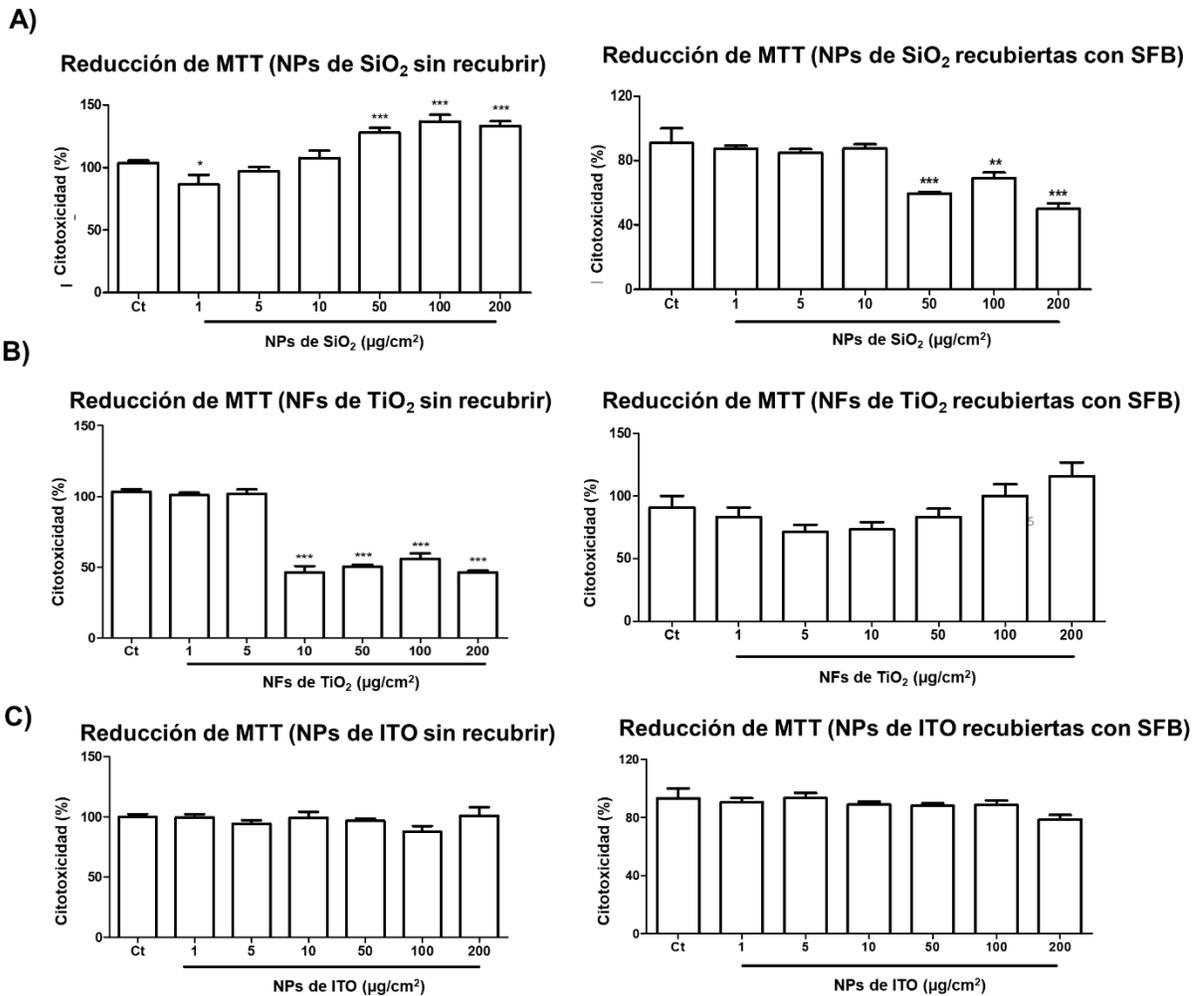


Figura 11. Viabilidad de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a ENM sin recubrir y recubiertas con la proteína corona a diferentes concentraciones. **A)** NPs de SiO₂, **B)** NFs de TiO₂ y **C)** NPs de ITO. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media ± error estándar; *p<0.1; **p<0.05; ***p<0.001 vs control.

8. Discusión

El uso de los ENM ha incrementado de manera exponencial en la última década aplicando esta novedosa tecnología en diferentes productos para obtener mejores resultados y más beneficios. El incremento de la producción de los ENM ha generado ganancias millonarias a las industrias a nivel mundial debido a que la producción de estas es a un bajo costo. Es por esto por lo que se han investigado exhaustivamente, por parte de la industria y de las academias, la aplicación de nuevas formas de ENM. De acuerdo con diferentes bases de datos como Nanowerk y The Nanodatabase se tienen registradas 148 compañías responsables de sintetizar diferentes tipos de ENM alrededor del mundo (<https://www.nanowerk.com/>) y se han registrado 3050 productos de uso común que contienen ENM de diferentes materiales (<http://nanodb.dk/en/>). Estos datos nos ayudan a imaginar la gran cantidad de personas que se encuentran expuestas a los diferentes tipos de ENM que existen actualmente. Sin embargo, los principales afectados por exposición a ENM son los trabajadores que se encuentran, sintetizando, empacando y/o transportando los ENM ya que se encuentran expuestos por largas jornadas laborales. Además, los efectos tóxicos que los ENM pueden ocasionar a la salud humana ha comenzado a estudiarse pocos años atrás por lo que aún no se tienen respuestas concretas. Poco se sabe sobre los efectos tóxicos que los ENM desencadenan, tampoco se tienen bien establecidos los mecanismos de acción una vez internados los ENM en las células. Por otro lado, la aplicación de nuevas formas de ENM han representado un reto en la investigación sobre su toxicología debido a que pueden tener nuevas o diferentes implicaciones en la salud humana comparadas con los ENM convencionales (Som et al., 2013).

Existen estudios que han demostrado que los ENM al momento de tener contacto con los fluidos biológicos son inmediatamente recubiertos por una gran cantidad de biomoléculas fenómeno al cual se le ha llamado proteína corona (Pareek et al., 2018). Además, la formación de la proteína corona depende de las propiedades fisicoquímicas de los ENM como su carga superficial y morfología (Monopoli et al., 2011). Por lo anterior, es importante conocer de primera estancia las propiedades

fisicoquímicas de los ENM para poder predecir los efectos que puedan ocasionar en la salud humana el cual es uno de los principales objetivos de la nanotoxicología.

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (por sus siglas en inglés, OECD) encargada de establecer políticas económicas y sociales indica que para poder obtener información relevante sobre los efectos tóxicos de los ENM es necesario considerar diferentes parámetros entre ellos la morfología, el tamaño primario, el tamaño hidrodinámico y el potencial zeta (OECD, 2019). Por lo anterior, en este trabajo de investigación nos adherimos a las políticas establecidas por la OECD para generar información confiable que pueda ser considerada en futuros trabajos de investigación.

En esta primera parte del trabajo de investigación el objetivo fue determinar las propiedades fisicoquímicas de tres diferentes tipos de ENM como NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y NPs de ITO de manera acelular y evaluar el impacto que tiene la formación de la proteína corona en los efectos tóxicos que puedan desencadenar.

De acuerdo con lo establecido por la OECD para estudios nanotoxicológicos se analizaron diferentes parámetros fisicoquímicos de los ENM como su morfología, el tamaño primario, tamaño hidrodinámico y potencial zeta.

Se observó que cuando los tres tipos de ENM fueron resuspendidos en SFB, medio de cultivo F12k y F12k suplementado con 10% de SFB, de manera independiente, el tamaño hidrodinámico de las NFs de TiO₂ fue mayor, seguido por las NPs de SiO₂ y NPs de ITO resultados que se muestran en la tabla 1. Por otro lado, el potencial zeta de los ENM fue analizado y los valores obtenidos cayeron en el rango de -6.6 mV y -15.2 Mv para los distintos ENM. Los ENM en el rango de -10 mV y +10 mV son considerados ENM neutrales. Los ENM que tienen una mayor toxicidad tienen un potencial zeta mayor a +30 mV y son consideradas fuertemente catiónicos y las ENM con un potencial zeta menor a -30 mV son consideradas fuertemente aniónicos (Clogston and Patri, 2011). Por lo anterior, estos resultados sugieren que los ENM utilizados en este estudio se pueden considerar neutros al menos en los medios de resuspensión aquí utilizados.

Además, se observó que la hard-corona, la cual está formada por las proteínas que se encuentran fuertemente unidas a la superficie de los ENM, tuvo diferentes capacidades de adsorción siendo la más fuerte para las NFs de TiO₂ seguido de las NPs de SiO₂ y NPs de ITO. La alta adsorción de proteínas es atribuida a la interacción entre las proteínas del medio y las cargas electrostáticas de la superficie de los ENM (Partikel et al., 2019). De acuerdo con la electroforesis realizada, las proteínas del medio tuvieron mayor afinidad con las NFs de TiO₂ en comparación con las NPs de SiO₂ y NPs de ITO debido a la gran cantidad de proteínas encontradas en la hard-corona. La baja adsorción de las proteínas sobre las NPs de ITO puede explicarse parcialmente por la baja interacción entre las proteínas del SFB y la superficie de las NPs de ITO. Además, las interacciones electrostáticas son determinantes para la formación de la proteína corona sin importar su tamaño, pero también la baja adsorción sobre la superficie de las NPs de ITO se puede explicar por una baja estabilidad de la hard-corona debido a que la interacción con la superficie de las NPs de ITO puede inducir alteraciones en las estructuras secundarias de las proteínas (Marichal et al., 2020).

Uno de los efectos mayormente estudiados sobre la toxicología de los ENM es la formación de ROS de manera *in vitro*. Sin embargo, existen pocos estudios en donde se describe de manera intrínseca la formación de ROS y si la formación de la proteína corona afecta dicha producción.

Por lo anterior, se realizaron ensayos de detección de ROS mediante la oxidación del complejo DCFH-HRP. Los resultados indicaron que los ENM tienen la capacidad de formar ROS de manera intrínseca siendo las NFs de TiO₂ las que produjeron mayor cantidad de ROS. Estos resultados concuerdan con estudios previos en donde demuestran que NPs de TiO₂ tiene la capacidad de formar ROS de manera acelular en donde se concluye que dicho fenómeno está relacionado con el tamaño de las NPs que son de aproximadamente 30 nm (Almquist & Biswas, 2002). Además, existe evidencia en donde demuestran que la producción de ROS de manera acelular de NPs de paladio y níquel depende de su tamaño primario y el área superficial de las NPs (Neubauer et al., 2015). Por otra parte, cuando las NFs de TiO₂ fueron recubiertas por la proteína corona la formación de ROS aumentó en

las concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La habilidad que tienen los ENM de formar ROS de manera intrínseca es uno de los mecanismos que se han considerado importantes en los efectos tóxicos en líneas celulares. Sin embargo, se ha propuesto que el recubrimiento de nanopartículas ya sea con polímeros como el polietilenglicol o con proteínas se puede inhibir la formación de ROS (Escamilla-Rivera et al., 2016; Žūkienė and Snitka, 2015). En este estudio nosotros encontramos un incremento de ROS solo con las NFs de TiO_2 a tres elevadas concentraciones por lo que no podemos asegurar que la formación de la proteína corona conduzca a un decremento en la formación de ROS al menos para NPs de SiO_2 , NFs de TiO_2 y NPs de ITO.

Por otro lado, los ENM fueron conjugados con ARS la cual es una sal sódica soluble en agua que tiene capacidad de unirse a los iones metálicos además de ser fluorescente (Sangsefedi et al., 2018). Cabe señalar que el uso de ARS solo ha sido utilizado en NPs de TiO_2 debido a que ARS tienen la capacidad de formar uniones covalentes con el TiO_2 (Thurn et al., 2009). En esta investigación se demostró que esta misma afinidad se obtuvo con las NPs de SiO_2 y NPs de ITO. Sin embargo, esta afinidad no es la misma para otros óxidos metálicos como el dióxido de estaño debido a que en nuestro equipo de trabajo se ha estudiado dichas interacciones y hemos encontrado que la ARS no tiene la capacidad de unirse al dióxido de estaño.

Los ENM fueron conjugados con ARS a los cuales previamente les fue formada la proteína corona mediante incubación con SFB con la finalidad de elucidar si la proteína corona influye con la interacción de los ENM y otros componentes con los cuales son afines como el caso de la ARS. Los tres diferentes tipos de ENM fueron incubados con ARS durante 24 y 48 horas y analizados mediante espectrofotometrías UV/Vis. Los resultados mostraron que 24 horas de incubación fueron suficientes para que la ARS se uniera a los diferentes tipos de ENM recubiertos con la proteína corona y prístinos. Además, se observó que la proteína corona no impidió que los ENM interactuaran con la ARS debido a que en las espectrofotometrías se obtuvieron resultados similares en comparación con los ENM prístinos. Estos resultados sugieren que las propiedades intrínsecas de los ENM aún recubiertos con la proteína corona no se pierden ya que aún recubiertos

tienen la capacidad de formar ROS y de interaccionar con otros componentes como ARS. Sin embargo, existen estudios en donde se demuestra y proponen que las NPs de TiO_2 sean recubiertas con proteínas para disminuir su capacidad fotocatalítica, la cual es la formación de ROS por la absorción de luz UV, y así prevenir daños a biomoléculas (Garvas et al., 2015). Además, también se ha propuesto la formación de la proteína corona para nanopartículas poliméricas acarreadoras de fármacos para disminuir su toxicidad y prolongar el tiempo en torrente sanguíneo (Peng et al., 2013). Los resultados aquí obtenidos mostraron lo contrario por lo que se considera que la formación de proteína corona no tiene un efecto protector al menos con los ENM utilizados en este estudio.

Por otro lado, mediante microscopía confocal se estudió la captación de los ENM en células epiteliales de pulmón por medio de la conjugación con ARS. Se ha demostrado que la captación de las NPs de TiO_2 conjugadas con ARS se puede analizar mediante microscopía confocal y citometría de flujo (Thurn et al., 2011). Los resultados obtenidos demostraron que los tres tipos de ENM recubiertos con y sin la proteína corona fueron internalizados por las células epiteliales de pulmón ya que fueron localizadas a lo largo del citoplasma de las células. en el caso de las NPs de SiO_2 y las NPs de ITO y de manera perinuclear en el caso de las NFs de TiO_2 . Se sabe que los ENM pueden ser captados dentro de las células mediante diferentes procesos siendo la endocitosis el principal mecanismo de captación. La endocitosis es un proceso celular esencial que conduce a la internalización de fluidos del medio extracelular, la captación de nutrientes y el reciclado de componentes de la membrana celular entre otras funciones (Shivas et al., 2010).

La captación de los tres tipos de ENM utilizados en este estudio pudo deberse a la interacción de proteínas unidas en la superficie de los ENM favoreciendo dicho proceso. Se ha demostrado que la internalización de NPs de oro, con tamaños de 20 a 50 nm, recubiertas con la proteína corona favorece su captación en comparación con NPs no recubiertas en células MCF-7 debido a la presencia de numerosos receptores que se encuentran en las membranas de las células los cuales son afines a las proteínas adsorbidas en la superficie de las NPs de oro

(Kruszewska et al., 2019). Este mismo fenómeno puede estar sucediendo con los ENM utilizados en este estudio.

Debido a que se observó que los ENM son capaces de entrar al citoplasma de las células epiteliales de pulmón, se decidió evaluar si la viabilidad de las células disminuía al ser expuestas a dichos ENM por lo que se realizaron ensayos de reducción de MTT. Los resultados mostraron que la exposición a NFs de TiO₂ causó mayor toxicidad en comparación con las NPs de SiO₂ y las NPs de ITO cuando no son recubiertas con la proteína corona.

Sin embargo, cuando los ENM fueron recubiertos con la proteína corona los efectos fueron mayores con NPs de SiO₂ en comparación con NFs de TiO₂ y NPs de ITO. Estos resultados son similares con estudios previos que han demostrado que NPs de SiO₂ no induce cambios en la viabilidad celular (Voicu et al., 2019). Se mostró también mayor citotoxicidad con las NFs de TiO₂ efecto que ha sido reportado indicando que las formas fibrosas tienen mayor capacidad de generar citotoxicidad en comparación con NPs amorfas (Hamilton et al., 2009; Medina-Reyes et al., 2015). Sin embargo, cuando NPs de SiO₂ y NFs de TiO₂ son recubiertas con la proteína corona los efectos son contrarios probablemente debido a la composición de la proteína corona lo cual es aún difícil de predecir (Ruiz et al., 2019). Por otro lado, en nuestro estudio las NPs de ITO no generaron cambios en la viabilidad mediante el método de reducción de MTT.

Sin embargo, se ha reportado citotoxicidad de NPs de ITO por WST-1, método similar al MTT, en células epiteliales de pulmón (Tabei et al., 2016) mientras que no se ha reportado citotoxicidad en macrófagos de la línea NR8383 (Lison et al., 2009) lo cual remarca que la citotoxicidad causada por ENM depende parcialmente del tipo celular en el cual son internalizados.

9. Conclusiones

- Las propiedades fisicoquímicas de los ENM como el tamaño hidrodinámico, el potencial zeta, y el índice de polidispersión tienen un comportamiento similar siendo diferentes los ENM únicamente en su composición y morfología. Sin embargo, la capacidad de interaccionar con los componentes del medio para formar la proteína corona es mayor para las NFs de TiO_2 seguido de las NPs de SiO_2 y las NPs de ITO efecto que puede deberse al tamaño y la morfología de cada ENM ya que el TiO_2 se encuentra en forma de fibras a diferencia de SiO_2 e ITO que son amorfos.
- Las dos propiedades intrínsecas analizadas, es decir, la producción de ROS y la conjugación con ARS, no se afectaron con la formación de la proteína corona inducida por la incubación con SFB para ninguno de los tres tipos de ENM.
- La internalización de los tres diferentes ENM no se vio afectada por la conjugación con ARS lo que nos indica que aun modificando la superficie de los ENM aún pueden ser internalizados por las células epiteliales de cáncer de pulmón sin afectar su viabilidad al menos las utilizadas en este estudio.

10. Referencias

- Almquist CB, Biswas P. Role of synthesis method and particle size of nanostructured TiO₂ on its photoactivity. *J Catal.* 2002; 212:145-56.
- Bensimon-Brito A, Cardeira J, Dionísio G, Huysseune A, Cancela ML, Witten PE. Revisiting in vivo staining with alizarin red S--a valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Dev Bi.* 2016; 16, 2.
- Chan CKW, Zhang L, Cheng CK, et al. Recent Advances in Managing Atherosclerosis via Nanomedicine. *Small.* 2018;14(4): 10.1002/smll.201702793
- Chen X, Mao SS. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem Rev.* 2007;107(7):2891-959.
- Clift MJ, Bhattacharjee S, Brown DM, Stone V. The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2010 Oct 20;198:358-65.
- Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol.* 2011;697:63-70.
- Cristian RE, Mohammad IJ, Mernea M, Sbarcea BG, Trica B, Stan MS, Dinischiotu A. Analyzing the Interaction between Two Different Types of Nanoparticles and Serum Albumin. *Materials (Basel).* 2019;12(19).
- Cummings KJ, Virji MA, Park JY, Stanton ML, Edwards NT, Trapnell BC, et al. Respirable indium exposures, plasma indium, and respiratory health among indium-tin oxide (ITO) workers. *Am J Ind Med.* 2016;59(7):522–31.
- Escamilla-Rivera V, Uribe-Ramírez M, González-Pozos S, Lozano O, Lucas S, De Vizcaya-Ruiz A. Protein corona acts as a protective shield against Fe₃O₄-PEG inflammation and ROS-induced toxicity in human macrophages. *Toxicol Lett.* 2016; 240:172-84.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency), State of science literature review: nano titanium dioxide environmental matters. 2010. EPA/600/R-10/089
- 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.
- Garvas M, Testen A, Umek P, Gloter A, Koklic T, Strancar J. Protein Corona Prevents TiO₂ Phototoxicity. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129577.
- 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.

- IARC. Silica, some silicate, coal dust and para-aramid fibrils. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1997; 68: 1-475.
- IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: carbon black, titanium dioxide, and talc. 2010. Vol. 93. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
- Janßen HC, Angrisani N, Kalies S, Hansmann F, Kietzmann M, Warwas D P, Behrens P, Reifenrath J. Biodistribution, biocompatibility and targeted accumulation of magnetic nanoporous silica nanoparticles as drug carrier in orthopedics. *Journal of nanobiotechnology*. 2020; 18(1), 14.
- Jayaram DT, Runa S, Kemp ML, Payne CK. Nanoparticle-induced oxidation of corona proteins initiates an oxidative stress response in cells. *Nanoscale*. 2017;9(22):7595-7601.
- Kruszewska J, Kur A, Kulpińska D, Grabowska-Jadach I, Matczuk M, Keppler BK, Timerbaev AR, Jarosz M. An improved protocol for ICP-MS-based assessment of the cellular uptake of metal-based nanoparticles. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;174:300-304.
- Li B, Lai C, Zeng G, et al. Black Phosphorus, a Rising Star 2D Nanomaterial in the Post-Graphene Era: Synthesis, Properties, Modifications, and Photocatalysis Applications. *Small*. 2019;15(8). In press.
- Lison D, Laloy J, Corazzari I, et al. Sintered indium-tin-oxide (ITO) particles: a new pneumotoxic entity. *Toxicol Sci*. 2009;108(2):472-481.
- Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggård T, Flanagan MB, Lynch I, Elia G, Dawson K. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*. 2011;5(9):7503-9.
- Marichal L, Klein G, Armengaud J, Boulard Y, Chédin S, Labarre J, Pin S, Renault JP, Aude JC. Protein Corona Composition of Silica Nanoparticles in Complex Media: Nanoparticle Size does not Matter. *Nanomaterials (Basel)*. 2020. 29;10(2). pii: E240.
- McCabe-Lankford EE, Brown TL, Levi-Polyachenko NH. Assessing fluorescence detection and effective photothermal therapy of near-infrared polymer nanoparticles using alginate tissue phantoms. *Lasers Surg Med*. 2018; 50 (10), 1040-1049.
- Medina-Reyes EI, Déciga-Alcaraz A, Freyre-Fonseca V, et al. 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.

- Mekuria SL, Addisu KD, Chou HY, Hailemeskel BZ, Tsai HC. Potential fluorescence and magnetic resonance imaging modality using mixed lanthanide oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018; 167, 54-62.
- Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, Dawson KA. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2011; 133(8):2525-34.
- Neubauer N., Palomaeki J., Karisola P., Alenius H., Gerhard Kasper. Size-dependent ROS production by palladium and nickel nanoparticles in cellular and acellular environments - An indication for the catalytic nature of their interactions. *Nanotoxicology*. 2015;9(8):1059-66.
- Nguyen VH, Lee BJ. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3137-3151.
- NTP. Report on Carcinogens, Eleven Edition. Silica, Crystalline (Respirable Size). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. 2005.
- NTP. Chemical information profile for indium tin oxide [CAS No. 50926-11-9]. Research Triangle Park (NC), USA: National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, United States Department of Health and Human Services. 2009.
- OECD. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 90. Physical-chemical decision framework to inform decisions for risk assessment of manufactured nanomaterials Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France. 2019. Available from:[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2019\)12&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2019)12&doclanguage=en)
- Palacios-Hernandez T, Diaz-Diestra DM, Nguyen AK, Skoog SA., Vijaya Chikkaveeraiah B, Tang X, Wu Y, Petrochenko PE, Sussman EM, Goering PL. Cytotoxicity, cellular uptake and apoptotic responses in human coronary artery endothelial cells exposed to ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Appl Toxicol*. 2020. In press.
- Pareek V, Bhargava A, Bhanot V, Gupta R, Jain N, Panwar J. Formation and Characterization of Protein Corona Around Nanoparticles: A Review. *J Nanosci Nanotechnol*. 2018;18(10):6653-6670.
- Partikel K, Korte R, Mulac D, Humpf HU, Langer K. Serum type and concentration both affect the protein-corona composition of PLGA nanoparticles. *Beilstein J Nanotechnol*. 2019. 6;10:1002-1015.
- Peng Q, Zhang S, Yang Q, Zhang T, Wei XQ, Jiang L, Zhang CL, Chen QM, Zhang ZR, Lin YF. Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system. *Biomaterials*. 2013;34(33):8521-30.

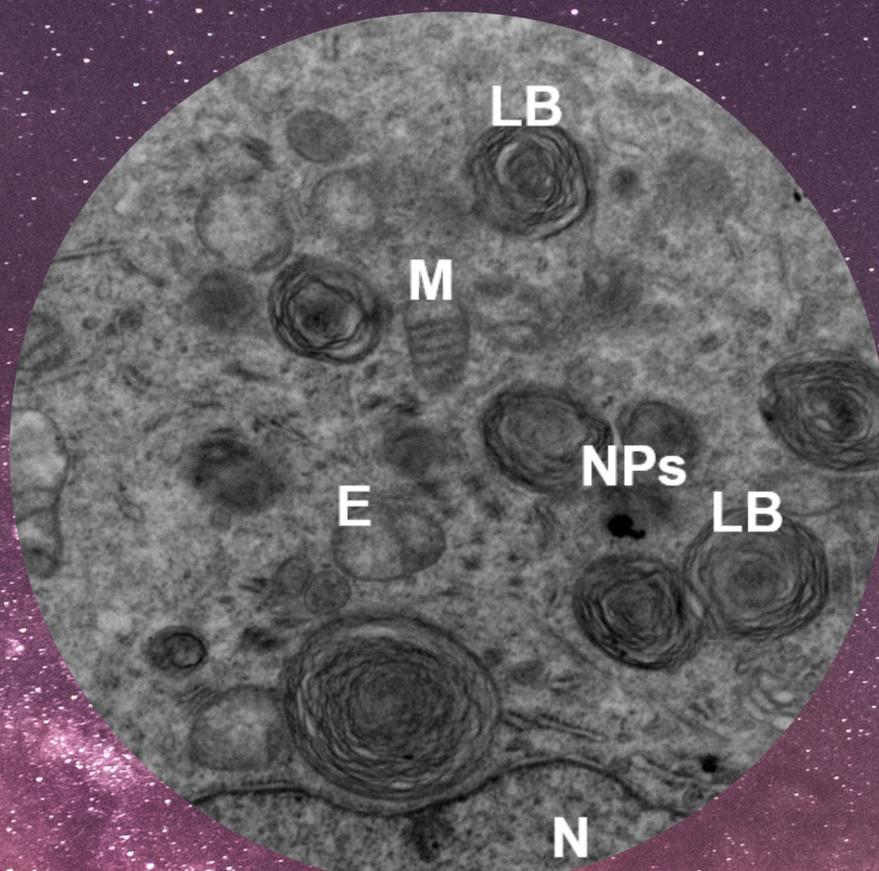
- Ruiz A, Alpizar A, Beola L, Rubio C, Gavilán H, Marciello M5, Rodríguez-Ramiro I, Ciordia S, Morris CJ, Morales MDP. Understanding the Influence of a Bifunctional Polyethylene Glycol Derivative in Protein Corona Formation around Iron Oxide Nanoparticles. *Materials (Basel)*. 2019;12(14).
- Runa S, Lakadamyali M, Kemp ML, Payne CK. TiO₂ Nanoparticle-Induced Oxidation of the Plasma Membrane: Importance of the Protein Corona. *J Phys Chem B*. 2017;121(37):8619-8625.
- Sangsefedi SA, Sharifi S, Rezaion HRM, Azarpour A. Fluorescence and Nonlinear Optical Properties of Alizarin Red S in Solvents and Droplet. *J Fluoresc*. 2018;28(3):815-825.
- Shafiq M, Anjum S, Hano C, Anjum I, Abbasi BH. An Overview of the Applications of Nanomaterials and Nanodevices in the Food Industry. *Foods*. 2020;9(2). pii: E148.
- Shaw SY, Westly EC, Pittet MJ, Subramanian A, Schreiber SL, Weissleder R. Perturbational profiling of nanomaterial biologic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7387–7392.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*. 2013 Apr 15;10:15.
- Shinto H, Fukasawa T, Yoshisue K, Tsukamoto N, Aso S, Hirohashi Y, Seto H. Effect of interfacial serum proteins on the cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, malignant melanocytes, and macrophages. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;181:270-277.
- Shivas JM, Morrison HA, Bilder D, Skop AR. Polarity and endocytosis: reciprocal regulation. *Trends Cell Biol*. 2010;20(8):445-52.
- Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol*. 2011;45(4):227-47.
- Solomon HM, Murzyn S, Rendemonti J, Chapman S, Skedzielewski T, Jucker BM, Stanislaus D, Alsaid H. The use of micro-CT imaging to examine and illustrate fetal skeletal abnormalities in Dutch Belted rabbits and to prove concordance with Alizarin Red stained skeletal examination. *Birth Defects Res*. 2018; 110(3), 276-298.
- Som C, Nowack B, Krug HF, Wick P. Toward the development of decision supporting tools that can be used for safe production and use of nanomaterials. *Acc Chem Res*. 2013;46(3):863-872.
- Sreeramulu G, Singh NK. Destaining of Coomassie Brilliant Blue R-250-stained polyacrylamide gels with sodium chloride solutions. *Electrophoresis*. 1995 Mar;16(3):362-5.

- Srijampa S, Buddhisa S, Ngernpimai S, Leelayuwat C, Prongvitaya S, Chompoosor A, Tippayawat P. Influence of Gold Nanoparticles with Different Surface Charges on Localization and Monocyte Behavior. *Bioconjug Chem.* 2020. In press.
- Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 1968; 26, 62e69.
- Tabei Y, Sonoda A, Nakajima Y, Biju V, Makita Y, Yoshida Y, Horie M. Intracellular accumulation of indium ions released from nanoparticles induces oxidative stress, proinflammatory response and DNA damage. *J Biochem.* 2016;159(2):225-37.
- Tabei Y, Sonoda A, Nakajima Y, Biju V, Makita Y, Yoshida Y, Horie M, Tedja R, Lim M, Amal R, Marquis C. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS Nano.* 2012;6:4083-93.
- Thurn KT, Arora H, Paunesku T, Wu A, Brown EM, Doty C, Kremer J, Woloschak G. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine.* 2011 Apr;7(2):123-30.
- Thurn KT, Paunesku T, Wu A, Brown EM, Lai B, Vogt S, Maser J, Aslam M, Dravid V, Bergan R, Woloschak GE. Labeling TiO₂ nanoparticles with dyes for optical fluorescence microscopy and determination of TiO₂-DNA nanoconjugate stability. *Small.* 2009;5(11):1318-25.
- USGS (2016). Indium. Mineral commodity summaries. Washington (DC), USA: United States Geological Survey.
- Venkatachari P, Hopke PK, Grover BD, Eatough DJ. Measurement of particle-bound reactive oxygen species in Rubidoux aerosols. *J Atmos Chem.* 2005;50:49-58.
- Voicu SN, Balas M, Stan MS, et al. Amorphous Silica Nanoparticles Obtained by Laser Ablation Induce Inflammatory Response in Human Lung Fibroblasts. *Materials (Basel).* 2019;12(7):1026.
- Wang F, Yu L, Monopoli MP, Sandin P, Mahon E, Salvati A, Dawson KA. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine.* 2013; 9:1159-68.
- Wang L, Yan L, Liu J, Chen C, & Zhao Y. Quantification of Nanomaterial/Nanomedicine Trafficking in Vivo. *Analytical chemistry.* 2018 90(1), 589-614.
- Wang X, Li J, Li Q, Chen B, Song G, Zhang W, Shi L, Zou B, Liu R. Yellow-light generation and engineering in zinc-doped cadmium sulfide nanobelts with low-threshold two-photon excitation. *Nanotechnology.* 2014; 25(32):325702.

- Wong XY, Sena-Torralba A, Alvarez-Diduk R, Muthoosamy K, Merkoçi A. Nanomaterials for Nanotheranostics: Tuning Their Properties According to Disease Needs. ACS Nano. 2020. In press.
- Yamauchi H, Ishikawa T, Kondo S. Surface characterization of ultramicro spherical particles of silica prepared by w/o microemulsion method. Int. Symp. Adsorpt. 1989; 37, 71e80.
- Yang SA, Choi S, Jeon SM, Yu J. Silica nanoparticle stability in biological media revisited. Sci Rep. 2018;8(1):185.
- Zhao L, Lu L, Wang A, Zhang H, Huang M, Wu H, Xing B, Wang Z, Ji R. Nano-Biotechnology in Agriculture: Use of Nanomaterials to Promote Plant Growth and Stress Tolerance. J Agric Food Chem. 2020. In press.
- Žūkienė R, Snitka V. Zinc oxide nanoparticle and bovine serum albumin interaction and nanoparticles influence on cytotoxicity in vitro. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015; 135:316-23.

CAPÍTULO 2

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS INDUCIDOS POR LA EXPOSICIÓN A ENM EN CELULAS EPITELIALES DE PULMÓN



Ultraestructura de célula epitelial de pulmón expuesta a dióxido de titanio (Déciga-Alcaraz et al., 2020).

“La cosa más hermosa que podemos experimentar es el misterio. Es la fuente de toda arte y toda ciencia.”

— Albert Einstein

Índice de figuras

Figura 1. Acumulación de ENM en sistema respiratorio.

Figura 2. Tipos de endocitosis de los ENM.

Figura 3. Esquema representativo de la migración celular.

Figura 4. Ciclo celular.

Figura 5. Caracterización de ENM.

Figura 6. Viabilidad de células epiteliales de pulmón.

Figura 7. Tamaño y granularidad de células epiteliales de pulmón.

Figura 8. Desorganización del citoesqueleto de actina inducido por ENM.

Figura 9. Alteraciones en la distribución del ciclo celular de células epiteliales de pulmón expuestas a ENM.

Figura 10. Migración de células expuestas a NPs de SiO₂.

Figura 11. Migración de células expuestas a NFs de TiO₂.

Figura 12. Migración de células expuestas a NPs de ITO.

Figura 13. Huellas moleculares de DNA, proteínas y lípidos en células epiteliales de pulmón expuestas ENM.

Resumen

Debido a la enorme producción de los ENM el impacto que han tenido sobre la salud humana resulta alarmante por lo que es importante estudiar los efectos citotóxicos que estos puedan promover de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas como tamaño y composición de los mismos para poder predecir o al menos saber los efectos que se pueden esperar de los nanomateriales manufacturados (ENM). La agencia internacional para la investigación del cáncer ha clasificado varias sustancias dentro de ellas se encuentra el dióxido de silicio (SiO_2) el cual está clasificado en el grupo 3 como no carcinogénico para humanos, el dióxido de titanio (TiO_2) se encuentra clasificado en el grupo 2B como posible carcinógeno para humanos al igual que el indio/dióxido de estaño (ITO). En esta segunda parte de la investigación se estudiaron los efectos citotóxicos que generan estos ENM en células epiteliales de pulmón de la línea A549 expuestas a concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas. Se observó que las NFs de TiO_2 a concentraciones elevadas disminuye más del 50% la viabilidad de las células epiteliales de pulmón en comparación con las NPs de SiO_2 e NPs de ITO que no afectaron la viabilidad al menos en las condiciones utilizadas en este estudio. Además, fue evaluada la granularidad y el tamaño celular encontrando mayor afectación por las NFs de TiO_2 seguido de las NPs de ITO resultado que nos llevó a evaluar el citoesqueleto de actina debido a que este organelo es el que da soporte y forma a las células. Los resultados muestran un decremento de los microfilamentos de actina con los tres tipos de ENM. La disminución de los microfilamentos de actina afectó funciones esenciales de la célula como el ciclo y la migración celular. Además, se observaron alteraciones en biomoléculas como el DNA, proteínas y lípidos las cuales fueron analizados mediante micro-espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en células expuestas a NFs de TiO_2 seguido por NPs de SiO_2 . Por lo anterior, se concluyó que las NFs de TiO_2 causaron mayor citotoxicidad seguido de las NPs de SiO_2 e NPs de ITO lo cual puede deberse a la forma fibrosa utilizada en este estudio. Las NPs de SiO_2 e NPs de ITO presentaron menor citotoxicidad bajo las condiciones utilizadas en este estudio en donde se utilizaron solo tres concentraciones a tiempos relativamente

cortos lo cual puede simular una exposición aguda pero no una exposición crónica como es la ocupacional.

1. Introducción

La nanotecnología ha tenido un gran avance en diferentes áreas produciendo novedosos ENM para ser aplicados en diferentes productos de uso común. Sin embargo, existe preocupación sobre los efectos tóxicos que puedan tener principalmente sobre los trabajadores.

Existe evidencia que indica que la inhalación de ENM induce inflamación lo cual puede estar relacionada con patologías pulmonares severas incluyendo cáncer de pulmón (Vlachogianni et al., 2013). Según la Comisión Europea, el número de ENM utilizados para fines industriales alcanza de 500 a 2000 tipos diferentes.

De acuerdo con la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ha enumerado trece tipos de ENM en donde los estudios sobre sus efectos toxicológicos comprometen la salud humana. Dentro de estos trece tipos de ENM se encuentran las nanopartículas de dióxido de silicio (NPs de SiO₂) y las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs de TiO₂). Sin embargo, poco se sabe de los efectos tóxicos de las nanopartículas de indio/dióxido de estaño (NPs de ITO) por lo que es importante comenzar a investigar si este tipo de ENM causa alteraciones en la salud humana.

Debido a la gran cantidad de productos en donde son utilizadas las NPs de SiO₂, NPs de TiO₂ e NPs de ITO como se mencionó en el capítulo 1, las formas a la cual se puede estar expuesto es diversa. Las formas de exposición a cualquier tipo de ENM pueden ser de manera directa o indirecta. Las principales personas expuestas de manera directa son los trabajadores. La exposición de manera ocupacional a los ENM se puede producir en el área en donde se sintetizan y son manipulados los ENM. Además, de los lugares en donde se fabrican o se procesan los productos finales (Ponce, 2013).

Por otra parte, los ENM pueden encontrarse en los ecosistemas por la difusión de estos siendo descargados directamente en ríos o en la atmósfera por las industrias o ser difundidos de forma indirecta por productos que son utilizados o desechados en los ecosistemas (RCPE, 2008).

Los ENM pueden entrar al cuerpo de forma dérmica, oral o inhalatoria siendo esta última la principal vía de exposición a los ENM de manera ocupacional depositándose en los compartimentos nasofaríngeos, regiones traqueobronquiales y regiones alveolares (Ponce 2013).

Por esta principal vía de exposición los ENM pueden alcanzar diferentes regiones. Se han realizado estudios en modelos animales en donde demuestran que la distribución de las NPs de TiO_2 , en el tracto respiratorio depende del tamaño de las NPs. La principal región de acumulación de NPs de TiO_2 es la región nasofaríngea, acumulando un 90% de NPs con un tamaño de 1 nm seguida por la región traqueobronquial con un 10% de las NPs de TiO_2 con un tamaño de 1 nm. Finalmente, en la región alveolar se han registrado NPs de TiO_2 con un tamaño de 20 nm en un 50% (Simkó & Mattsson, 2010; Figura 1).

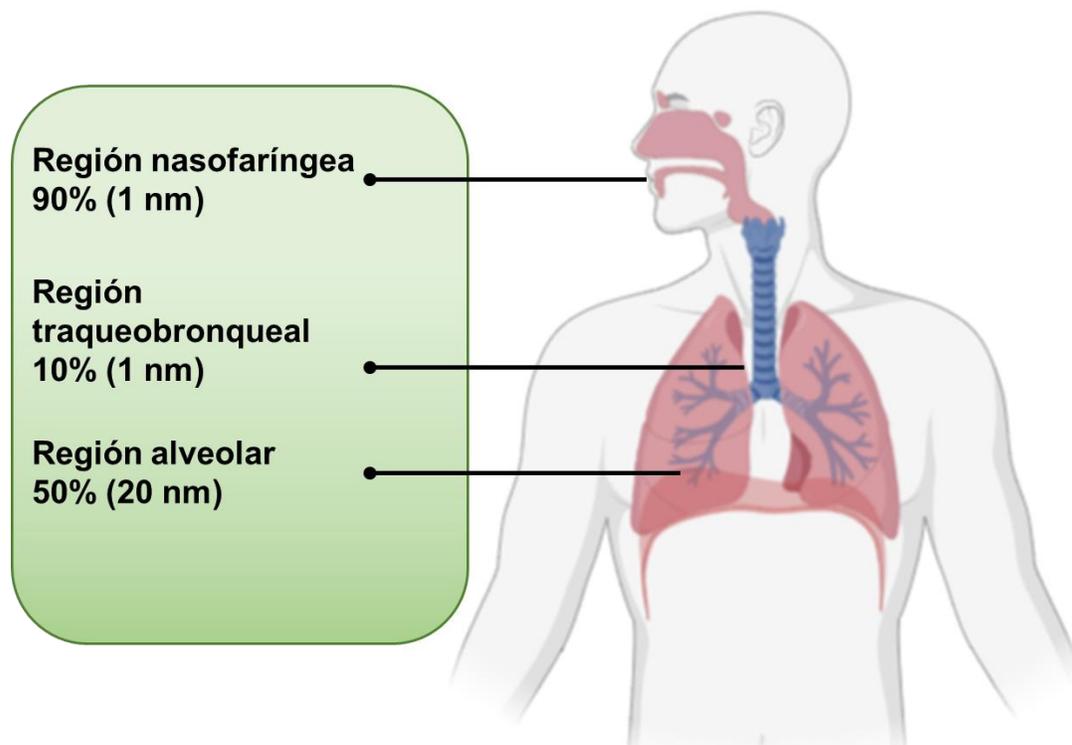


Figura 1. Acumulación de ENM en sistema respiratorio. Debido a que la vía inhalatoria es la principal vía de exposición a los ENM el depósito de estos a lo largo del sistema respiratorio depende de su tamaño.

Debido a que los diferentes tipos de ENM pueden depositarse en el sistema respiratorio producen diferentes respuestas toxicológicas. Cuando los ENM alcanzan la zona alveolar de los pulmones, éstos son internadas por las células epiteliales de pulmón mediante endocitosis.

1.1 Endocitosis y exocitosis de los ENM

Todos los tipos celulares en el cuerpo utilizan el proceso de endocitosis el cual depende de energía para poder internalizar iones y biomoléculas (Iversen et al., 2011). En particular, las células internalizan nutrientes y moléculas para obtener energía e interactuar con otras células. Las vías de endocitosis están clasificadas en endocitosis mediada por clatrina y caveolina, fagocitosis, macropinocitosis y pinocitosis.

La endocitosis mediada por clatrina (Figura 2A) y caveolina (Figura 2B) indica una endocitosis mediada por receptores. Algunos tipos celulares utilizan esta vía de endocitosis para internalizar materiales dentro de la nanoescala incluyendo virus y ENM (Pelkmans et al., 2001; Tomatis et al., 2010). Esta vía de endocitosis es la más importante para la internalización de los ENM dentro de las células debido a que los ENM son recubiertos con la proteína corona, como se describió en el capítulo 1, y mediante los receptores de las células y la proteína corona de los ENM es posible este tipo de endocitosis. Se ha descrito la internalización de ENM por medio de esta vía inhibiendo la endocitosis mediada por clatrina y caveolina con inhibidores específicos lo cual reduce significativamente la internalización de ENM (Anderson et al., 2018).

La vía de la fagocitosis (Figura 2C) es utilizada cuando células fagocíticas internalizan material con tamaños mayores a $0.5 \mu\text{m}$ (Young KD., 2006). Esta vía es dependiente del citoesqueleto de actina. Recientemente se ha demostrado que células especializadas en este proceso, como los macrófagos, pueden reconocer diferentes ENM como las NPs de SiO_2 y las NPs de TiO_2 debido a sus cargas superficiales (Nakayama M., 2018).

La vía de la macropinocitosis (Figura 2D) es un proceso no específico para internalizar fluidos y partículas dentro de las células, mientras que la vía de la pinocitosis absorbe los fluidos biológicos del ambiente externo de la célula. Estas vías de endocitosis son importantes para la internalización de los ENM en las células con tamaños menores a 10 nm (Geiser M., 2010). Los ENM pueden ser internalizados mediante este proceso sin tener que interactuar con la membrana celular debido a que el líquido extracelular es internalizado y en él vienen contenidos los ENM (Adjei et al., 2014).

Una vez internalizados los ENM son eliminados por las células mediante un proceso llamado exocitosis el cual consiste en la formación de una vesícula que se fusiona con la membrana plasmática de la célula liberando contenido celular al exterior de la célula (Wu et al., 2014).

Este proceso de exocitosis es esencial para la célula debido a que es utilizado para diferentes eventos. Por ejemplo, este proceso es utilizado por las neuronas en la secreción de transmisores como los neuropéptidos y hormonas como la vasopresina y oxitocina (Sudhof TC., 2004; Kasai et al., 2012;). Se ha demostrado que mediante el proceso de exocitosis las células pueden eliminar de su interior los ENM que fueron primordialmente internalizados (Oh and Park., 2014). Finalmente, los ENM que son acumulados en los diferentes órganos debido a que no pueden ser metabolizados son eliminados del cuerpo mediante la orina y las heces (Yang et al., 2014).

Una vez internalizados los ENM pueden causar alteraciones a las células afectando diversos organelos y biomoléculas que concluyen en la alteración de diversos procesos importantes para las células.

Los efectos tóxicos causados por los ENM han sido estudiados en diferentes modelos de manera *In vitro* e *In vivo*. Sin embargo, el mecanismo exacto de toxicidad por ENM es aún desconocido. Existe evidencia de diversos factores que contribuyen a la toxicidad de los ENM entre los cuales se encuentran la producción de ROS, daño a DNA y desregulación del ciclo celular (Saifi et al., 2018). Además,

se ha demostrado que el citoesqueleto es uno de los organelos principalmente afectados por los ENM.

El principal efecto que producen los ENM es la producción de ROS las tienen un papel importante en la modulación de diferentes procesos celulares como la supervivencia celular, la muerte celular, la diferenciación y señalización celular (Touyz RM., 2005). La generación de ROS por ENM desencadena una secuencia de eventos patológicos que incluyen inflamación, fibrosis, genotoxicidad y carcinogénesis, producción que es modulada por las propiedades fisicoquímicas de los ENM como su tamaño, carga, área superficial y estructura química (Abdal Dayem et al., 2017).

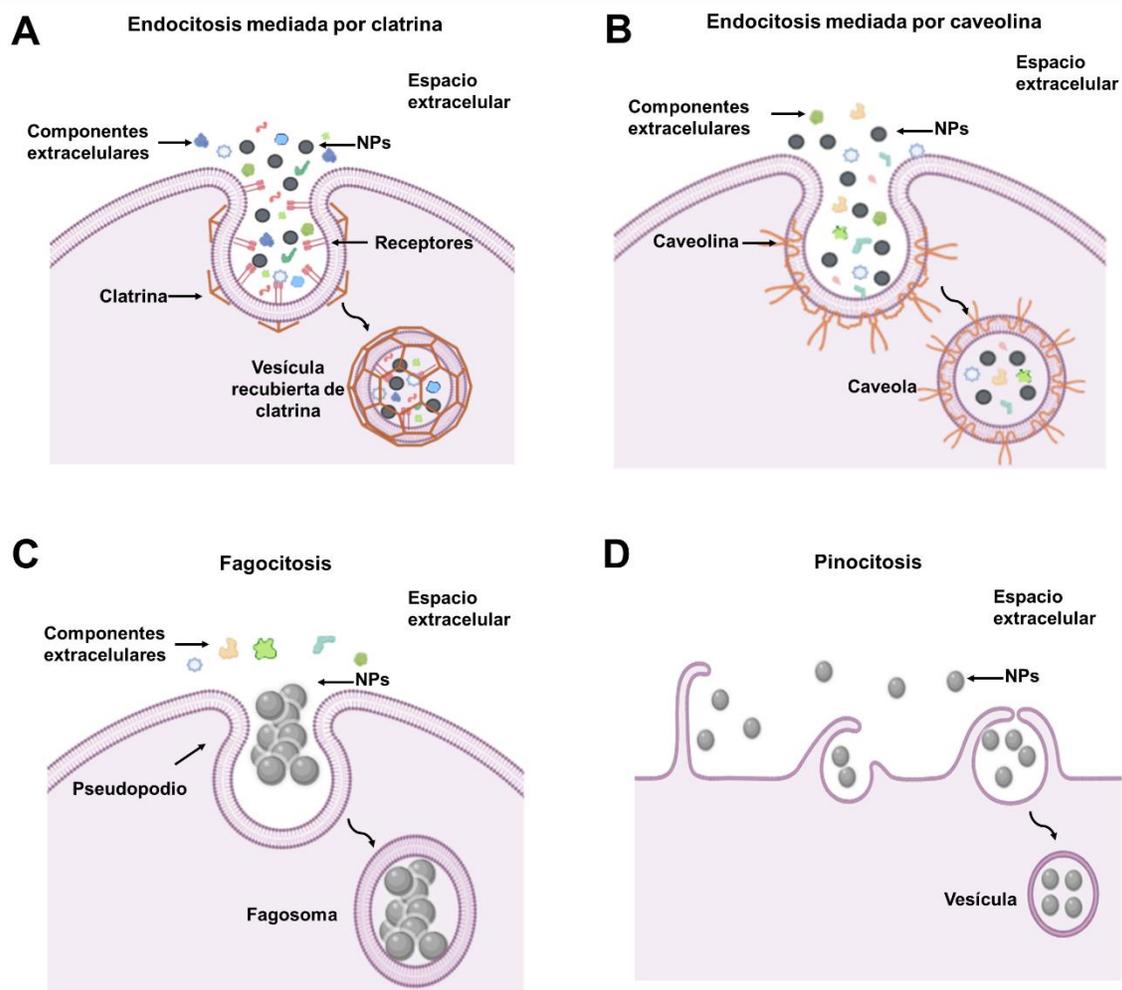


Figura 2. Tipos de endocitosis de los ENM. A) endocitosis mediada por clatrina, **B)** endocitosis mediada por caveolina; **C)** Fagocitosis y **D)** Pinocitosis.

1.2 ENM producen daño a citoesqueleto de actina afectando estructura y funciones celulares

El citoesqueleto de actina es un sistema complejo de filamentos de actina organizado en diversos arreglos estructurales por numerosas proteínas accesorias. El citoesqueleto de actina es la maquinaria principal de las células generadora de fuerzas de empuje (protrusivas), fuerzas de tracción (contráctiles) y fuerzas de resistencia (contráctiles). Este tipo de fuerzas que genera el citoesqueleto de actina es esencial para funciones celulares como la migración, la interacción con el medio, la forma y las propiedades mecánicas de la superficie celular (Svitkina T., 2018).

El citoesqueleto de actina es muy dinámico ya que consiste en procesos de polimerización y despolimerización según lo requiera la célula. Sin embargo, este dinamismo que está perfectamente sincronizado puede alterarse por la exposición a ENM. Se ha demostrado que la exposición a NPs de dióxido de zinc puede desorganizar los filamentos de actina en células de neuroblastoma de humano formando aglomerados de actina en la periferia de la célula (Liu et al., 2017). Por otro lado, se ha demostrado que la exposición a NPs de plata afecta el citoesqueleto de actina en células endoteliales afectando la elasticidad celular, característica que está estrechamente relacionada con la morfología celular, alterando la producción de óxido nítrico y prostaglandinas (Kolodziejczyk et al., 2018).

El citoesqueleto de actina también está involucrado en la migración celular proceso que incluye cuatro pasos. Primero, en respuesta a señales del medio junto con las proteínas de adhesión que se encuentran en la matriz extracelular forman una protuberancia llamada lamelipodio. En segundo lugar, se forman nuevas adherencias focales en la parte frontal de la célula que se encuentra en movimiento para fortalecer su unión a la matriz extracelular. El tercer paso, consiste en aumentar la fuerza de retracción para despegar la parte trasera, de la célula en movimiento, de la matriz extracelular. El cuarto paso consiste desunir las adherencias focales de la parte posterior de la célula para permitir que el cuerpo de la célula avance. En este proceso el citoesqueleto de actina juega un papel importante ya que se somete a un proceso de polimerización y despolimerización durante el movimiento celular, regulando la formación de los lamelipodios. Participa también en el ensamblaje y

desensamblaje de las adhesiones focales y la organización de los filamentos contráctiles (Gerthoffer WT., 2008; Pollard and Cooper., 2009; Cleary et al., 2014). Por lo que las alteraciones en el citoesqueleto de actina inhiben la migración y adhesión celular (Figura 3).

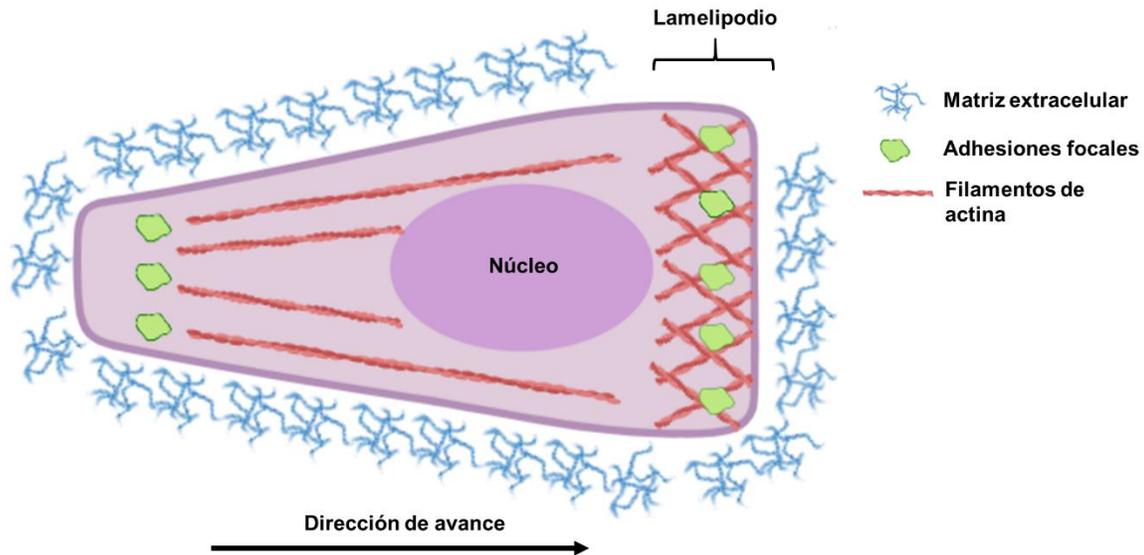


Figura 3. Esquema representativo de la migración celular. La migración celular depende principalmente del citoesqueleto de actina. Los lamelipodios y las adhesiones focales se encuentran en frente de la célula en movimiento. En el lamelipodio se encuentran adhesiones focales y una gran concentración de filamentos de actina los cuales con los encargados de ejercer la fuerza de tracción. La fuerza de tracción también es llevada a cabo por los filamentos de actina que se encuentran a lo largo de la célula. Las adhesiones focales traseras se desmontan para permitir la retracción de las células.

Sin embargo, este proceso también es afectado por los ENM. Se ha reportado que la exposición a nanovarillas de oro desorganiza los filamentos de actina y disminuye la expresión de proteínas de adhesión como N-caderina y zónula occludens 2, alteraciones que causan un decremento en la migración celular en células de cáncer cervical y mama (HeLa y MCF-7 respectivamente; Wu et al., 2018). Otro tipo celular como los queratinocitos de humano son afectados de manera similar en donde NPs de SiO₂ suprime de manera significativa la adhesión celular de la fibronectina disminuyendo además la migración celular (Wang et al., 2012). También se ha estudiado el efecto que tienen NPs de oro en células de próstata y de pulmón,

ambas líneas celulares de humano, encontrando que la migración celular de ambas líneas disminuyó, pero la adhesión celular no se vio afectada (Shahhoseini et al., 2019).

Los efectos que se tienen sobre el citoesqueleto de actina afectan otras funciones importantes para la célula. Además, estas alteraciones dependen de las propiedades fisicoquímicas de las NPs y de la línea celular estudiada. Es importante analizar el citoesqueleto de actina debido a que los estudios se enfocan principalmente en la alteración de las funciones y solo se menciona que el citoesqueleto de actina esta relaciona y no se considera un marcador de toxicidad de los ENM teniendo mucha importancia sus alteraciones.

1.3 Alteraciones del ciclo celular por ENM

El ciclo celular es el responsable de regular diferentes procesos en la célula para que sea posible la división celular. Este proceso esta estrictamente regulado por diferentes puntos de control que regulan la progresión a través de diferentes fases del ciclo celular (Dai et al., 2018). El ciclo celular se divide en cuatro fases las cuales son G1, S, G2 y M (Figura 4). Después de la división celular las células hijas pasan por un periodo de crecimiento en donde las macromoléculas incluidas las proteínas, el RNA y la membrana son sintetizadas, a este proceso se le conoce como G1. Posteriormente, las células pasan por un periodo de síntesis de DNA proceso al cual se le conoce como fase S. Después de la fase S las células pasan por una segunda fase de crecimiento llamada G2 para después someterse a la fase de mitosis, fase M, en la cual el material genético se divide por igual en dos células hijas (Poon., 2016).

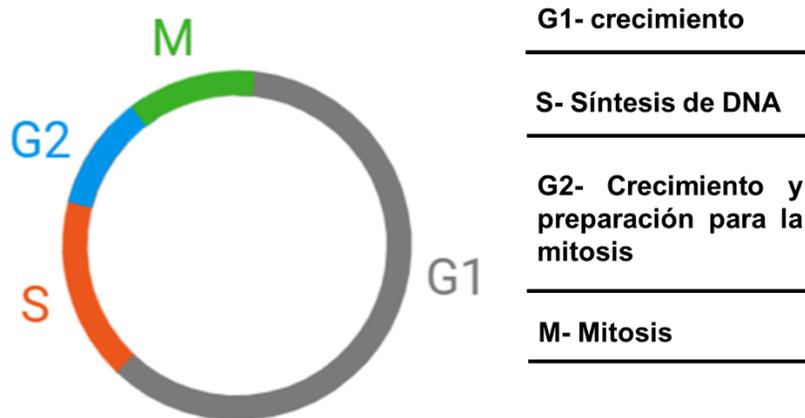


Figura 4. Ciclo celular. Esquema que representa las cuatro fases del ciclo celular.

Los procesos que ocurren durante el ciclo celular son importantes ya que de ellos depende la proliferación celular. Sin embargo, cuando las células son expuestas a los ENM estos procesos son alterados provocando un bloqueo en la proliferación celular. De esta manera la nanomedicina ha propuesto diferentes alternativas para el tratamiento del cáncer con el uso de los ENM. Los principales ENM utilizados para este propósito son las NPs de oro y plata las cuales han sido comparadas para probar su efectividad en diferentes líneas celulares cancerosas causando apoptosis por daño a DNA, además, de arrestar a las células en fase S y alterar la expresión de genes reguladores del ciclo celular como las ciclinas (Hembram et al., 2019; Kabirian-Dehkordi et al., 2019).

Por otro lado, la población se encuentra expuesta a diferentes tipos de ENM y como se mencionó anteriormente los ENM pueden depositarse en diferentes partes del cuerpo lo cual puede ocasionar alteraciones al ciclo celular en células de diferentes tejidos en donde los ENM se depositen.

Se ha demostrado que NPs de TiO₂ recubiertas de SiO₂ causan arresto en la fase S en células epiteliales de pulmón (Bengalli et al., 2019). Sin embargo, también han sido reportadas alteraciones en la fase G2/M en células alveolares de humano

expuestas a NPs de TiO_2 (Kansara et al., 2015). Este tipo de alteraciones en el ciclo celular se ha observado también con la exposición a diferentes ENM como NPs de zinc y cobre aumentando la fase S y disminuyendo la fase G2/M en células epiteliales de pulmón (Tolliver et al., 2020). Las alteraciones en el ciclo celular pueden ocurrir en cualquier fase del ciclo celular dependiendo de la línea celular y el tipo de ENM al cual este expuesta (Huang et al., 2017; Gao et al., 2015; Luo et al., 2014).

El estudio del ciclo celular es importante debido a que si este proceso es alterado las células pueden ser llevadas a apoptosis y no cumplir sus funciones en los diferentes tejidos. Además, las alteraciones en el ciclo celular nos dan un panorama general si los ENM causan daño a DNA lo cual puede concluir en eventos carcinogénicos.

2. Antecedentes

Se han realizado estudios en donde se describen los mecanismos por los cuales diferentes tipos de ENM pueden ser internalizados en las células. Una de estas vías de internalización es mediante fagocitosis/endocitosis. La endocitosis mediada por receptores es una de las vías debido a que la membrana celular contiene una gran cantidad de receptores los cuales son específicos para desencadenar vías de señalización. Y como se estudió en el capítulo pasado los ENM son recubiertas por proteínas las cuales son reconocidas por las células. Una de las señales que desencadena es la endocitosis mediada por clatrina, proceso que invagina a los ENM en endosomas (Singh et al 2016).

Debido a que las NPs de SiO₂ se encuentra en los primeros lugares de producción a nivel mundial se han realizado estudios acerca de su toxicidad. Por ejemplo, se ha demostrado que las NPs de SiO₂ causan alteraciones en hepatocitos de humano disminuyendo la viabilidad celular. Además, las NPs de SiO₂ retrasan las fases S y G2/M del ciclo celular induciendo daño a DNA de los hepatocitos. En este estudio también observaron que las NPs de SiO₂ inducen apoptosis la cuál fue mediada por el daño a mitocondria debido a la liberación de proteínas pro-apoptóticas. Estos resultados demuestran el grado de toxicidad de las NPs de SiO₂ lo cual es de suma importancia tomar en cuenta debido a su amplio uso en productos de uso común (Yang et al., 2019).

Por otro lado, se han estudiado los efectos que tienen diferentes formas de NPs de SiO₂ como las amorfas (NPs de SiO₂) y mesoporosas (mNPs de SiO₂) en células epiteliales de pulmón encontrando que la forma influye en el grado de toxicidad. Por ejemplo, en este estudio encontraron que las mNPs de SiO₂ son menos tóxicas en comparación con las NPs de SiO₂ sin embargo los dos tipos de NPs tienen la capacidad de acumularse en el retículo endoplásmico incrementando los marcadores de estrés seguido por un proceso apoptótico. Poco se sabe sobre el mecanismo exacto por el cual las NPs de SiO₂ inducen apoptosis por lo que hacen falta más estudios para elucidarlo. Sin embargo, es claro que la morfología de las NPs influye en los procesos citotóxicos (Wu et al., 2019)

Se han estudiado los efectos de las NPs de TiO_2 en células epiteliales de pulmón de la línea A549 en donde analizan la interacción que tienen dichas NPs con los fosfatos de las células. Mediante análisis de fosfoproteómica se analizaron los fosfopéptidos de las células A549 que fueron expuestas a NPs de TiO_2 . Los resultados reportados fueron que las NPs de TiO_2 con un tamaño de 21 nm afectan procesos importantes como apoptosis, ciclo celular y la respuesta al daño a DNA analizando TP53 así como procesos inflamatorios. Estos análisis fueron realizados con la finalidad de elucidar un poco en donde comienza la cascada de señalización que generan las NPs de TiO_2 para afectar diferentes procesos (Biola-Clier et al., 2020).

Por otro lado, se han estudiado los efectos que ocasiona la exposición de NPs de TiO_2 sobre la morfología celular y sus características mecánicas de células MCF-7. En este estudio se demostró que las NPs de TiO_2 ocasionan significantes alteraciones en el citoesqueleto de actina teniendo a demás alteraciones en las membranas celulares efectos que fueron analizados mediante microscopia de fuerza atómica (Cascione et al., 2019).

Efectos similares se han encontrado en células A549 expuestas a NPs de ITO. Los resultados que demostraron en este estudio fueron que NPs de ITO tiene baja citotoxicidad en células A549 aun cuando las NPs de ITO son internadas por las células. Sin embargo, se demostró que el estrés oxidante incrementa en las células A549 expuestas a NPs de ITO en comparación con las células control. Además, se observó que las NPs de ITO inducen daño a DNA (Tabei et al., 2015)

3. Justificación

Debido a que los ENM son utilizados en diferentes productos por sus propiedades fisicoquímicas su producción ha ido en aumento con el paso de los años sintetizando nuevas formas para sus diversas aplicaciones. Además, NPs de SiO₂ y NFs de TiO₂ son las más producidas a nivel mundial y las NPs de ITO están emergiendo y produciéndose cada vez en mayor cantidad por sus propiedades fisicoquímicas que son muy prometedoras dentro del mercado.

Existen tres vías de exposición por las cuales los diferentes tipos de NPs pueden entrar al cuerpo humano como la vía dérmica, la vía oral y la vía inhalatoria siendo esta última la principal vía de exposición de manera ocupacional.

Por lo que es importante conocer los efectos tóxicos que los ENM puedan ocasionar en el tracto respiratorio. Debido a esto se utilizaron células epiteliales de pulmón para evaluar los efectos de los tres diferentes tipos de ENM considerando sus propiedades fisicoquímicas como sus componentes y la morfología.

Por lo anterior es de nuestro interés comparar los efectos citotóxicos que ocasionan tres diferentes tipos de ENM como las NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ e NPs de ITO en células epiteliales de pulmón.

En esta segunda parte del estudio nos enfocamos en analizar los efectos que tienen los ENM sobre los principales componentes celulares como el citoesqueleto, DNA, proteínas y lípidos. Además, también nos centramos en analizar las funciones de las células epiteliales de pulmón como su ciclo celular y la capacidad de migración.

4. Hipótesis

Células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y a NPs de ITO tendrán alteraciones estructurales del citoesqueleto de actina la cual afectará la migración celular. Además, dicha exposición alterará la distribución de fases de su ciclo celular y afectará a las principales biomoléculas como DNA, proteínas y lípidos.

5. Objetivo general

-Comparar los efectos citotóxicos de las células epiteliales de pulmón expuestas a tres diferentes tipos de ENM como NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y NPs de ITO.

5.1 Objetivos particulares

1. Analizar mediante FTIR el espectro de los ENM en seco y en solución salina.
2. Exponer las células epiteliales de pulmón a los ENM a concentraciones de 1 µg/cm², 10 µg/cm² y 50 µg/cm² durante 24 h.
3. Cuantificación de la viabilidad de células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes tipos de ENM.
4. Evaluar la granularidad y el tamaño de células epiteliales de pulmón cuando son expuestas a los ENM.
5. Evaluar la integridad el citoesqueleto de actina de células epiteliales de pulmón expuestas a los ENM.
6. Evaluar la distribución de las fases del ciclo celular de células epiteliales de pulmón expuestas a los tres tipos de ENM.
7. Cuantificar la migración de células epiteliales de pulmón expuestas a los ENM.
8. Analizar el daño a DNA, proteínas y lípidos de las células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes ENM mediante FTIR.

6. Materiales y Métodos

6.1 Caracterización de ENM mediante FTIR

Los ENM utilizados en este estudio fueron NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ e NPs de ITO los cuales se analizaron mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (por sus siglas en inglés FTIR) para conocer el espectro de cada ENM utilizando un espectrómetro Jasco FT/IR-6600 (Jasco Corporation, Tokyo Japan) en el modo ATR-FTIR. Brevemente, una pequeña muestra de polvo de cada ENM fue depositada sobre la superficie del cristal ATR-FTIR para su análisis en seco. Adicionalmente, se analizó el espectro de cada ENM resuspendidos en solución salina preparando previamente un stock de 1 mg de cada ENM en 1 mL de solución salina (0.9% NaCl). Posteriormente, 3 µL del stock fueron depositados sobre el cristal ATR-FTIR dejándolo secar a temperatura ambiente durante 12 minutos para su posterior análisis.

6.2 ENM y tratamientos en células epiteliales de pulmón

Los ENM fueron caracterizados conociendo sus propiedades fisicoquímicas como el tamaño primario, el tamaño hidrodinámico, el potencial zeta y su polidispersión en los diferentes medios de suspensión (Capítulo 1). Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a 1 µg/cm², 10 µg/cm² y 50 µg/cm² durante 24 horas. Brevemente, células epiteliales de pulmón, de la línea A549, fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) las cuales fueron cultivadas con medio F12k suplementado con 10% de SFB incubadas a una atmósfera de 95% de humedad relativa a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Una vez alcanzado el 80% de confluencia las células epiteliales de pulmón fueron despegadas con tripsina-EDTA (In Vitro S.A., Cat. No. EN-008, México) y sembradas en placas de 21 cm². Para la exposición a ENM se preparó un stock para cada tipo de ENM. Brevemente, se pesó 1 mg de NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y NPs de ITO las cuales fueron resuspendidas en 1 mL de medio F12k suplementado con 10% de SFB. Una vez preparado el stock, fue sonicado durante 30 minutos a 40 Hz y se utilizaron concentraciones finales de 1 µg/cm², 10 µg/cm² y 50 µg/cm² de los ENM. Las células epiteliales de pulmón fueron expuestas a los tres tipos de ENM durante 24 horas.

6.3 Viabilidad celular

La viabilidad de las células epiteliales de pulmón fue determinada mediante la exclusión de azul tripano. Brevemente, células epiteliales de pulmón fueron sembradas en placas de 21 cm² y expuestas a los ENM durante 24 horas como se indica en la sección anterior. Posteriormente, las células que fueron expuestas a los ENM fueron despegadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Inmediatamente, fue retirado el sobrenadante y sustituido por medio F12k suplementado con 10% de SFB. De manera independiente fue preparada una solución de medio de cultivo con azul tripano en una proporción 1:8. Posteriormente, 10 µL de la suspensión celular fueron adicionados a la mezcla de azul tripano resuspendiendo uniformemente. Finalmente fueron tomados 10 µL de las células resuspendidas en azul tripano y las células vivas fueron contadas en cámara de Neubauer. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.4 Granularidad y tamaño celular

La granularidad y el tamaño celular de células epiteliales de pulmón expuestas a los ENM fueron determinados mediante citometría de flujo. Brevemente, el tamaño celular y la granularidad de las células epiteliales de pulmón expuestas a los ENM a concentraciones de 1 µg/cm², 10 µg/cm² y 50 µg/cm² durante 24 horas fueron lavadas con HBSS 1X para retirar el exceso de ENM. Posteriormente las células epiteliales de pulmón fueron despegadas con tripsina-EDTA y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Inmediatamente, el sobrenadante fue desechado y las células epiteliales de pulmón fueron incubadas en alcohol etílico frío al 70% y centrifugadas nuevamente a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante fue desechado y las células epiteliales de pulmón fueron resuspendidas en FACS Flow (BD Biosciences, Cat. No. 342003) analizando 10,000 eventos utilizando un citómetro (BD FACSCalibur). Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.5 Inmunofluorescencia de actina

Células epiteliales de pulmón fueron sembradas sobre cubreobjetos en placas de 10 cm² en una densidad de 200,000 células, posteriormente fueron expuestas a los diferentes ENM a concentraciones de 1 µg/cm², 10 µg/cm² y 50 µg/cm² durante 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas de exposición las células epiteliales de pulmón fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 1 hora y lavadas con PBS tres veces durante 5 minutos. Inmediatamente, las muestras fueron incubadas con acetona fría durante 5 minutos para su permeabilización y lavadas con PBS tres veces más. Posteriormente, las células epiteliales de pulmón fueron incubadas con 1% de albúmina sérica bovina durante 1 hora. Para la inmunodetección anti-actina las células epiteliales de pulmón de los tres diferentes tratamientos fueron incubadas con faloidina rodaminada (Sigma-Aldrich, Cat. No. P-1951) en una dilución 1:1000 e incubadas con Hoechst (Life Technologies, Cat. No.62249) en una dilución 1:1000 para detectar el núcleo. Todas las muestras fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas tres veces con PBS-1% tritón, seguido por dos lavados con PBS y finalmente lavadas dos veces con agua destilada. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP8) y la fluorescencia fue cuantificada utilizando el software LASX Life Science (Leica). La fluorescencia de las muestras control fue considerada como la fluorescencia basal para cada proteína. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.6 Ciclo de celular de células epiteliales de pulmón

Para evaluar la distribución del ciclo celular células epiteliales de pulmón fueron expuestas a los tres diferentes ENM durante 24 horas e incubadas con 0.8 mM de hidroxurea durante 24 horas para sincronizar a las células en fase G0/G1. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con etanol frío al 70%. El DNA fue teñido con 50 µM de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, Cat. No. 25535-16-4) conteniendo 0.1 mg/mL de RNAsa (Sigma-Aldrich, Cat. No. 9001-99-4) a 37°C durante 15 minutos. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante

citometría de flujo en donde fueron analizados 10,000 eventos. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.7 Ensayo de migración

La migración de células epiteliales de pulmón expuestas a los ENM a diferentes concentraciones fue determinada mediante el ensayo de la herida. Brevemente, células epiteliales de pulmón fueron sembradas en placas de 12 pozos a una densidad de 200,000 células por pozo y expuestas a los ENM. Una vez confluentes, la monocapa de células fue rayada con ayuda de una punta de micropipeta. Inmediatamente, el medio de cultivo fue retirado y la monocapa de células fue lavada con PBS tres veces para remover las células que fueron despegadas. Inmediatamente, fue adicionado medio de cultivo F12k suplementado con 10% de SFB fresco al cual se le adicionaron 10 μ M de inhibidor de proliferación citosina β -D-arabinofuranósido (Ara-C., Sigma Aldrich Cat. No. C6645) para detectar la migración celular evitando la proliferación. La migración celular fue monitoreada a distintos tiempos 0, 3, 6, 12 y 24 horas utilizando un microscopio invertido Leica DM IL LED con una amplificación de 4X. Finalmente, el área de migración celular fue cuantificada usando el software ImageJ (disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/>). Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.8 Huellas moleculares de DNA, proteínas y lípidos de células epiteliales de pulmón expuestas a ENM

Las huellas moleculares de células expuestas a ENM fueron detectadas mediante FTIR dentro del rango de espectro de 4000-400 cm^{-1} . Brevemente, células epiteliales de pulmón fueron expuestas a los diferentes ENM como se indica en la sección 6.2. Una vez cumplido el tiempo de exposición, las células epiteliales de pulmón fueron colectadas y lavadas dos veces con PBS para finalmente ser resuspendidas en solución salina (0.9% NaCl). Posteriormente, 4 μ L de la suspensión celular fueron depositados sobre el cristal ATR-FTIR para su análisis. Los espectros fueron

normalizados utilizando el software UNSCRAMBLER X10.3 CAMO como lo reportado anteriormente (Vazquez-Zapien et al., 2016).

6.9 Análisis estadístico

Para la comparación estadística, los datos fueron presentados como $\text{mean} \pm \text{standard error}$ (* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$) de al menos tres experimentos independientes los cuales fueron analizados mediante el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

7. Resultados

7.1 Propiedades fisicoquímicas de ENM

NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y NPs de ITO anteriormente fueron caracterizadas mostrando un tamaño primario de >100 nm, <100 nm y >100 nm respectivamente. NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ e NPs de ITO resuspendidas en medio de cultivo F12k formaron aglomerados de 444 nm, 722 nm y 586 nm respectivamente con un potencial zeta de entre -6.6 y -15.2 mV y la polidispersión fue menor a 1.0 para los tres tipos de NPs (Ver tabla 1, Capítulo 1). Los espectros de FTIR de cada ENM en seco fueron analizados (Figura 5A). El espectro para las NPs de SiO₂ fue detectado dentro de la región de 600-1450 cm⁻¹ (Figura 5Ai), para las NFs de TiO₂ el espectro fue localizado dentro de la región de 400-1200 cm⁻¹ (Figura 5Aii). Para las NPs de ITO el espectro de SnO₂ fue localizado en la región de 620 cm⁻¹ y para In₂O₃ fue localizado dentro de la región 433-592 cm⁻¹ (Figura 5Aiii). Los espectros de FTIR de los ENM resuspendidos en solución salina fueron analizados y no se encontraron interferencias en comparación con los espectros de los ENM en polvo (Figura 5Bi, ii, iii).

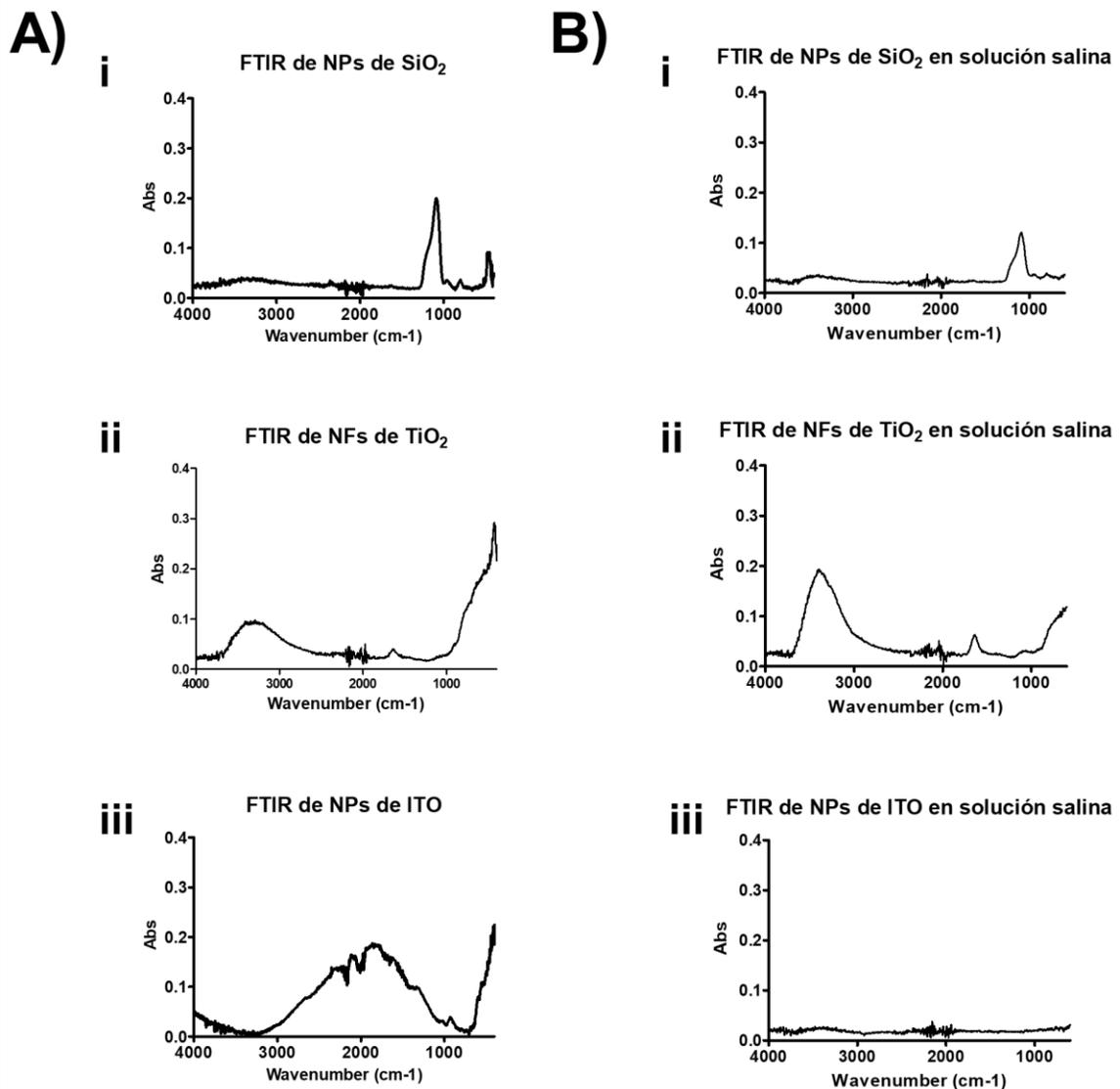


Figura 5. Caracterización de ENM. Espectros de FTIR de los ENM. A) Espectros de los ENM en polvo y B) espectros de los ENM resuspendidos en solución salina. Tres experimentos independientes fueron realizados.

7.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada mediante exclusión de azul tripano. Los resultados mostraron que las células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de SiO₂ no mostraron cambios en la viabilidad celular comparada con las células control (Figura 6A). Sin embargo, cuando las células epiteliales de pulmón fueron expuestas a NFs de TiO₂ la viabilidad disminuyó de manera concentración

dependiente (Figura 6B). NPs de ITO no causaron un decremento en la viabilidad, sin embargo, con las concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aparentemente las células aumentaron su número lo que sugiere que posiblemente las células proliferaron aún más (Figura 6C).

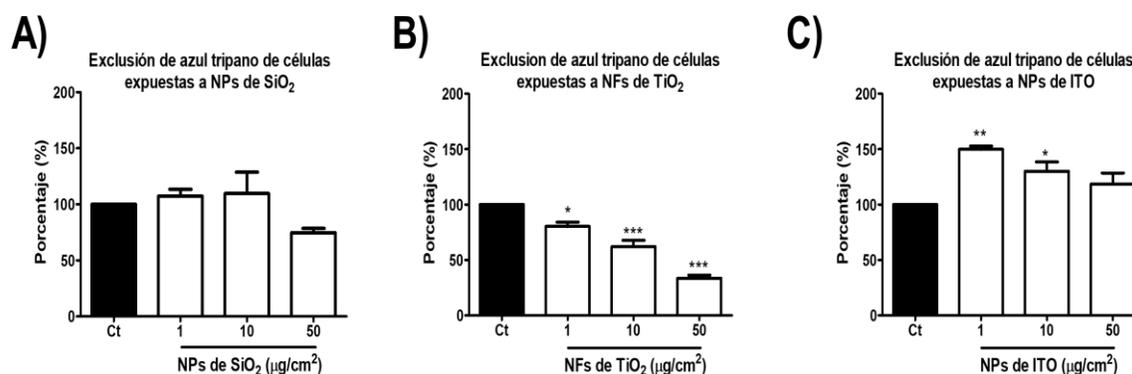
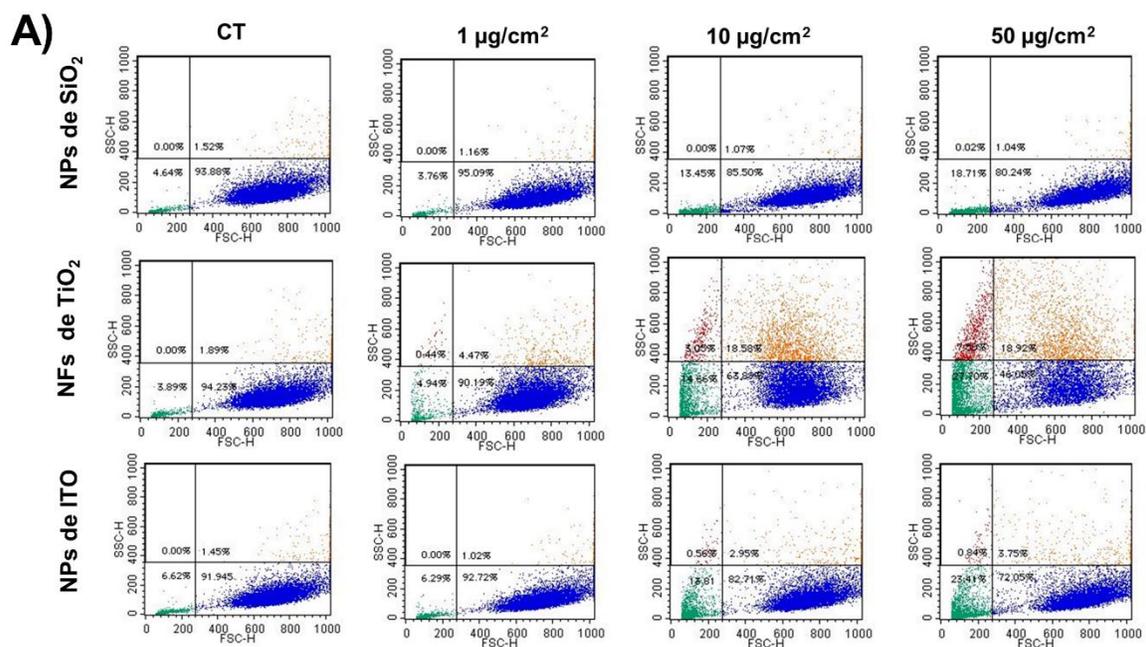


Figura 6. Viabilidad de células epiteliales de pulmón. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a los tres diferentes tipos de ENM durante 24 horas. Los resultados muestran que las NFs de TiO_2 causaron un decremento significativo a partir de la concentración más baja en comparación con las células control. NPs de SiO_2 y NPs de ITO no alteraron la viabilidad celular. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar; * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs control.

7.3 ENM causan cambios en la granularidad y el tamaño celular

Las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a los diferentes tipos de ENM a diferentes concentraciones durante 24 horas, como se indica en la sección 5.1, tuvieron cambios en la granularidad y el tamaño celular (Figura 7A). NPs de SiO_2 no causaron cambios en la granularidad de las células epiteliales de pulmón ya que los valores se mantuvieron similares a las células control (Figura 7B). Sin embargo, el tamaño celular disminuyó en un 10.56% con la concentración de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 7B). Las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a NFs de TiO_2 aumentaron su granularidad a las concentraciones de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en un 17.21% y 18.6% respectivamente (Figura 7B). Además, el tamaño celular de las células epiteliales de pulmón expuestas a NFs de TiO_2 disminuyó a las concentraciones de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en un 28.29% y 54.56% respectivamente (Figura 7B). La granularidad de las células expuestas NPs de ITO

aumentó en un 2.7% en comparación con las células control y el tamaño celular disminuyó con las concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en un 10.01% y 21.64% respectivamente (Figura 7B). Estos resultados sugieren que el aumento de granularidad es debido a la internalización de los diferentes tipos de ENM. Sin embargo, la disminución del tamaño puede referirse a que dicha internalización este afectando estructuras importantes como el citoesqueleto teniendo como consecuencia una pérdida en la morfología y tamaño celular.



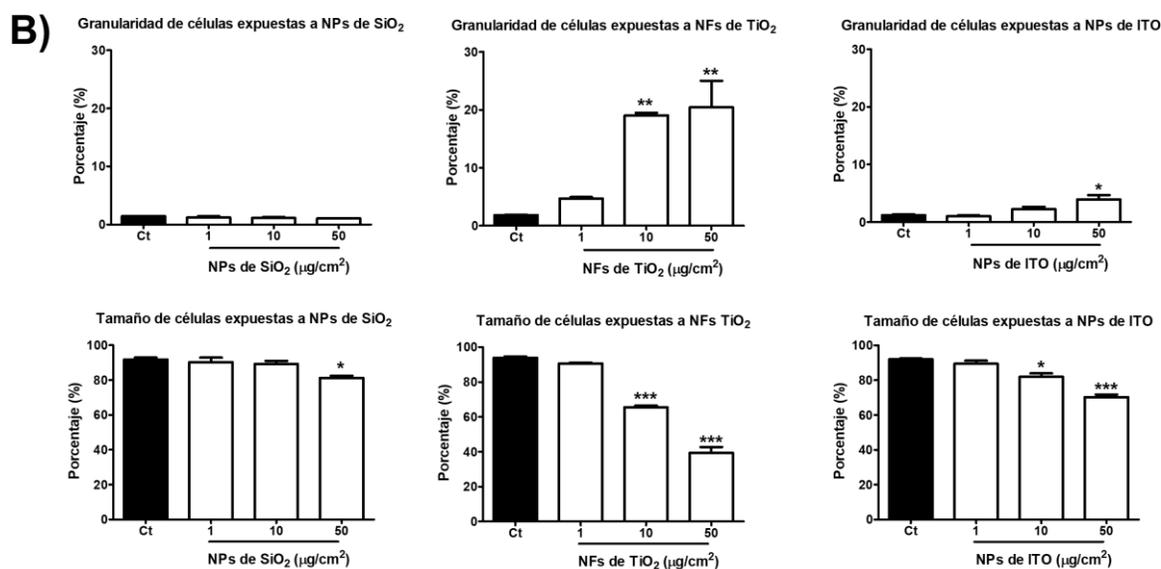
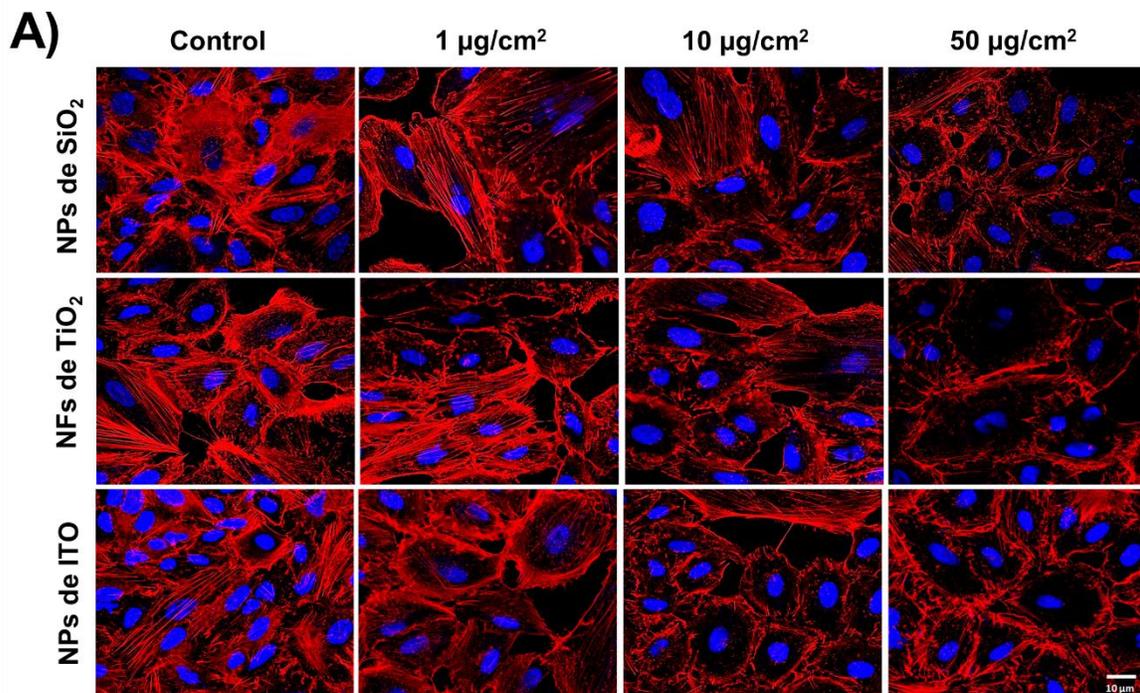


Figura 7. Tamaño y granularidad de células epiteliales de pulmón. A) Dot plot representativo de forward scatter (FSC-H; tamaño celular) vs side scatter (SSCH; granularidad) por citometría de flujo de células epiteliales de pulmón expuestas a ENM durante 24 horas. **B)** cuantificación del tamaño celular y la granularidad. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar; * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs control.

7.4 El citoesqueleto de actina es afectado por los ENM

Debido a que los resultados de tamaño celular no indicaron en que había una disminución la siguiente pregunta fue saber si el citoesqueleto de las células era afectado por los tres diferentes tipos de ENM. Para responder lo anterior se realizaron inmunofluorescencias anti-actina para conocer si dicho organelo que da forma y soporte a las células era afectado. Los resultados de las inmunofluorescencias mostraron que las células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes ENM disminuyen la cantidad de tinción positiva para actina con los tres diferentes tratamientos. Además, se logra observar que la cantidad de microfilamentos formados por la proteína actina disminuye de manera concentración dependiente (Figura 8A). Posteriormente, se realizó la cuantificación de la fluorescencia de las diferentes muestras obtenidas con los distintos tratamientos. La fluorescencia de las células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de SiO₂ a concentraciones de 1 µg/cm², 10 µg/cm² y 50 µg/cm² disminuyó en un 49.2%, 60.8% y 73.5% respectivamente. Por otro lado, la fluorescencia de células epiteliales de pulmón expuestas a NFs de TiO₂ disminuyó en un 22.4%, 45.6% y

57.3% a las concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente. Las células expuestas a NPs de ITO disminuyeron la fluorescencia de actina en un 39.7%, 55.8% y 56.9% a las concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente (Figura 8B).



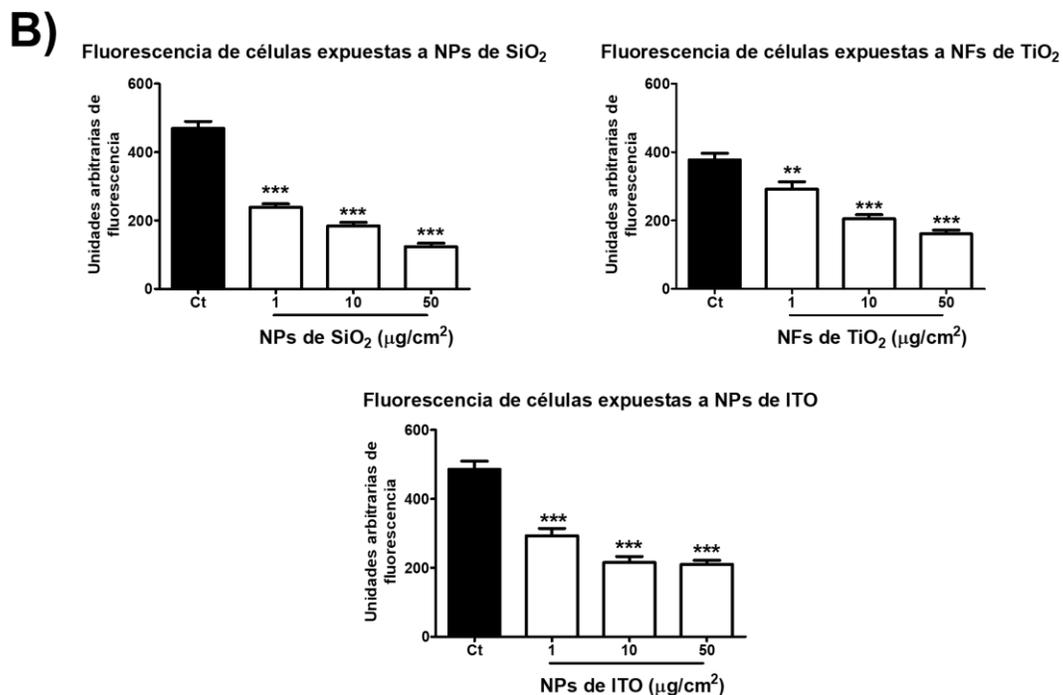


Figura 8. Desorganización del citoesqueleto de actina inducido por ENM. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a 1 µg/cm², 10 µg/cm² y 50 µg/cm² de ENM durante 24 horas. **A)** El citoesqueleto de actina fue analizado mediante inmunofluorescencias (tinción roja) y el núcleo fue detectado con Hoechst (tinción azul) usando microscopia confocal. **B)** Cuantificación de la fluorescencia. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media ± error estándar; **p< 0.05; ***p<0.001 vs control.

7.5 Disminución de la fase G1 causada por los tres tipos de ENM y acumulación de la fase G2/M en células expuestas a NFs de TiO₂ y NPs de ITO

Las alteraciones de la red del citoesqueleto pueden provocar cambios en la distribución de las fases del ciclo celular. Los resultados mostraron que las células epiteliales de pulmón expuestas a 10 µg/cm² de NPs de SiO₂ tuvieron una disminución del 6.68% la fase G1 (Figura 9A). Las concentraciones de 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ disminuyeron la distribución de la fase G1 un 9.1% y 12.7% respectivamente (Figura 9B). La distribución de las fases del ciclo celular de las células epiteliales de pulmón expuestas a la concentración más alta de NFs de TiO₂ no pudo ser determinada. La concentración más alta de NPs de ITO indujo una disminución del 10.27% en la fase G1 (Figura 9C). La distribución de la fase G2/M no fue alterada por la exposición a NPs de SiO₂. La exposición a 1 µg/cm² y 10

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NFs de TiO_2 causó un aumento en la fase G2/M de 59.9% y 77.89% respectivamente, pero no fue posible determinar la distribución del ciclo celular en las células expuestas a la concentración más alta. Las ITO NP causaron un aumento del 63,69% en la fase G2/M a la concentración más alta (Figura 9C). NPs de SiO_2 , NFs de TiO_2 y NPs de ITO no causaron alteraciones en la fase S del ciclo celular.

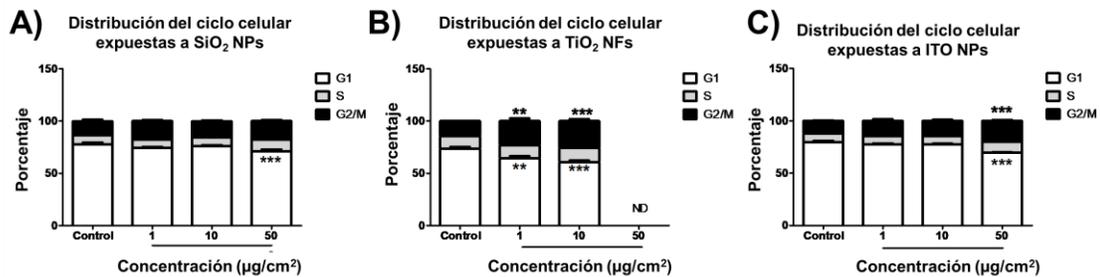
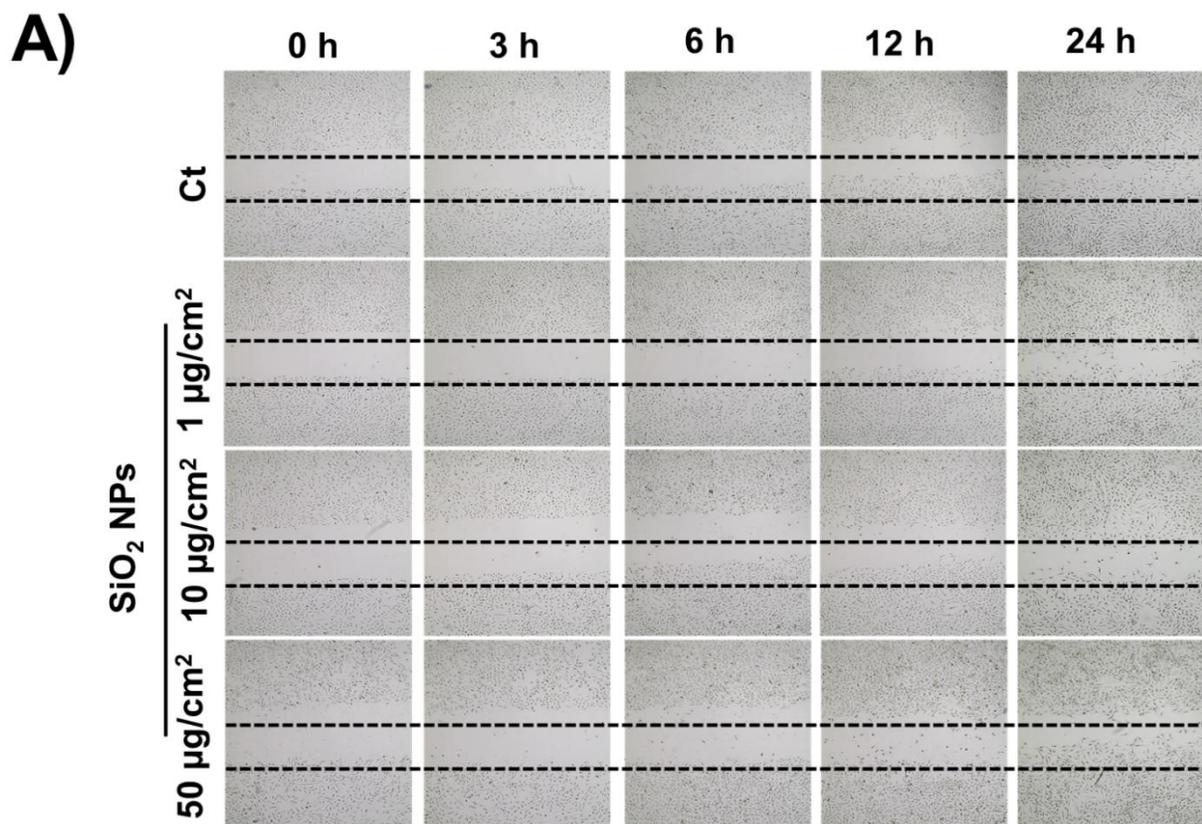


Figura 9. Alteraciones en la distribución del ciclo celular de células epiteliales de pulmón expuestas a ENM. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a los diferentes tipos de ENM y privadas de SFB durante 24 horas seguido de la sincronización de G1/S usando hidroxurea. La distribución del ciclo celular fue analizada mediante citometría de flujo. La fase G1 (barra blanca) fue afectada con la exposición a los tres diferentes tipos de ENM mientras que la fase G2/M (barra negra) solo fue alterada por la exposición a NFs de TiO_2 e NPs de ITO. Los ENM no afectaron la fase S (barra gris). Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs control.

7.6 La migración celular disminuye por la exposición a ENM

Debido a que observamos que los tres diferentes tipos de ENM causan daño en uno de los principales componentes del citoesqueleto como lo es la actina se decidió investigar si este daño afectaba la migración celular, proceso crucial para las células epiteliales de pulmón. Por lo anterior, se realizaron ensayos de migración mediante el ensayo de la herida como se indica en la sección 5.5. La migración de las células epiteliales de pulmón expuestas a los tres tipos de ENM a concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas fue monitoreada a diferentes tiempos, 0 horas, 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas (Figura 10A, 11A y 12A). La cuantificación de la migración fue obtenida midiendo el área cubierta por las células con el programa ImageJ. Se observó que la migración de las células epiteliales de pulmón expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de SiO_2 comenzó a partir de las 6 horas a diferencia de las células expuestas a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ que la migración inicio a

las 12 horas (Figura 10B). Además, se observó que la migración a las 24 horas de las células expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ disminuyó en un 51.6%, 68% y 66.6% respectivamente (Figura 10B). Por otro lado, las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a NFs de TiO_2 a concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ la migración celular disminuyó a las 24 horas en un 8.8%, 44.2% y 44.9% respectivamente (Figura 11B). La migración de las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a NPs de ITO iniciaron la migración a las 6 horas y a las 24 horas la migración disminuyó en un 21.5%, 16.7% y 21.3% para las concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente (Figura 12B). Estos resultados sugieren que los diferentes tipos de ENM causan daño al citoesqueleto de actina teniendo como consecuencia una disminución en la migración.



B) Migración de células epiteliales de pulmón expuestas a SiO₂ NPs

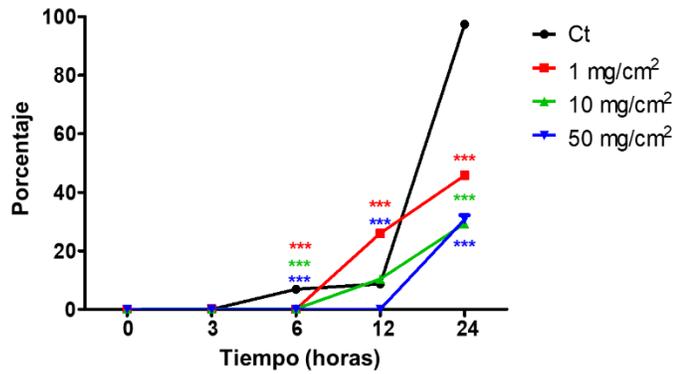
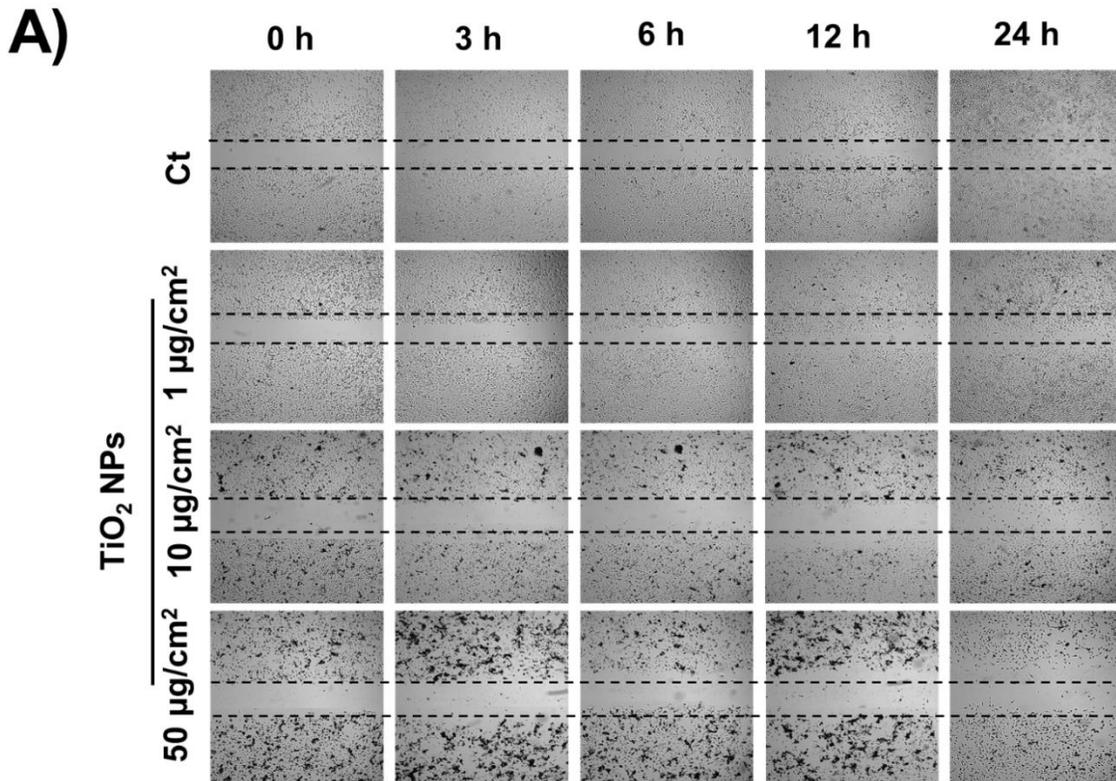


Figura 10. Migración de células expuestas a NPs de SiO₂. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a NPs de SiO₂ durante 24 horas donde se observó **A)** la migración celular, además, se realizó la **B)** cuantificación de la misma con ayuda del programa ImageJ. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media ± error estándar, ***p<0.001 vs control.



B)

Migración de células epiteliales de pulmón expuestas a TiO₂ NFs

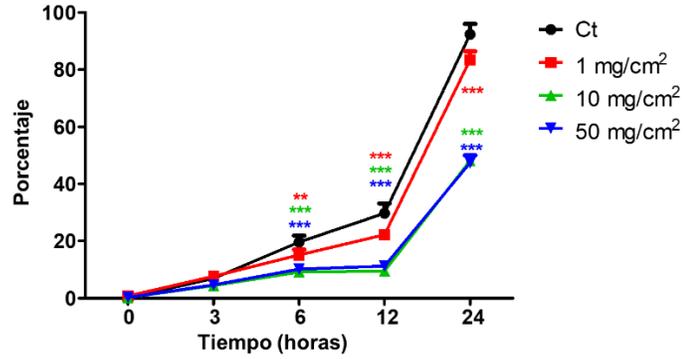
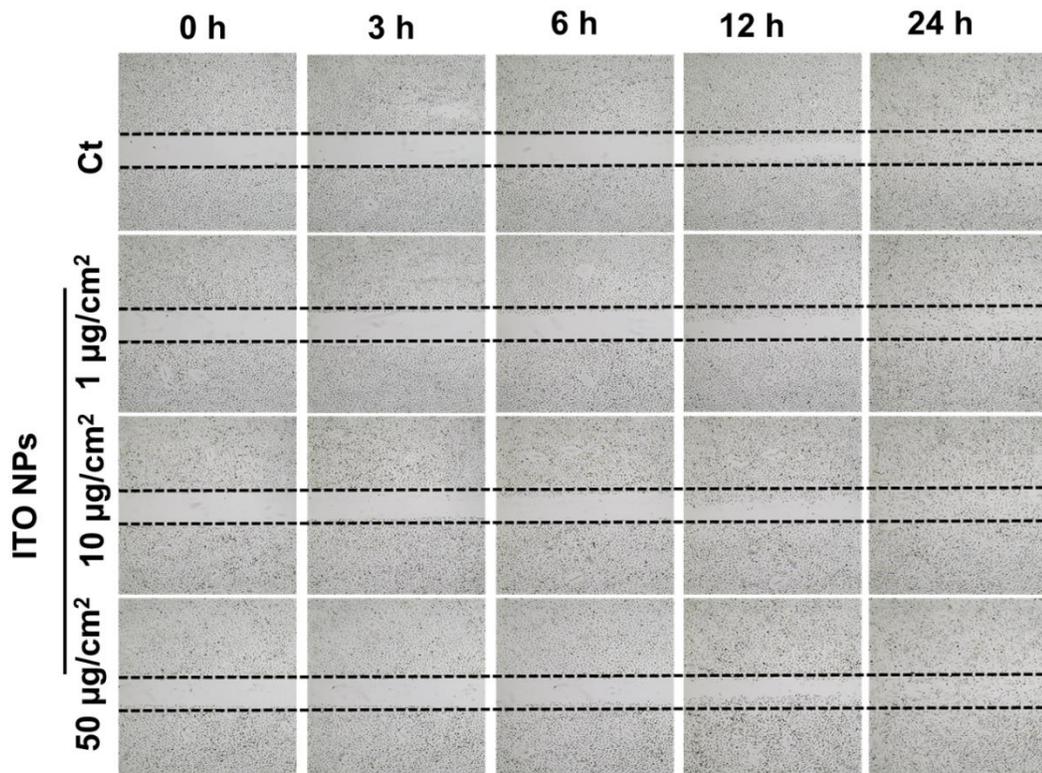


Figura 11. Migración de células expuestas a NFs de TiO₂. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a NPs de SiO₂ durante 24 horas donde se observó **A)** la migración celular, además, se realizó la **B)** cuantificación de la misma con ayuda del programa ImageJ. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar, ***p<0.001 vs control.

A)



B)

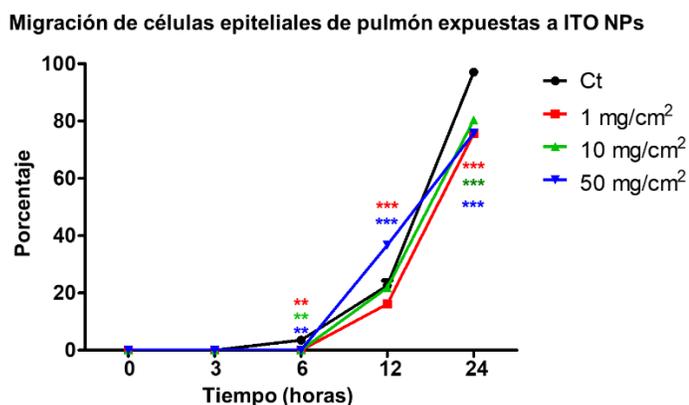


Figura 12. Migración de células expuestas a NPs de SiO₂. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a NPs de ITO durante 24 horas donde se observó **A)** la migración celular, además, se realizó la **B)** cuantificación de la misma con ayuda del programa ImageJ. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar, *** $p < 0.001$ vs control.

7.7 NFs de TiO₂ promueven el aumento de alteraciones moleculares del DNA, proteínas y lípidos en comparación con las NPs de SiO₂ e ITO.

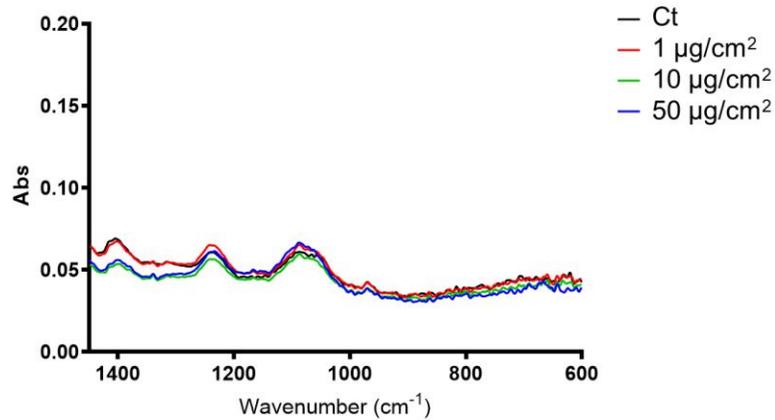
Los efectos de los ENM sobre el DNA, proteínas y lípidos de células epiteliales de pulmón fueron analizados mediante espectroscopia FTIR. La región del espectro para el DNA es de 600-1700 cm⁻¹, la región de las amidas I y II es de 1500-1700 cm⁻¹ que corresponde al espectro de las proteínas y el espectro que va de 2500-3000 cm⁻¹ para los lípidos. Los espectros específicos de los ácidos nucleicos considerados en este estudio fueron los estiramientos simétricos del PO₂⁻ en 1080 cm⁻¹ y los estiramientos asimétricos del PO₂⁻ en 1240 cm⁻¹ (Talari et al., 2017). Las NPs de SiO₂ a las concentraciones de 1 µg/cm² y 50 µg/cm² indujeron un ligero incremento en la absorbancia del espectro en 1080 cm⁻¹ que corresponde al estiramiento simétrico del PO₂⁻ y la concentración de 10 µg/cm² causó un ligero decremento en esta misma región (Figura 13Ai). Los espectros de la región en 1240 cm⁻¹ que corresponden a los estiramientos asimétricos del PO₂⁻ se observó un efecto similar, con la concentración de 1 µg/cm² se observó un incremento y con la concentración de 50 µg/cm² fue detectado un claro decremento. En la absorbancia del espectro en 1080 cm⁻¹ las NFs de TiO₂ a la concentración de 1 µg/cm² y 10

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ tuvieron un ligero decremento, sin embargo, el decremento fue mayor con la concentración de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 13Aii). Este mismo efecto se observó para la región de 1240 cm^{-1} . Para las NPs de ITO no se observaron cambios en la absorbancia (Figura 13Aiii). La región espectral de $1500\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ es la región de la amida I y la amida II que corresponden a los enlaces químicos relacionados a las estructuras secundarias de las proteínas (Talari et al., 2017). La región específica dentro de este espectro para la amida I es 1650 cm^{-1} que corresponden a los enlaces C=O y la región de 1546 cm^{-1} es para la amida II que está relacionada a las α -hélices, a los enlaces N-H y C-N relacionados también a las estructuras secundarias de las proteínas. Las NPs de SiO_2 a la concentración de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ causaron un incremento en la región de la amida I y II. Sin embargo, con las concentraciones de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ la absorbancia presentó un decremento (Figura 13Bi). Las NFs de TiO_2 causaron un decremento en las regiones de la amida I y II de manera concentración dependiente (Figura 13Bii). NPs de ITO promovió el aumento la absorbancia de las dos regiones de las amidas con la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 13Biii). La región del espectro que involucra los enlaces de los lípidos es de $2500\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$. En este estudio se consideraron las siguientes regiones del espectro: 2850 cm^{-1} asociado a los estiramientos simétricos de CH_2 de los lípidos, 2870 cm^{-1} para los estiramientos simétricos de CH_3 , 2920 cm^{-1} para estiramientos asimétricos y 2952 cm^{-1} para los estiramientos asimétricos de los lípidos (Talari et al., 2017). La exposición a NPs de SiO_2 causó un ligero incremento para las diferentes regiones mencionadas anteriormente con la concentración de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Sin embargo, para las concentraciones de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se observó un decremento en la absorbancia (Figura 13Ci). Los espectros de las células que fueron expuestas a NFs de TiO_2 a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ tuvieron un decremento para las cuatro regiones especificadas anteriormente (Figura 13Cii). Las NPs de ITO causaron un incremento en el espectro a la concentración de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las cuatro regiones del espectro, sin embargo, las concentraciones de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no causaron alteraciones (Figura 13Ciii).

A)

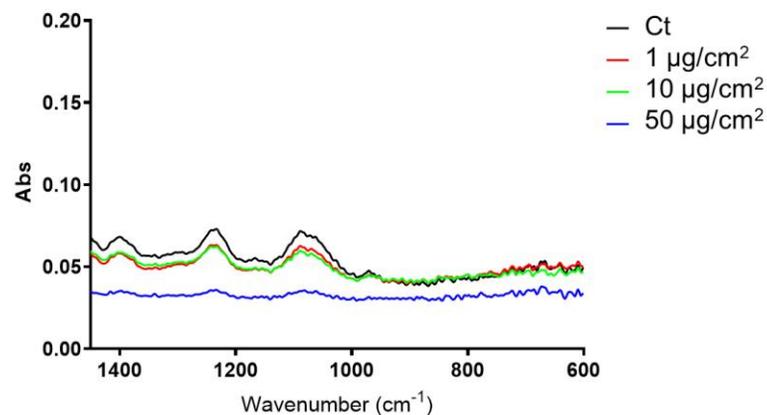
i

Región de DNA de células epiteliales de pulmón expuestas a SiO₂ NPs



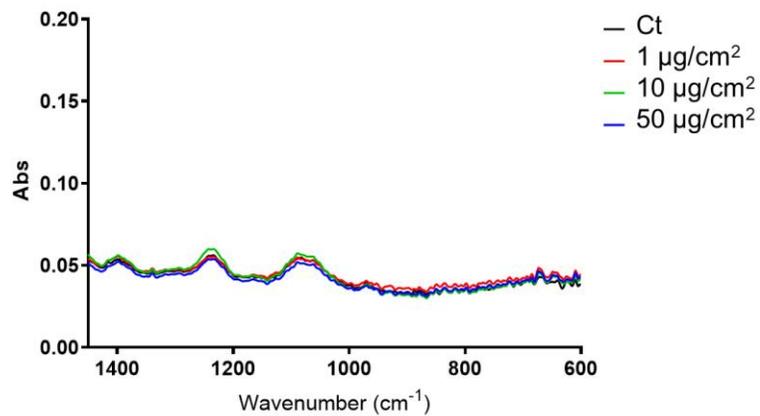
ii

Región de DNA de células epiteliales de pulmón expuestas a TiO₂ NFs

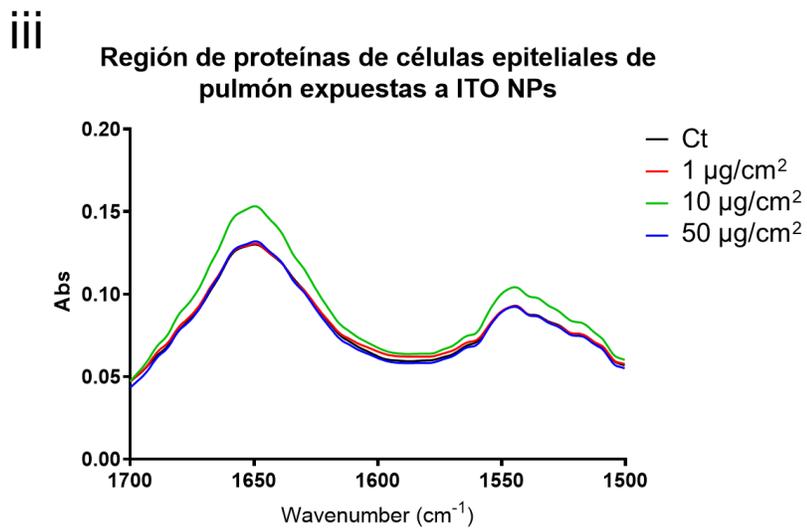
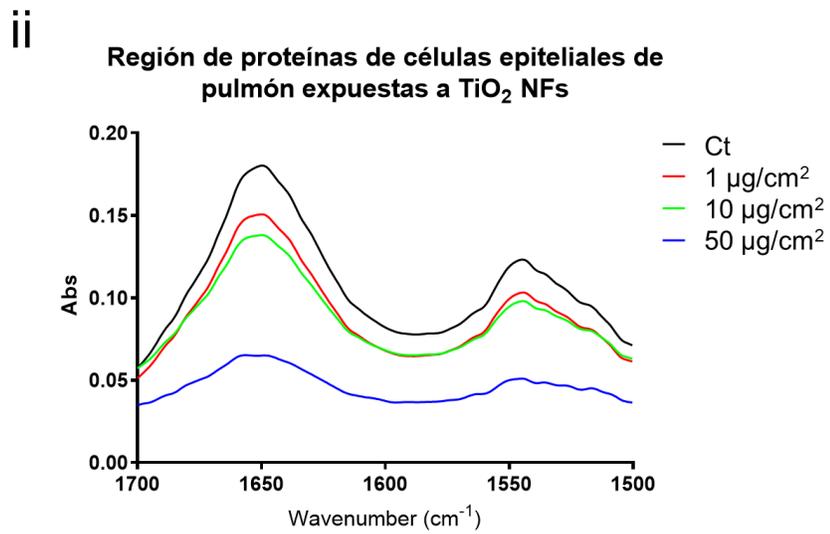
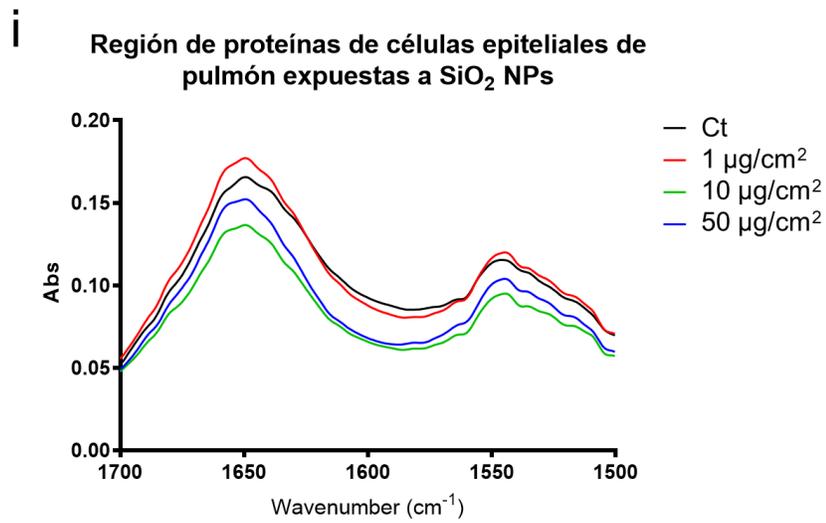


iii

Región de DNA de células epiteliales de pulmón expuestas a ITO NPs



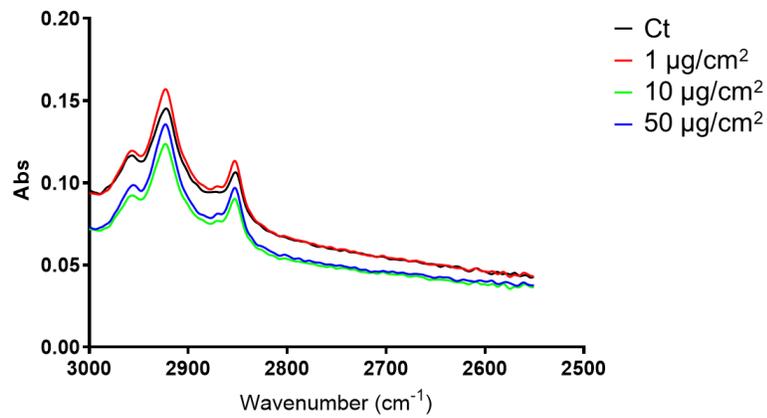
B)



C)

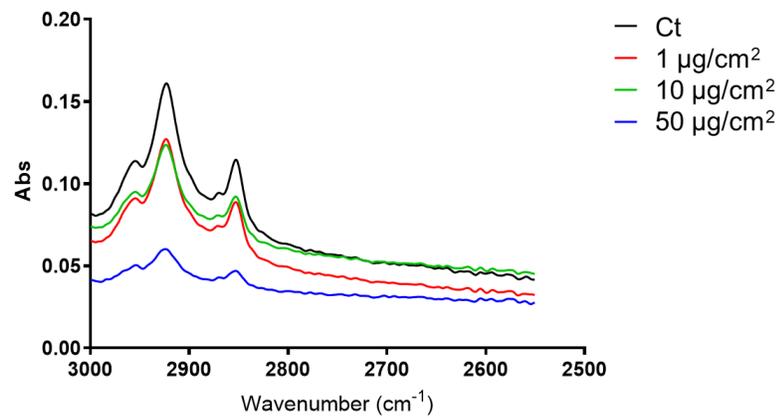
i

Región de lípidos de células epiteliales de pulmón expuestas a SiO₂ NPs



ii

Región de lípidos de células epiteliales de pulmón expuestas a TiO₂ NFs



iii

Región de lípidos de células epiteliales de pulmón expuestas a ITO NPs

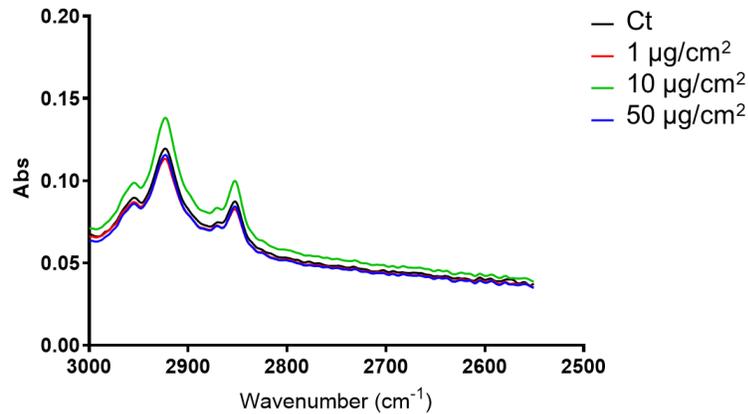


Figura 13. Huellas moleculares de DNA, proteínas y lípidos en células epiteliales de pulmón expuestas ENM. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas los diferentes tipos de ENM a concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas. Se analizaron los espectros del **A)** DNA, **B)** proteínas y **C)** lípidos.

8. Discusión

En este estudio se demostró que las NFs de TiO₂ causaron mayores efectos citotóxicos en comparación con las NPs de SiO₂ y NPs de ITO. Se decidió trabajar con estos tres tipos de ENM para comparar los efectos que pueden ocasionar debido a que NPs de SiO₂ y NPs de TiO₂ son las más producidas a nivel mundial y las NPs de ITO comienzan a producirse en elevadas cantidades por su alta demanda en el mercado, datos que se comentan en el capítulo 1 de esta tesis.

La principal vía de exposición a los ENM es la vía inhalatoria en los ambientes ocupacionales por lo que los pulmones son los principales afectados. Debido a esto, el presente estudio fue enfocado en conocer los efectos que ocasionan los ENM en células epiteliales de pulmón las cuales son las principales células en donde se acumulan dichos ENM. También se ha demostrado que el tamaño de los ENM influye en el depósito de los mismos en el tracto respiratorio. Por ejemplo, se sabe que NPs de TiO₂ con un tamaño de 1 nm se depositan en un 90% en la región nasofaríngea y un 10 % en la región traqueobronquial. Sin embargo, cuando las NPs de TiO₂ tienen un tamaño de 20 nm el 50% de las NPs son depositadas en la región alveolar (Simkó et al., 2010). Otro estudio indica que el 80% de NPs de oro con un tamaño de 20 nm es depositado en la región alveolar en ratas instiladas vía intratraqueal (Kreyling et al., 2018). Debido a esto es importante conocer el tamaño que los ENM forman cuando entran en contacto con los fluidos localizados dentro del cuerpo humano para poder predecir en donde pueden acumularse mayormente. Además, la principal vía de exposición es la vía inhalatoria por lo que los pulmones son los principales afectados.

Por lo anterior, en este estudio fueron analizados los efectos que tienen en células epiteliales de pulmón los ENM tales como NPs de SiO₂, NFs de TiO₂ y NPs de ITO las cuales tienen un tamaño de 20 nm, 1 μ m y >20 nm respectivamente, las cuales fueron caracterizadas sus propiedades fisicoquímicas como la forma, tamaño hidrodinámico y potencial zeta en el capítulo 1.

En este capítulo los ENM fueron analizados mediante FTIR para conocer sus huellas moleculares. La huella molecular de las NPs de SiO₂ se encontró dentro de la región de 600-1450 cm⁻¹, para las NFs de TiO₂ la región representativa del titanio

se localizó de 400-1200 cm^{-1} . Estos resultados corresponden de acuerdo con lo previamente reportado (Metin et al., 2011; Grassian et al., 2007). Para las NPs de ITO las regiones importantes fueron dos, para el SnO_2 localizado en la región 620 cm^{-1} y para el In_2O_3 localizado en la región 433-592 cm^{-1} (Felcia et al., 2017; Thirumoorthi et al., 2016).

En este estudio observamos que la viabilidad de las células epiteliales de pulmón fue mayormente afectada por las NFs de TiO_2 en comparación con las NPs de SiO_2 y las NPs de ITO. Estos efectos coinciden con estudios previos que han demostrado que las NPs de SiO_2 no inducen cambios en la viabilidad celular (Voicu et al., 2019). La elevada toxicidad inducida por las NFs de TiO_2 que observamos se esperaba debido a la forma de fibras las cuales se ha reportado tienen una elevada toxicidad en comparación con las NPs amorfas (Vranic et al., 2017; Tilton et al., 2014; Allegri et al., 2016; Hamilton et al., 2009). Por otro lado, la toxicidad de las NPs de ITO es incierta. Sin embargo, existe un reporte en donde se ha demostrado un decremento en la viabilidad celular en células epiteliales de pulmón determinado mediante WST-1 el cual es un método similar a la reducción de MTT (Tabei et al., 2016).

Por otro lado, se analizó la granularidad y el tamaño de las células epiteliales de pulmón y si estos parámetros morfológicos de las células eran alterados por los ENM usados en este estudio. Los resultados obtenidos mostraron que nuevamente las NFs de TiO_2 afectaron la granularidad y el tamaño de las células epiteliales de pulmón. Esto puede deberse a la captación de los ENM la cual se logra por las características fisicoquímicas de las NPs. Se ha reportado que la granularidad de macrófagos aumenta cuando son expuestos a NPs de cobre el cual se atribuye a la cantidad acumulada de NPs dentro de los macrófagos (Das et al., 2019).

Debido a que se observaron cambios en el tamaño celular decidimos investigar si el citoesqueleto era afectado por los ENM, ya que es el organelo que da estructura y soporte a las células. En este estudio nos enfocamos principalmente en analizar la integridad del citoesqueleto de actina debido a que es el principal componente encargado de dar estructura y forma a las células (Brückner et al., 2019). Los resultados obtenidos mostraron que NPs de SiO_2 , NFs de TiO_2 y NPs de ITO

disminuyeron la cantidad de microfilamentos formados por la proteína actina de manera concentración dependiente.

Las alteraciones del citoesqueleto encontradas en este estudio son similares con estudios previos en donde las NPs tienen la capacidad de inducir alteraciones sobre el citoesqueleto de actina y tubulina en diferentes tipos celulares como células endoteliales, fibroblastos, células inmunes, células madre y adipocitos (Ispanixtlahuatl-Meráz et al. 2017).

Sin embargo, la pregunta siguiente que debe de abordarse es si la arquitectura del citoesqueleto de las células expuestas a ENM se puede recuperar durante una exposición aguda y si la despolimerización del citoesqueleto puede provocar alteraciones en la fisiología celular como la fagocitosis o el tráfico vesicular.

Los efectos que causan los ENM al citoesqueleto pueden conducir a alteraciones en las fases del ciclo celular. Debido a esto, fueron analizadas las fases G1, S y G2/M de las células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes tipos de ENM encontrando que fueron alteradas la distribución de la fase G1 y G2/M. Sin embargo, no se encontraron alteraciones en la fase S.

La disminución en la fase G1 acompañada del aumento de la fase G2/M podría explicarse por la activación de los checkpoints del daño al DNA en la fase G1 y la activación de la mitosis a través de la acumulación de la fase G2 (Murray et al., 2018). Efectos similares sobre el ciclo celular han sido reportados con otros tipos de ENM. Por ejemplo, el óxido de aluminio altera la progresión del ciclo celular con la sobrerregulación de los genes EGR1, E2F1 y CCND1 los cuales están involucrados en el ciclo celular en células mesenquimales (Periasamy et al., 2016).

Además, se han realizado estudios que concuerdan con los resultados obtenidos en donde NPs de óxido de níquel inducen un decremento en la fase G1 del ciclo celular de células A549 y células BEAS-2B, sin embargo, también hubo un aumento en la fase G2/M en las células A549 y un decremento de esta fase en las células BEAS-2B. Esto puede ser explicado por la diferencia en la respuesta al daño al DNA entre las líneas celulares y también señala que las NPs tienen un efecto en la regulación del ciclo celular (Capasso et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente el daño al citoesqueleto puede tener efectos sobre la migración celular. Por lo que se realizaron ensayos de migración con células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes tipos de ENM.

Los resultados mostraron un decremento en la migración celular principalmente con la exposición de las NPs de SiO₂ y las NFs de TiO₂. Sin embargo, NPs de ITO decrementó la migración de las células epiteliales de pulmón en menor proporción en comparación con las NPs de SiO₂ y NFs de TiO₂. Estos resultados sugieren que la alteración del citoesqueleto no impacta directamente sobre la migración celular debido a que se observó que las NPs de ITO disminuyeron la cantidad de actina presente en las células de la misma manera que lo hacen las NPs de SiO₂ y NFs de TiO₂ pero tienen un impacto limitado sobre la migración. Estos resultados son similares con la literatura en donde NPs de SiO₂ inducen un decremento en la migración celular efecto que fue explicado por la interferencia física entre las NPs de SiO₂ y el proceso de polimerización y despolimerización del citoesqueleto de tubulina (Gonzalez et al., 2015).

Finalmente fueron evaluados los efectos de los ENM sobre el DNA, proteínas y lípidos de células epiteliales de pulmón mediante espectroscopía FTIR analizando las regiones del espectro correspondientes a dichas biomoléculas. Las alteraciones sobre las huellas moleculares evaluadas mediante FTIR son consistentes con estudios previos que reportan un mayor efecto en fibroblastos de humano expuestos NPs de TiO₂ usando NPs con un tamaño de 20 nm (Zhang et al., 2011). Las alteraciones a nivel molecular podrían ser atribuida a la producción de ROS por los ENM. Se sabe que las NFs de TiO₂ producen ROS y que las NPs de SiO₂ causan citotoxicidad y apoptosis en células epiteliales de pulmón humano a través de la producción de ROS (Ahamed, 2013; Voicu et al., 2015).

Los cambios observados en las regiones del espectro para las proteínas, 1500-1700cm⁻¹, de células epiteliales de pulmón expuestas a NFs de TiO₂ son consistentes con los cambios en el citoesqueleto de actina previamente estudiados con NPs de TiO₂ (Mao et al., 2015) afectando también el ciclo y la migración celular resultados demostrados en este trabajo.

9. Conclusiones

- Las NFs de TiO₂ causaron mayor citotoxicidad disminuyendo la viabilidad de las células epiteliales de pulmón con las tres concentraciones utilizadas en comparación con las NPs de SiO₂ y NPs de ITO.
- Las NFs de TiO₂ incrementaron la granularidad y disminuyeron el tamaño de células epiteliales de pulmón, seguido por las NPs de ITO y las NPs de SiO₂.
- Los ENM causaron alteraciones en el citoesqueleto de actina de células epiteliales de pulmón disminuyendo el número de filamentos con las tres concentraciones utilizadas.
- Las fases del ciclo celular fueron alteradas por las NFs de TiO₂ causando en la población celular un decremento en la fase G1 y un aumento en la fase G2/M. Las NPs de ITO causaron alteraciones en la fase G1 y G2/M con la concentración más elevada y las NPs de SiO₂ solo alteraron la fase G1 a la concentración más elevada.
- Las NPs de SiO₂ causaron mayor alteración en la migración celular 24 horas posteriores a la exposición de dichas NPs seguido por las NFs de TiO₂ y las NPs de ITO.
- Las NFs de TiO₂ causaron mayor daño en las proteínas, DNA y lípidos seguido por las NPs de SiO₂ e ITO de las células epiteliales de pulmón.
- En general las NFs de TiO₂ causaron mayor citotoxicidad seguido por las NPs de SiO₂ que causaron un grado intermedio de alteraciones y las NPs de ITO tuvieron efectos celulares y moleculares limitados. Esto puede deberse a la morfología de las NPs utilizadas en este estudio en donde se demuestra que la forma de fibras tiene mayor efecto citotóxico en comparación con formas amorfas influyendo también el componente del que estén hechas las NPs.

10. Referencias

- Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang GM, Choi HY, Cho SG. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1). pii: E120.
- Adjei IM, Sharma B, Labhasetwar V. Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* 2014;811:73-91.
- Ahamed M. Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(2):186-95.
- Allegri M, Bianchi MG, Chiu M, Varet J, Costa AL, Ortelli S, Blosi M, Bussolati O, Poland CA, Bergamaschi E. Shape-Related Toxicity of Titanium Dioxide Nanofibres. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151365.
- Anderson CR, Gnopo YDM, Gambinossi F, Mylon SE, Ferri JK. Modulation of cell responses to Ag-(MeO₂ MA-co-OEGMA): Effects of nanoparticle surface hydrophobicity and serum proteins on cellular uptake and toxicity. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106(4):1061-1071.
- Bengalli R, Ortelli S, Blosi M, Costa A, Mantecca P, Fiandra L. In Vitro Toxicity of TiO₂:SiO₂ Nanocomposites with Different Photocatalytic Properties. *Nanomaterials (Basel).* 2019;9(7). pii: E1041.
- Brückner BR, Nöding H, Skamrahl M, Janshoff A. Mechanical and morphological response of confluent epithelial cell layers to reinforcement and dissolution of the F-actin cytoskeleton. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019;144:77-90.
- Cascione M, De Matteis V, Mandriota G, Leporatti S, Rinaldi R. Acute Cytotoxic Effects on Morphology and Mechanical Behavior in MCF-7 Induced by TiO₂NPs Exposure. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14). pii: E3594.
- Cleary RA, Wang R, Waqar O, Singer HA, Tang DD. Role of c-Abl tyrosine kinase in smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;306(8):C753-61.
- Dai L, Zhao T, Bisteau X, Sun W, Prabhu N, Lim YT, Sobota RM, Kaldis P, Nordlund P. Modulation of Protein-Interaction States through the Cell Cycle. *Cell.* 2018;173(6):1481-1494.e13.
- Das BK, Verma SK, Das T, Panda PK, Parashar K, Suar M, Parashar SKS. Altered electrical properties with controlled copper doping in ZnO nanoparticles infers their cytotoxicity in macrophages by ROS induction and apoptosis. *Chem Biol Interact.* 2019;297:141-154.
- Felcia E B, Gnanam K D. Synthesis and characterization of SnO₂ nanoparticle by microwave assisted hydrothermal method. *J. Appl. Phys.* 2017; 98-104.

- Gaillard JC, Rabilloud T, Armengaud J, Carriere M. Titanium Dioxide Nanoparticles Alter the Cellular Phosphoproteome in A549 Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(2). In press.
- Gao X, Wang Y, Peng S, Yue B, Fan C, Chen W, Li X. Comparative toxicities of bismuth oxybromide and titanium dioxide exposure on human skin keratinocyte cells. *Chemosphere*. 2015 Sep;135:83-93.
- Geiser M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2010;23(4):207-17.
- Gerthoffer WT. Migration of airway smooth muscle cells. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(1):97-105.
- Gonzalez L, De Santis Puzzon M, Ricci R, Aureli F, Guarguaglini G, Cubadda F, Leyns L, Cundari E, Kirsch-Volders M. Amorphous silica nanoparticles alter microtubule dynamics and cell migration. *Nanotoxicology*. 2015;9(6):729-36.
- Grassian VH, O'shaughnessy PT, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, Thorne PS. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect*. 2007;115(3):397-402.
- 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; 31;6:35.
- Hembram KC, Chatterjee S, Sethy C, Nayak D, Pradhan R, Molla S, Bindhani BK, Kundu CN. Comparative and Mechanistic Study on the Anticancer Activity of Quinacrine-Based Silver and Gold Hybrid Nanoparticles in Head and Neck Cancer. *Mol Pharm*. 2019;16(7):3011-3023.
- Huang YW, Cambre M, Lee HJ. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 13;18(12). pii: E2702
- Ispanixtlahuatl-Meráz O, Schins R.P.F, Chirino YI. Cell type specific cytoskeleton disruption induced by engineered nanoparticles. *Environ Sci Nano*. 2018; 5, 228-245.
- Iversen TG, Skotland T, & Sandvig K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*. 2011 6(2), 176-185.
- Kabirian-Dehkordi S, Chalabi-Dchar M, Mertani HC, Le Guellec D, Verrier B, Diaz JJ, Mehrgardi MA, Bouvet P. AS1411-conjugated gold nanoparticles affect cell proliferation through a mechanism that seems independent of nucleolin. *Nanomedicine*. 2019;21:102060.

- Kansara K, Patel P, Shah D, Shukla RK, Singh S, Kumar A, Dhawan A. TiO₂ nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(2):204-17.
- Kasai H, Takahashi N, Tokumaru H. Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol Rev*. 2012; 92(4):1915-64.
- Kolodziejczyk A, Jakubowska A, Kucinska M, Wasiak T, Komorowski , Makowski K, Walkowiak B. Sensing of silver nanoparticles on/in endothelial cells using atomic force spectroscopy. *J Mol Recognit*. 2018;31(9):e2723.
- Kreyling WG, Möller W, Holzwarth U, Hirn S, Wenk A, Schleh C, Schäffler M, Haberl N, Gibson N, Schittny JC. Age-Dependent Rat Lung Deposition Patterns of Inhaled 20 Nanometer Gold Nanoparticles and their Quantitative Biokinetics in Adult Rats. *ACS Nano*. 2018;12(8):7771-7790.
- Liu J, Kang Y, Yin S, Song B, Wei L, Chen L, Shao L. Zinc oxide nanoparticles induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size-dependent manner. *Int J Nanomedicine*. 2017 Nov 1;12:8085-8099.
- Luo C, Li Y, Yang L, Zheng Y, Long J, Jia J, Xiao S, Liu J. Activation of Erk and p53 regulates copper oxide nanoparticle-induced cytotoxicity in keratinocytes and fibroblasts. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4763-72.
- Mao Z, Xu B, Ji X, Zhou K, Zhang X, Chen M, Han X, Tang Q, Wang X, Xia Y. Titanium dioxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the microtubule dynamics. *Nanoscale*. 2015;7(18):8466-75.
- Metin CO, Lake LW, Miranda CR, Nguyen QP. Stability of aqueous silica nanoparticle dispersions. *J Nanopart Res*. 2011;13(2):839-850.
- Murray JM, Carr AM. Integrating DNA damage repair with the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*. 2018;52:120-125.
- Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. 2014;9 Suppl 1(Suppl 1):51-63.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*. 2001;3(5):473-83.
- Periasamy VS, Athinarayanan J, Alshatwi AA. Aluminum oxide nanoparticles alter cell cycle progression through CCND1 and EGR1 gene expression in human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016;63(3):320-7.
- Petrache Voicu SN, Dinu D, Sima C, Hermenean A, Ardelean A, Codrici E, Stan MS, Zărnescu O, Dinischiotu A. Silica Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Autophagy but Not Apoptosis in the MRC-5 Cell Line. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):29398-416.

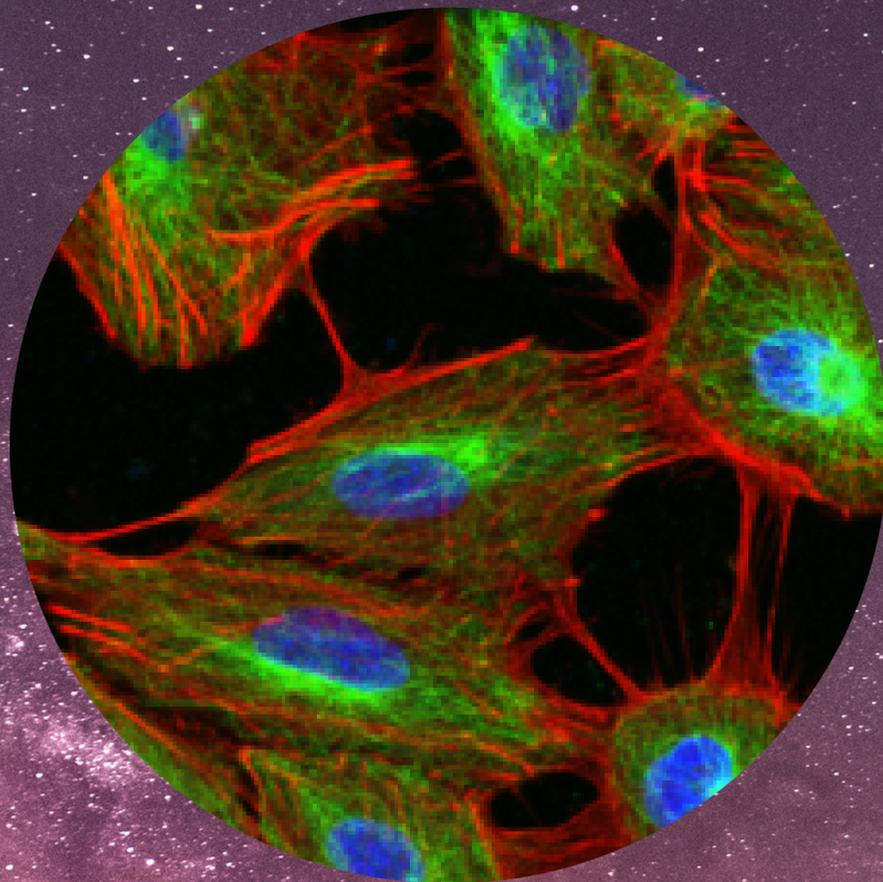
- Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*. 2009 Nov 27;326(5957):1208-12.
- Ponce A. Nanomaterials and workplace health & safety. What are the issues for workers? European Trade Union Institute. 2013. ISBN 978-2-87452-288-8.
- Poon RY. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods Mol Biol*. 2016;1342:3-19.
- RCEP (Royal Commission on Environmental Pollution). Novel materials in the environment: The case of nanotechnology. 2008. Disponible en www.rcep.org.uk.
- Saifi, MA, Khan W, Godugu C. Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles. *Pharm Nanotechnol*. 2018;6(1), 3-16.
- Shahhoseini E, Feltis BN, Nakayama M, Piva TJ, Pouniotis D, Alghamdi SS, Geso M. Combined Effects of Gold Nanoparticles and Ionizing Radiation on Human Prostate and Lung Cancer Cell Migration. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 11;20(18). pii: E4488.
- Simkó M, Mattsson MO. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7:42.
- Singh D, Singh S, Sahu J, Srivastava S, Singh MR. Ceramic nanoparticles: Recompense, cellular uptake and toxicity concerns. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016;44(1):401-9.
- Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:509-47.
- Svitkina T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(1). pii: a018267.
- Tabei Y, Sonoda A, Nakajima Y, Biju V, Makita Y, Yoshida Y, Horie M. Intracellular accumulation of indium ions released from nanoparticles induces oxidative stress, proinflammatory response and DNA damage. *J Biochem*. 2016;159(2):225-37.
- Tabei Y, Sonoda A, Nakajima Y, Biju V, Makita Y, Yoshida Y, Horie M. In vitro evaluation of the cellular effect of indium tin oxide nanoparticles using the human lung adenocarcinoma A549 cells. *Metallomics*. 2015;7(5):816-27.
- Talari, A. C. S., Martinez, M. A. G., Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2017;52 (5): 456-506.

- Thirumoorthi M, Thomas Joseph Prakash J. Structure, optical and electrical properties of indium tin oxide ultra thin films prepared by jet nebulizer spray pyrolysis technique. *Journal of Asian Ceramic Societies*. 2016;4(1), 124-132.
- 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.
- Tolliver LM, Holl NJ, Hou FYS, Lee HJ, Cambre MH, Huang YW. Differential Cytotoxicity Induced by Transition Metal Oxide Nanoparticles is a Function of Cell Killing and Suppression of Cell Proliferation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5). pii: E1731.
- Tomatis M, Turci F, Ceschino R, Riganti C, Gazzano E, Martra G, Ghigo D, Fubini B. High aspect ratio materials: role of surface chemistry vs. length in the historical "long and short amosite asbestos fibers". *Inhal Toxicol*. 2010;22(12):984-98.
- Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005; 14(2):125-31.
- Nakayama M. Macrophage Recognition of Crystals and Nanoparticles. *Front Immunol*. 2018;29:103.
- Vazquez-Zapien GJ, Mata-Miranda MM, Sanchez-Monroy V, Delgado-Macuil RJ, Perez-Ishiwara DG, Rojas-Lopez M. FTIR Spectroscopic and Molecular Analysis during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6709714.
- Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S, Perdicularis S, Valavanidis A. Potential toxicity and safety evaluation of nanomaterials for the respiratory system and lung cancer. *Lung Cancer (Auckl)*. 2013;4:71-82.
- Voicu SN, Balas M, Stan MS, Trică B, Serban AI, Stanca L, Hermenean A, Dinischiotu A. Amorphous Silica Nanoparticles Obtained by Laser Ablation Induce Inflammatory Response in Human Lung Fibroblasts. *Materials (Basel)*. 2019;12(7). pii: E1026.
- Vranic S, Gosens I, Jacobsen NR, Jensen KA, Bokkers B, Kermanizadeh A, Stone V, Baeza-Squiban A, Cassee FR, Tran L, Boland S. Impact of serum as a dispersion agent for in vitro and in vivo toxicological assessments of TiO₂ nanoparticles. *Arch Toxicol*.;91(1):353-363.
- Wang B, Chen D, Guo W, Li Z, Li Y, Zhou X, Huang P, Sun Z. Silica nanoparticles suppress fibronectin-mediated adhesion and migration in normal human keratinocytes. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012;12(1):293-9.

- Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:301-331.
- Wu T, Zhang S, Liang X, He K, Wei T, Wang Y, Zou L, Zhang T, Xue Y, Tang M. The apoptosis induced by silica nanoparticle through endoplasmic reticulum stress response in human pulmonary alveolar epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2019;56:126-132.
- Wu Y, Ali MRK, Dong B, Han T, Chen K, Chen J, Tang Y, Fang N, Wang F, El-Sayed MA. Gold Nanorod Photothermal Therapy Alters Cell Junctions and Actin Network in Inhibiting Cancer Cell Collective Migration. *ACS Nano*. 2018;12(9):9279-9290.
- Yang L, Lee YC, Kim MI, Park HG, Huh YS, Shao Y, Han HK. Biodistribution and clearance of aminoclay nanoparticles: implication for in vivo applicability as a tailor-made drug delivery carrier. *J Mater Chem B*. 2014;2(43):7567-7574.
- Yang Y, Du X, Wang Q, Liu J, Zhang E, Sai L, Peng C, Lavin MF, Yeo AJ, Yang X, Shao H, Du Z. Mechanism of cell death induced by silica nanoparticles in hepatocyte cells is by apoptosis. *Int J Mol Med*. 2019 Sep;44(3):903-912.
- Young KD. The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(3):660-703.
- Zhang XQ, Yin LH, Tang M, Pu YP. ZnO, TiO₂, SiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts. *Biomed Environ Sci*. 2011;24(6):661-9.

CAPÍTULO 3

LAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO AFECTAN LA RED DEL CITOESQUELETO DISMINUYENDO EL NÚMERO DE SUS ESTRUCTURAS DE MANERA IRREVERSIBLE



Citoesqueleto de tubulina (verde) y actina (rojo) de células epiteliales de pulmón. (Déciga-Alcaraz et al., 2020).

“La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable.”

— Leonard Da Vinci

Índice de figuras

Figura 1. Componentes del citoesqueleto.

Figura 2. Diseño experimental.

Figura 3. Morfología de NPs de TiO₂.

Figura 4. Internalización de NPs de TiO₂ en células epiteliales de pulmón.

Figura 5. Viabilidad celular de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂.

Figura 6. Despolimerización de tubulina y actina en células epiteliales de pulmón.

Figura 7. Expresión de tubulina y actina de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂.

Figura 8. Decremento en el tamaño celular e incremento en la granularidad de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂.

Figura 9. Decremento de la migración celular después de la exposición a NPs de TiO₂.

Figura 10. Las NPs de TiO₂ afectan la expresión de Ki67 y SFTPB sin alterar la expresión de MMP2.

Resumen

La exposición a las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs de TiO₂) inducen diferentes alteraciones celulares que sugieren cambios en la organización del citoesqueleto. Una vez que las NPs de TiO₂ son internadas por las células la desorganización del citoesqueleto es la principal alteración observada, sin embargo, el citoesqueleto no es considerado como un marcador de daño celular. En esta tercera parte de la investigación se tuvo como objetivo investigar las alteraciones del citoesqueleto y el impacto que tiene sobre la migración celular inducida por una exposición aguda (24 horas) a NPs de TiO₂ y la capacidad que tiene de recuperarse después de 6 días libres de NPs de TiO₂ modelo que permite saber si el daño al citoesqueleto es reversible. Para responder lo anterior se utilizaron células epiteliales de pulmón las cuales fueron expuestas a 1 µg/cm² y 10 µg/cm². Los resultados obtenidos indicaron que la exposición a NPs de TiO₂ durante 24 horas, 24 horas y 6 días libres de NPs y 7 días inducen un decremento en la polimerización en la tubulina y actina. Además, como consecuencia a la despolimerización de tubulina y actina la migración celular disminuyó con la exposición a NPs de TiO₂ durante 24 horas y 6 días libres de NPs al igual que la exposición prolongada de 7 días. Por otro lado, se evaluó la expresión de genes que están relacionados con las funciones primordiales de las células epiteliales de pulmón como Ki67, proteína surfactante B (SFTPB) y la matriz metaloproteasa 2 (MMP2). Los resultados mostraron que Ki67 es sobreexpresado en células expuestas durante 24 horas a la concentración más alta, mientras que las células expuestas durante 24 horas y 6 días libres de NPs Ki67 es subexpresado. La expresión de la proteína SFTPB es subexpresada en células expuestas durante 24 horas y 7 días. Sin embargo, la expresión de MMP2 se mantuvo sin cambios para los tres tratamientos. En conclusión, la exposición a NPs de TiO₂ afecta el citoesqueleto disminuyendo el número de microfilamentos y microtúbulos de las células epiteliales de cáncer de pulmón de la línea A549 de manera irreversible, sin embargo, este daño no es acumulativo.

1. Introducción

Las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs de TiO_2) son las más producidas a nivel mundial (Garduño-Balderas et al., 2015) debido a su amplio espectro de aplicaciones las cuales incluyen cosméticos, alimentos, farmacéuticos, purificadores de agua y almacenadores de energía. Según U.S Geological Survey pronostica que el consumo mundial de TiO_2 aumentará un 4% por año hasta el 2025.

Además, el TiO_2 ha sido clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en el grupo 2B como posible carcinógeno para humanos y como potencial carcinógeno ocupacional por el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH).

Los humanos están expuestos a las NPs de TiO_2 por diferentes rutas tales como la vía oral, mediante el contacto dermal y mediante inhalación (Oberdörster et al., 2005). La inhalación de las NPs de TiO_2 es la principal vía de exposición en ambientes ocupacionales siendo como consecuencia el tracto respiratorio el principal afectado (Zhang et al., 2015).

Las NPs de TiO_2 pueden alcanzar la región alveolar y ser depositadas en células epiteliales alveolares (Warheit et al., 2015). El mecanismo de la toxicidad celular involucra al estrés oxidante, daño a DNA y a las respuestas inflamatorias entre otras. Sin embargo, algunas otras alteraciones celulares han sido poco estudiadas. Por ejemplo, el daño estructural no es considerado como un marcador de citotoxicidad, pero la desorganización del citoesqueleto es uno de los mecanismos de daño celular causado por la internalización de óxidos metálicos, nanopartículas orgánicas y con base de carbón en células epiteliales y endoteliales, fibroblastos, adipocitos, células inmunes, células cerebrales y células madre (Ispanixtlahuatl-Meráz et al, 2018). Entre estos tipos celulares las células epiteliales de pulmón son uno de los principales blancos por la exposición inhalatoria.

La desorganización del citoesqueleto inducida por las NPs de TiO_2 no está del todo elucidada en tejidos de pulmón, sin embargo, existe evidencia de la desregulación de genes en células bronquiales (Thai et al., 2015), alteraciones relacionadas al citoesqueleto en pulmones de ratón (Li et al., 2013), desregulación de la expresión

de alfa actina en fibroblastos de ratón (Armand et al., 2013) y el decremento en la tubulina y actina en macrófagos humanos (Sund et al., 2014).

El citoesqueleto es la principal estructura celular mecánica que comprende a una red de microtúbulos (tubulina), filamentos intermedios (vimentina) y microfilamentos (actina) los cuales son importantes para la morfología celular (Paluch & Heisenberg, 2009) división celular (Forth & Kapoor, et al 2017), uniones adherentes (van Buul & Timmerman, 2016) y la migración celular (Sun & Zaman, 2017; Tang & Gerlach, 2017).

La migración celular es necesaria para la reparación de tejidos en células alveolares de tipo II en el pulmón y depende en parte de la arquitectura del citoesqueleto (Flozak et al., 2010). Sin embargo, no todas las NPs tienen influencia sobre la red del citoesqueleto como las Prussian blue NPs que no tienen efecto sobre la migración de células mesenquimales (Wen et al., 2018). Sin embargo, se ha demostrado también que las NPs de oro inducen desorganización del citoesqueleto de actina y decrementan la migración celular un 35% en células cervicales de cáncer (Wu et al., 2018).

También se ha demostrado que NPs de fullereno inducen un decremento en la expresión de F-actina, además, de disminuir la migración entre un 20-40% en células de mama MDA-MB-231 (Qin et al., 2018). Por otro lado, NPs de oro retardan la migración en células cancerosas de mama MCF-7 (Pitchaimani et al., 2017).

Para propósitos de la nanomedicina algunas alteraciones inducidas por las NPs tienen aplicaciones para el tratamiento del cáncer especialmente para los tipos de tumores con gran capacidad de migración que conducen a la metástasis. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en términos de exposición inhalatoria, la desorganización del citoesqueleto y la disminución de la migración celular causada por la inhalación de NPs en ambientes ocupacionales podrían tener un impacto en la homeostasis de los tejidos y la reparación pulmonar. El citoesqueleto es una red estable que sufre desorganizaciones irreversibles en condiciones celulares graves, como la apoptosis (Povea-Cabello et al., 2017).

Por otro lado, las alteraciones del citoesqueleto podrían tener un impacto en las funciones celulares como en la expresión de genes involucrados en la proliferación celular como Ki67, en la producción de la proteína surfactante encargada de dar tensión a los pulmones como la proteína surfactante B (SFTPB) y la metaloproteasa 2 (MMP2) encargada de la homeostasis de la matriz extracelular y transducción de señales.

Sin embargo, todos los estudios que se han publicado hasta ahora han demostrado que la exposición a NPs de TiO₂ podría desregular la expresión de las proteínas del citoesqueleto (Chézeau et al., 2019) e inducir la despolimerización después de 24 horas de exposición en otros tipos celulares, pero no se ha demostrado si las células se recuperan de estas alteraciones. Esto es importante debido a que las células que sean expuestas a NPs de TiO₂ podrán tener un desarreglo del citoesqueleto y disminuir la capacidad de migración para enfrentar las infecciones respiratorias y poder reparar el daño pulmonar.

1.2 Citoesqueleto

Los organismos que se encuentran en los tres dominios, Archea, Bacteria y Eukarya, dependen de proteínas poliméricas para formar un citoesqueleto el cual les ayuda a establecer sus formas, mantener su integridad mecánica, dividirse y en muchos casos también ayuda a la movilidad. Los eucariontes tienen los citoesqueletos más complejos que están formados por filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos.

Los filamentos de actina están concentrados en la periferia de la célula en la corteza subyacente a la membrana plasmática en paquetes llamados fibras de estrés las cuales están ancladas a los sitios de adhesión de la membrana plasmática (Svitkina T., 2018). Los filamentos de actina también conocidos como microfilamentos son polímeros de la proteína actina y son estructuras flexibles con un diámetro de aproximadamente 7 nm los cuales se organizan en paquetes lineales, redes bidimensionales y geles tridimensionales (Figura 1A).

Los filamentos intermedios forman una red compleja concentrada en la región perinuclear lugar de donde se extienden hacia la superficie celular, donde se encuentran anclados a uniones intercelulares llamadas desmosomas y las uniones célula-matriz extracelular llamadas hemidesmosomas (Jones et al., 2017). Los filamentos intermedios son fibras en forma de cuerda con un diámetro de aproximadamente 10 nm. Los filamentos intermedios son muy flexibles y tienen gran resistencia a la fuerza de tracción, esta estructura puede deformarse con el estrés mecánico de las células, pero no se rompe (Figura 1B)

Los microtúbulos son las estructuras más grandes del citoesqueleto los cuales forman una red que va desde el centrosoma o centro organizador de microtúbulos hasta la membrana de la célula. Los microtúbulos son cilindros huecos hechos de la proteína tubulina. Los microtúbulos son largos y rectos normalmente tienen un extremo conectado a un solo centro organizador de microtúbulos llamado centrosoma y tienen un diámetro de 25 nm. Los microtúbulos son más rígidos que los filamentos de actina y pueden romperse cuando son estirados (Figura 1C).

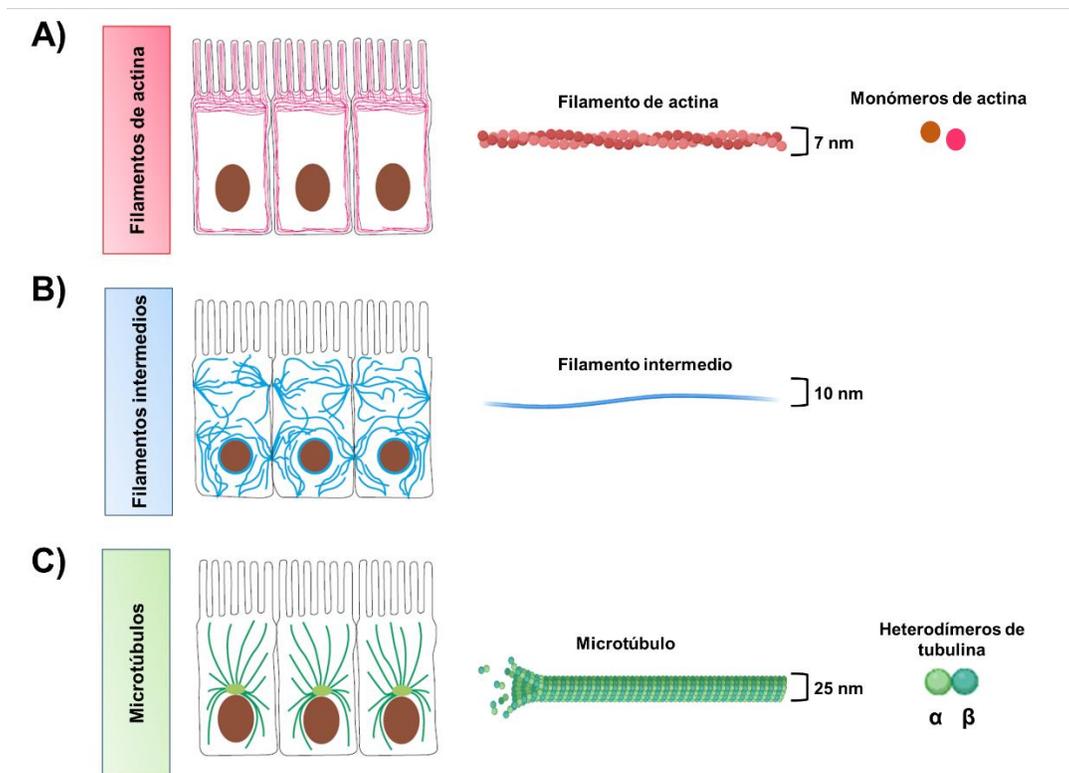


Figura 1. Componentes del citoesqueleto. Esquema representativo de la distribución celular de **A)** actina, **B)** filamentos intermedios y **C)** microtúbulos.

a) Filamentos de actina

La actina es una de las proteínas que mayormente abundan en las células la cual está altamente conservada en todos los reinos. En los mamíferos la actina es representada por seis diferentes isoformas que son codificadas por diferentes genes y se expresen en diferentes tejidos y órganos de todo el cuerpo (Vandekerckhove et al., 1978).

Las funciones de la actina son llevadas a cabo debido a su capacidad de interacciones con otras moléculas de actina para formar polímeros dinámicos llamados filamentos de actina que forman parte del citoesqueleto en las células. Existe un equilibrio constante entre la actina monomérica, G-actina, y la filamentosa, F-actina, para lograr diferentes funciones en todo el cuerpo como dar forma a la célula, ayudar al movimiento celular y también lleva a cabo procesos importantes como la embriogénesis la integridad de los tejidos división celular y contractilidad a células de todo tipo, musculares y no musculares (Kashina., 2020).

Además de su función en el citoplasma de la célula, la actina también se encuentra en el núcleo en donde se ha demostrado que regula directamente la transcripción y participa también en el posicionamiento de los cromosomas y reparación del DNA (Kristó et al., 2016; Virtanen and Vartiainen., 2017).

b) Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios han sido agrupados en seis familias clasificadas en tipo I: queratinas ácidas, tipo II: básicas, tipo III: vimentina, desmina y GFAP, tipo IV: neurofilamentos, nestina y sinemina, tipo V: laminina y tipo VI: faquinina y filensina (Sanghvi-Shah and Weber., 2017). Los filamentos intermedios como las queratinas y los neurofilamentos son producidos de forma específica para cada tipo de célula. Estas estructuras están involucradas en dar forma a las células, ayudan al correcto posicionamiento de los organelos, además de estar involucrados en el contacto célula-célula y célula-matriz (Moujaber and Stochaj., 2020).

Los filamentos intermedios juegan un papel importante en la arquitectura de las células ya que a lo largo del desarrollo las células están sometidas a una serie de

fuerzas. Estas interacciones físicas son iniciadas por diferentes factores que no solo incluyen al ambiente en donde se encuentran, sino que también influyen las células que las rodean y la matriz extracelular. Para mantener la integridad celular de la fuerza ejercida las células deben de evitar la ruptura y permanecer adherentes entre sí. Esto es posible gracias a los filamentos intermedios, ya que tienen la característica de proporcionar la resistencia mecánica a las células (Sanghvi-Shah and Weber., 2017).

Los filamentos intermedios son importantes en los epitelios de los bronquiolos y alveolos. En tejidos normales de pulmón las células epiteliales bronquiales expresan principalmente queratina y vimentina. Cuando las células pulmonares se encuentran en condiciones de estrés como la respiración cortada o en condiciones de hipoxia los filamentos intermedios pueden reorganizarse o degradarse. Como mecanismo de defensa ciertas proteínas son fosforiladas lo cual facilita la reorganización de la queratina para mantener la integridad celular (Yi and Ku., 2013).

c) Microtúbulos

Los microtúbulos están formados por α y β tubulina y tienen una función organizadora muy importante en todas las células eucariotas ya que tienen la capacidad de despolimerizarse y polimerizarse rápidamente. Además, los microtúbulos crecen rápidamente de una pequeña estructura cerca del centro de la célula llamada centrosoma extendiéndose hacia la periferia de la célula creando un sistema de pistas en todo el citoplasma capaces de transportar vesículas, orgánulos, y otros componentes celulares.

Los microtúbulos también son necesarios para la migración celular, así como para el mantenimiento de la polaridad celular. La organización, el crecimiento, la agrupación, la contracción o el colapso de los microtúbulos está controlada por varias vías de señalización (Roostalu., 2017; Stanganello et al., 2019). Se ha demostrado que los microtúbulos también tienen una función protectora contra la permeabilización de células endoteliales de pulmón (Karki et al., 2017).

Los microtúbulos son capaces de formar estructuras estables como cilios y flagelos en células eucariotas. Estas estructuras se extienden desde la superficie de las células y son utilizadas para barrer el líquido que pueda encontrarse en la superficie celular. Los cilios básicamente están formados por un haz de microtúbulos altamente organizado y estable.

El epitelio de las vías respiratorias está compuesto de cuatro tipos celulares que recubren una membrana basal, las cuales son células ciliadas, secretoras, intermedias no diferenciadas y células basales (Crystal et al., 2008). Las células basales funcionan como células madre y responden a la senescencia y lesiones celulares. Estas células generan células intermedias no diferenciadas que luego son diferenciadas en células ciliadas y secretoras. Las células ciliadas y secretoras son la primera línea de defensa contra agentes patógenos y partículas que puedan ser inhalados (Tilley et al., 2015). Debido a estas estos tipos celulares en especial las células ciliadas los microtúbulos tienen una función importante en la defensa contra agentes externos que puedan ser inhalados.

1.3. Enfermedades pulmonares asociadas a citoesqueleto

Alteraciones en el citoesqueleto pueden estar asociadas a enfermedades como la fibrosis quística, enfermedad pulmonar que depende de varios factores como un incremento en la actividad de RhoA, GTPasa involucrada en la remodelación del citoesqueleto, formación de fibras de estrés de actina, alteraciones en marcadores de transición epitelio mesénquima como E-caderina, α actina de músculo liso y vimentina (Corvol et al., 2018).

Por otro lado, se ha demostrado que alteraciones en las uniones adherentes, citoesqueleto de actina y microtúbulos conduce a la permeabilidad de células endoteliales pulmonares efecto asociado al síndrome de dificultad respiratoria aguda causado por la inhalación del humo de tabaco (Rounds and Lu., 2017).

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad progresiva que se debe a la gran cantidad de colágeno depositada en el intersticio alveolar y es considerada la enfermedad pulmonar más agresiva. Sin embargo, el citoesqueleto juega un papel

importante en esta enfermedad debido a que se ha demostrado que el citoesqueleto de actina es modificado produciendo cambios morfológicos en células epiteliales de pulmón, así como la disminución de filamentos de actina (Goldmann et al., 2018).

La alteración de los filamentos intermedios también está relacionada con enfermedades pulmonares. Se ha observado que en pacientes con adenocarcinoma de pulmón los niveles de queratina 8 incrementan en suero, lo cual está relacionado con tumores altamente invasivos disminuyendo el tiempo de vida de los pacientes por lo que elevados niveles de queratina 8 en suero se utiliza como un marcador de cáncer de pulmón (Fukunaga et al., 2002; Ishii et al., 2008). También se ha observado que la desregulación de la expresión de vimentina está relacionada con la transición epitelio mesénquima de células de carcinoma de pulmón (Zeisberg and Neilson., 2009). Los carcinomas de pulmón de células no pequeñas representan cerca del 80% de los tipos de cáncer de pulmón y tienen como característica la formación de tumores altamente invasivos los cuales están relacionados con una alta expresión de vimentina (Dauphin et al., 2013).

En las vías respiratorias las células ciliadas, actúan en conjunto con el moco generado por las células secretoras limpiando las vías respiratorias de partículas y patógenos inhalados. Se ha demostrado que la desorganización en los microtúbulos en este tipo celular está asociada a la discinesia ciliar causando congestión nasal, sinusitis crónica, infecciones del tracto respiratorio recurrentes y desordenes respiratorios neonatales (Tilley et al., 2015).

Como se mencionó al inicio del capítulo los ENM pueden interactuar con los diferentes componentes del citoesqueleto alterando su estructura la cual puede concluir en diferentes enfermedades respiratorias como se abordó anteriormente debido a que la principal vía de exposición es la vía inhalatoria. Por lo que es importante estudiar los efectos que tienen los ENM sobre los componentes del citoesqueleto ya estos tienen una función importante para la homeostasis pulmonar.

2. Antecedentes

Se ha estudiado el efecto que tienen las NPs de hierro (IONPs) las cuales son ampliamente utilizadas con enfoques terapéuticos y médicos. Sin embargo, poco se conoce sobre el destino de estas NPs y los efectos que se puedan tener una vez dentro del cuerpo humano. En este estudio se demostró que las IONPs tienen la capacidad de internalizarse en células de glioma y astrocitos ocasionando un desarreglo en el citoesqueleto de actina, además, de desestabilizar los microtúbulos de tubulina teniendo como consecuencia alteraciones en el tráfico vesicular (Willmann & Dringen., 2018).

Por otro lado, también se han realizado estudios de proteómica en donde analizan los efectos de las IONPs sobre diferentes tejidos como hígado, pulmón y cerebro analizando 1565, 1135 y 1161 proteínas respectivamente. Los resultados de las proteínas analizadas en este estudio indican que las IONPs tienen la capacidad de alterarlas. Las proteínas que fueron desreguladas por las IONPs están involucradas en la remodelación del citoesqueleto, el metabolismo celular, el sistema inmune, procesos inflamatorios, respuesta al estrés oxidante, angiogénesis y enfermedades neurodegenerativas (Askri et al., 2019)

Se ha demostrado que las NPs de TiO_2 causan alteraciones estructurales en células de neuroblastoma encontrando que las NPs de TiO_2 no afectan la viabilidad celular en este tipo celular. Sin embargo, las NPs de TiO_2 causan alteraciones estructurales en los microtúbulos de los neuroblastomas tales como desorganización, retracción y decremento en la cantidad de estos. Además, algo interesante es que las NPs de TiO_2 no causaron cambios en la expresión de α y β tubulina. Sin embargo, la inestabilidad de los microtúbulos causada por las NPs de TiO_2 contribuye a la neurotoxicidad de dichas NPs (Mao et al., 2015)

El efecto que tienen las NPs de TiO_2 sobre las estructuras del citoesqueleto de tubulina también ha sido analizado de manera acelular. En este estudio analizaron los efectos de las NPs de TiO_2 sobre el proceso de polimerización y despolimerización de dichas estructuras. Los hallazgos de este estudio fueron que las NPs de TiO_2 generan cambios conformacionales significativos en la tubulina afectando su polimerización y disminuyendo la polimerización. Esto es importante

ya que los microtúbulos son estructuras formadas por la tubulina los cuales tienen diferentes funciones como el transporte celular la motilidad de las células y la mitosis (Gheshlaghi et al., 2008).

3. Justificación

Debido a que las NPs de TiO₂ son las mayormente producidas a nivel mundial por sus excepcionales propiedades fisicoquímicas las cuales tienen la capacidad de conferir novedosas características a productos de uso común, es importante conocer los efectos que están puedan causar.

Se sabe que las NPs de TiO₂ producen alteraciones en diferentes líneas celulares como la producción de ROS, teniendo como consecuencia un desbalance en el estrés oxidante, también se ha demostrado que puede causar daño a DNA y mediante estudios proteómicos se ha analizado que puede desregular diferentes proteínas las cuales están relacionadas principalmente con el citoesqueleto.

Existen estudios los cuales demuestran que las NPs de TiO₂ pueden ser internadas por diferentes tipos celulares. Sin embargo, una vez dentro de los sistemas biológicos estas pueden alterar la morfología de las células alterando principalmente el citoesqueleto de actina y tubulina, componentes principales del citoesqueleto que son los encargados de procesos esenciales de las células como mantener la morfología y la división celular.

Los estudios toxicológicos de las NPs de TiO₂ se enfocan principalmente en elucidar procesos que sean marcadores de citotoxicidad como decremento de la viabilidad, daño a DNA y la apoptosis. Sin embargo, el daño estructural del citoesqueleto es estudiado de manera secundaria, debido a que estas alteraciones no son consideradas como marcadores de citotoxicidad. Por lo que las alteraciones causadas por las NPs de TiO₂ al citoesqueleto están poco estudiadas siendo un organelo esencial para la sobrevivencia de la célula. Además, los estudios realizados muestran solo los efectos de las NPs en exposiciones agudas, sin conocer si dichas alteraciones al citoesqueleto pueden ser reversibles.

Por lo anterior, en esta tercera parte de la investigación decidimos enfocarnos en las alteraciones que causan las NPs de TiO₂ sobre el citoesqueleto de actina y tubulina, debido a que en los resultados previos encontramos que las NPs de TiO₂ son las que tienen mayor impacto sobre las células epiteliales de pulmón. Y si las células pueden recuperarse del daño causado por las NPs de TiO₂.

4. Hipótesis

Células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂ sufren alteraciones en el citoesqueleto de tubulina y actina el cual está relacionado con la disminución de la migración celular. Además, las NPs de TiO₂ afectan la expresión de genes que están involucrados en funciones primordiales de las células pulmonares.

5. Objetivo general

-Evaluar las alteraciones del citoesqueleto de tubulina y actina de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂ y la capacidad de dichas células para recuperarse del daño estructural.

5.1 Objetivos particulares

1. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las NPs de TiO₂ como su tamaño hidrodinámico, potencial zeta e índice de polidispersión.
2. Exponer a NPs de TiO₂ células epiteliales de pulmón a concentraciones de 1 µg/cm² y 10 µg/cm² a diferentes tiempos.
3. Analizar la ultraestructura de las células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂ a diferentes tiempos.
4. Evaluar la viabilidad de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂.
5. Evaluar la integridad del citoesqueleto de tubulina y actina de células epiteliales de pulmón mediante inmunofluorescencias.
6. Evaluar la cantidad de tubulina y actina mediante western blot.
7. Analizar el tamaño celular y la granularidad de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂.
8. Evaluar la migración de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂.
9. Evaluar la capacidad del citoesqueleto de recuperarse de las alteraciones inducidas por la exposición a NPs de TiO₂.
10. Evaluar la expresión de las proteínas Ki67, SFTPB y MMP2 de las células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂.

6. Materiales y métodos

6.1 Caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio

NPs de TiO₂ (<25 nm tamaño de nanopartícula) fueron adquiridas de Sigma Aldrich (Cat. No. 637254), el tamaño primario fue analizado mediante microscopía electrónica de barrido, SEM por sus siglas en inglés, utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL 5800-LV, Japón; QUANTA FEG 3D), 80 000X, 30 KV, 26 pixeles/nm². Las imágenes de los aglomerados de las NPs de TiO₂ fueron tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión, TEM, por sus siglas en inglés utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 1010, Japón) Brevemente, las NPs de TiO₂ fueron resuspendidas en medio F12K (In Vitro S.A., Cat. No. ME-038, México) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Biowest, Cat. No. US1520). Para analizar el tamaño hidrodinámico y el potencial zeta un stock fue preparado con 1 mg de NPs de TiO₂ el cual fue resuspendido en 1 mL de medio F12K suplementado con 10% de SFB. Posteriormente, el stock fue sonificado a 40 Hz durante 30 min con la finalidad de dispersar las NPs de TiO₂. Finalmente, se realizó una dilución 1:100 con medio F12K suplementado con 10% de SFB y la muestra fue analizada mediante dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) utilizando un Zeta Plus Analyzer (Brookhaven, USA).

6.2 Cultivo celular y exposición a nanopartículas de dióxido de titanio

Células epiteliales de pulmón, de la línea A549, fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) las cuales fueron cultivadas con medio F12k suplementado con 10% de SFB incubadas a una atmosfera de 95% de humedad relativa a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Una vez alcanzado el 80% de confluencia las células epiteliales de pulmón fueron despegadas con tripsina-EDTA (In Vitro S.A., Cat. No. EN-008, México) y sembradas en placas de 21 cm². Para la exposición a NPs de TiO₂ se preparó un stock. Brevemente, se pesó 1 mg de NPs de TiO₂ el cual fue resuspendido en 1 mL de medio F12k suplementado con 10% de SFB. Una vez preparado el stock fue sonificado durante 30 minutos a 40 Hz y se utilizaron concentraciones finales de 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂. Para la exposición a NPs de TiO₂ fueron diseñados tres modelos: A) células

epiteliales de pulmón expuestas durante 24 horas, B) células epiteliales de pulmón expuestas durante 24 horas y 6 días libres de NPs de TiO₂ y C) células epiteliales de pulmón expuestas durante 7 días (Figura 2).

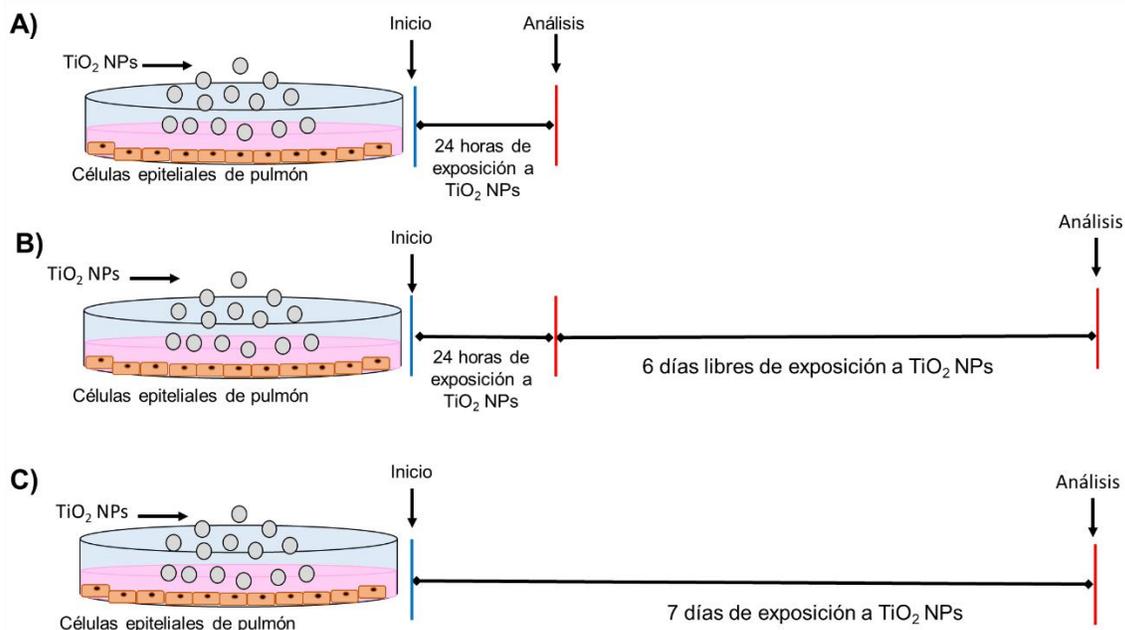


Figura 2. Diseño experimental. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a NPs de TiO₂ a diferentes tiempos **A)** 24 horas, **B)** 24 horas de exposición y 6 días libres de NPs y **C)** 7 días continuos.

6.3 Análisis de la ultraestructura de células epiteliales de pulmón

La ultraestructura de las células epiteliales de pulmón fue analizada mediante espectroscopia electrónica de transmisión (por sus siglas en inglés, TEM). Brevemente, células epiteliales de pulmón fueron expuestas a 1 µg/cm² y 10 µg/cm² por 24 horas, 24 horas de exposición y 6 días libres de NPs y 7 días. Posteriormente, las células epiteliales de pulmón fueron fijadas con 2.5% de glutaraldehído-formaldehído en HPBS durante 1 hora. Una segunda fijación fue realizada en 2% de OsO₄ (1:1 en HPBS) durante 1 hora. Las células epiteliales de pulmón fueron gradualmente deshidratadas con etanol y embebidas en resina epóxica (Epon 812, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Secciones ultrafinas fueron teñidas con citrato

de plomo y acetato de uranilo alcohólico. Finalmente, las muestras fueron analizadas in un microscopio Carl Zeiss, Auriga Model, SmartSEM Software.

6.4 Viabilidad celular

Células epiteliales de cáncer de pulmón de la línea A549 fueron sembradas en placas de 21 cm² y expuestas a 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ a tres diferentes tipos a) 24 horas, b) 24 horas de exposición y 6 días libres de NPs y c) 7 días continuos. Brevemente, células epiteliales de pulmón fueron expuestas a las diferentes concentraciones de NPs de TiO₂ y los diferentes tiempos como arriba se explica. Una vez transcurridos los tiempos de exposición las células epiteliales de pulmón fueron despegadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue desechado y las células fueron resuspendidas en medio F12k suplementado con 10% de SFB. Posteriormente, se realizó una mezcla de medio F12k suplementado con 10% de SFB y azul de tripano en una en una proporción 10:80. Finalmente, 10 µL de la suspensión celular fueron adicionados a la mezcla descrita previamente y la proporción de células vivas fueron contadas con una cámara de Neubauer. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.5 Inmunofluorescencia de tubulina y actina

Células epiteliales de pulmón fueron sembradas sobre cubreobjetos en una densidad de 200,000 células y expuestas con NPs de TiO₂ como se describe en la sección 5.2. Posteriormente, las células epiteliales de pulmón fueron fijadas con paraformaldehído durante 1 hora y lavadas con PBS tres veces para quitar el exceso de fijador. Las muestras fueron incubadas con acetona fría durante 5 minutos para la permeabilización y lavadas con PBS. Una vez fijadas y permeabilizadas las células epiteliales de pulmón fueron incubadas con 1% de albúmina sérica bovina durante 1 hora. Para la inmunodetección anti tubulina las células epiteliales de pulmón fueron incubadas con Alexa Fluor 488-conjugated antibody with α/β tubulin (Life Technologies, Cat. No. 322588) en una dilución 1:1000. Para la inmunodetección anti actina las células epiteliales de pulmón fueron incubadas con

faloidina rodaminada (Sigma-Aldrich, Cat. No. P-1951) en una dilución 1:1000. Además, todas las muestras fueron incubadas con Hoechst (Life Technologies, Cat. No.62249) en una dilución 1:1000 para detectar el núcleo. Todas las muestras fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas tres veces con PBS-1% tritón, seguido por dos lavados con PBS y finalmente lavadas dos veces con agua destilada. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP8) y la fluorescencia fue cuantificada utilizando el software LASX Life Science (Leica). La fluorescencia de las muestras control fue considerada como la fluorescencia basal para cada proteína. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.6 Western blot de tubulina y actina

Células epiteliales de pulmón fueron expuestas como se describe en la sección 5.2. Transcurridos los tiempos de exposición las células epiteliales de pulmón fueron lisadas con buffer de lisis (HEPES-KOH 50 Mm pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM pH 8, Tritón X-100 1% Sodium deoxycholate 0.1% SDS 0.1%) adicionando un inhibidor de proteasa (Thermo Fisher Cat. No. 78415), el procedimiento fue realizado a 4°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de lisis, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 minutos recuperando los sobrenadantes. Finalmente, la cantidad de proteína fue cuantificada por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para el Western blot se utilizaron 20 µg de proteínas totales las cuales fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 10% siendo separadas por peso molecular mediante electroforesis. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa la cual fue incubada con leche libre de grasas al 5% diluida en PBS-Tween al 0.5%. Las membranas fueron incubadas con anti-alpha tubulin antibody (Cat. No Ab7291, ABCAM) a una dilución de 1:5000 y con β-actin (la cual fue donada por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional) a una dilución 1:1000. Anti-GAPDH (Cat. No. Sc32233, Santa Cruz) fue utilizado como control de carga a una dilución de 1:3000. Todas las membranas fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario

anti-mouse (Cat. NXA931 GE-Healthcare) y proteína de precisión Strept-Tactin-HRP Conjugate (Cat. No. 161-0381) durante 60 minutos a 37°C. Finalmente, la expresión de las proteínas fue cuantificada mediante densitometrías con el software ImageJ (disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/>). Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.7 Tamaño celular y granularidad

Para determinar el tamaño celular y la granularidad de las células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes tratamientos, se lavaron los cultivos celulares con HBSS 1X para posteriormente ser despegadas con tripsina-EDTA y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Inmediatamente, el sobrenadante fue desechado y las células epiteliales de pulmón fueron incubadas en alcohol etílico frío al 70% y centrifugadas nuevamente a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue desechado y las células epiteliales de pulmón fueron resuspendidas en FACS Flow (BD Biosciences, Cat. No. 342003) y 10,000 células fueron analizadas mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur). Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.8 Migración celular

La migración celular fue determinada mediante el ensayo de la herida. Brevemente, células epiteliales de pulmón fueron expuestas a los diferentes tratamientos de NPs de TiO₂ como se detalló en la sección 5.2 y fueron sembradas en placas de 12 pozos en una densidad de 200,000 células por pozo. Posteriormente, la monocapa de células fue rayada con ayuda de una punta de micropipeta. Inmediatamente, el medio de cultivo fue retirado y la monocapa de células fue lavada con PBS tres veces para remover las células que fueron despegadas con la punta de micropipeta. Consecutivamente, fue adicionado medio de cultivo F12K suplementado con SFB al cual le fue adicionado 10 µM de inhibidor de proliferación citosina β-D-arabinofuranósido (Ara-C., Sigma Aldrich Cat. No. C6645) para detectar solo migración celular evitando la proliferación. La migración celular fue monitoreada a

distintos tiempos 0, 3, 6, 12 y 24 horas utilizando un microscopio invertido Leica DM IL LED con una amplificación de 4X. Finalmente, el área de migración celular fue cuantificada usando el software ImageJ. Tres experimentos independientes fueron realizados.

6.9 Expresión de los genes Ki67, SFTPb y MMP2

La extracción del RNA fue realizada de acuerdo con el protocolo establecido por Trizol (Thermo-Fisher 15596026). La cantidad de RNA fue verificada a través de electroforesis y la concentración fue cuantificada mediante espectrofotometría (Epoch, Biotek). La expresión de Ki67, SFTPb, MMP2 y actina fueron evaluados mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (por sus siglas en inglés RT-PCR). Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis de agarosa al 1%. Posteriormente, las bandas fueron analizadas mediante el equipo de fotodocumentación (Gel Doc EZ System, Bio-Rad) a través del cual la expresión del mRNA fue evaluada. La expresión fue cuantificada mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Las secuencias de los primers están presentadas en la tabla 1. Tres experimentos independientes fueron realizados.

Tabla 1. Secuencias de primers, Tm y tamaño del producto para el análisis de la expresión

Gen	Secuencia del primer 5' 3'	TM	Tamaño del producto
Ki67	Forward: GTCCATAAAGACCTTTTCAGCCA Reverse: ATGTCCTCGTTTCCGATTATAGC	57°C	90pb
SFTPb	Forward: GCAACGTCCTCCCCTTGAAG Reverse: AGTCAGTCTGGTTCTGGAAGTAG	57°C	99pb
MMP2	Forward: GCCCAAGAATAGATGCTGACTG Reverse: TGAAAGGAGAAGAGCCTGAAGTG	57°C	160pb
Actina	Forward: CTGTATTCCCCTCCATCGTG Reverse: CTTCTCCATGTCGTCCCAGT	57°C	178pb

6.10 Análisis estadístico

Para la comparación estadística, los datos fueron presentados como $\text{mean} \pm \text{standard error}$ de al menos tres experimentos independientes los cuales fueron analizados mediante el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

7. Resultados

7.1 Caracterización de las NPs de TiO₂

Las NPs de TiO₂ fueron analizadas mediante SEM y mostraron un tamaño primario menor a 100 nm con una forma amorfa (Figura 3A). Las NPs de TiO₂ que fueron resuspendidas en medio F12k suplementado con 10% de SFB fueron analizadas mediante TEM las cuales formaron aglomerados mayores a 100 nm (Figura 3B). El tamaño hidrodinámico de las NPs de TiO₂ resuspendidas en medio F12k suplementado con 10% de SFB que analizado mediante DLS mostró un tamaño de partícula de 385±62 nm con un potencial zeta de -9.57±1.68 mV (Tabla 2).

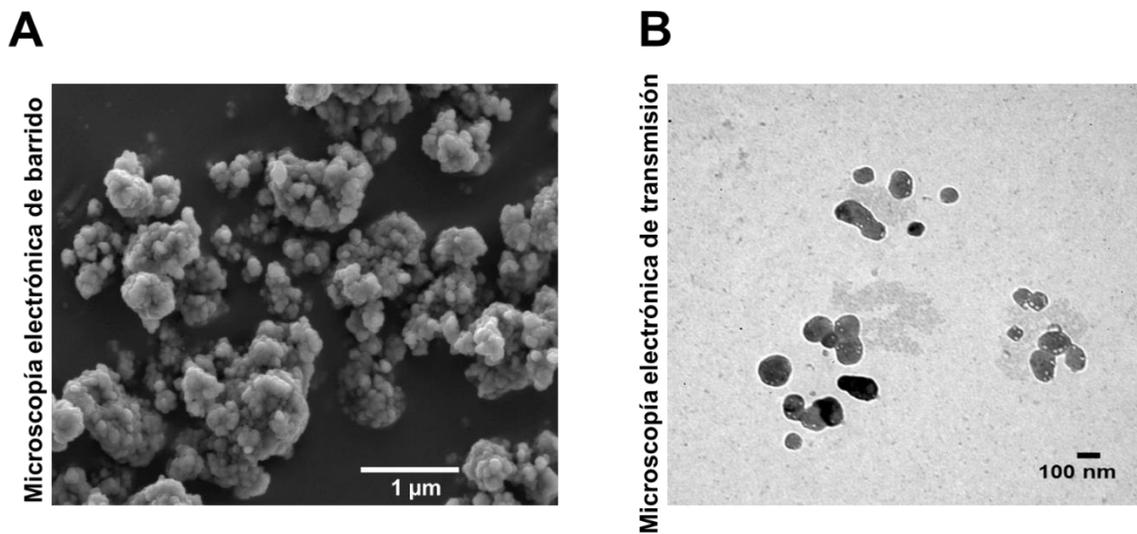


Figura 3. Morfología de NPs de TiO₂. **A)** microscopia electrónica de barrido (SEM) de NPs de TiO₂ muestra una forma amorfa. **B)** Microscopia electrónica de transmisión (TEM) de aglomerados de NPs de TiO₂ dispersados en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de aglomerados de TiO₂ NPs en medio de cultivo celular

	Tamaño hidrodinámico (nm)	Potencial zeta (mV)
F12K suplementado con 10% FBS	385 ± 62	-9.57 ± 1.68

7.2 Ultraestructura de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂

Las células control mostraron una envoltura nuclear regular, crestas mitocondriales preservadas, cuerpos lamelares y cuerpos multivesiculares. Las células expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas fueron observados varios aglomerados de NPs de TiO₂ en el citoplasma de las células mientras que las células expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO₂ tuvieron aglomerados de mayor tamaño dentro del citoplasma (Figura 4). Células epiteliales de pulmón expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas y 6 días libres de NPs mostraron pocos aglomerados dentro del citoplasma (Figura 4). En las células epiteliales de pulmón expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO₂ durante 7 días se observó gran cantidad de NPs de TiO₂ internadas que las células que fueron expuestas durante 24 horas y las células que fueron expuestas durante 24 horas y 6 días libres de NPs (Figura 4). Además, se observó una disrupción de crestas mitocondriales en las células epiteliales de pulmón expuestas a los diferentes tratamientos.

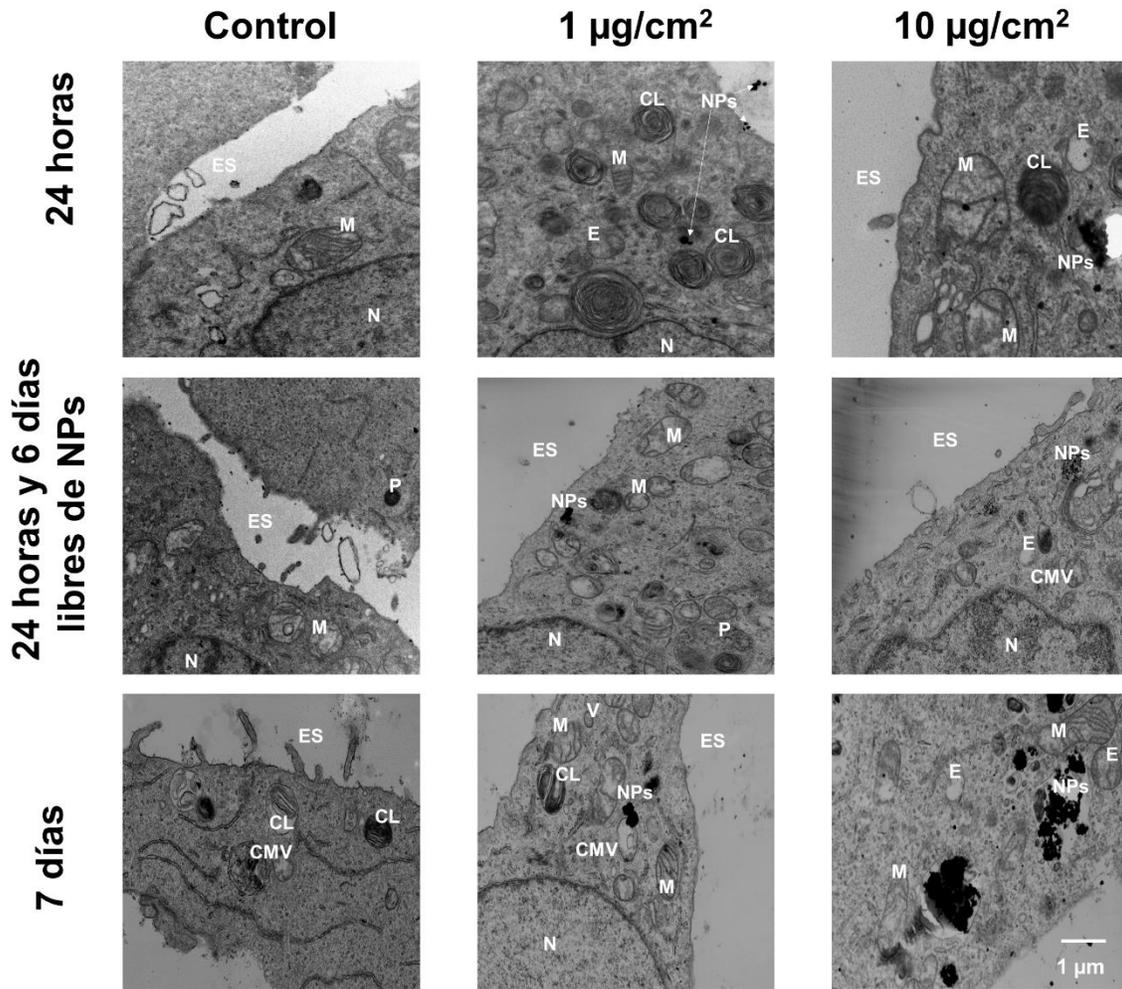


Figura 4. Internalización de NPs de TiO₂ en células epiteliales de pulmón. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 24 horas, 24 horas y 6 días libres de NPs y 7 días y su ultraestructura fue analizada. ES: espacio extracelular; M: mitocondria; N: núcleo; CL: cuerpo lamelar; NPs: nanopartículas; P: peroxisoma; CMV: cuerpo multivesicular. Magnificación 16 K.

7.3 NPs de TiO₂ no afectan la viabilidad de células epiteliales de pulmón

La viabilidad celular fue determinada mediante la exclusión de azul tripano. Los resultados mostraron que las células epiteliales de pulmón expuestas a 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 24 horas no disminuyeron su viabilidad celular (Figura 5A). Las células epiteliales de pulmón expuestas durante 24 horas y 6 días libres de NPs a concentraciones de 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ no mostraron un decremento en la viabilidad celular al igual que las células expuestas durante 24 horas (Figura 5B). Sin embargo, las células epiteliales de pulmón que

fueron expuestas durante 7 días la viabilidad celular disminuyó con la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO_2 en comparación con el control (Figura 5C).

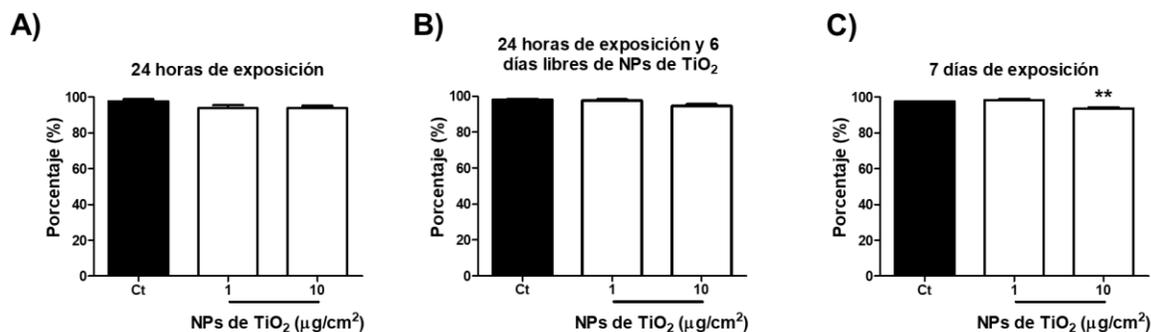
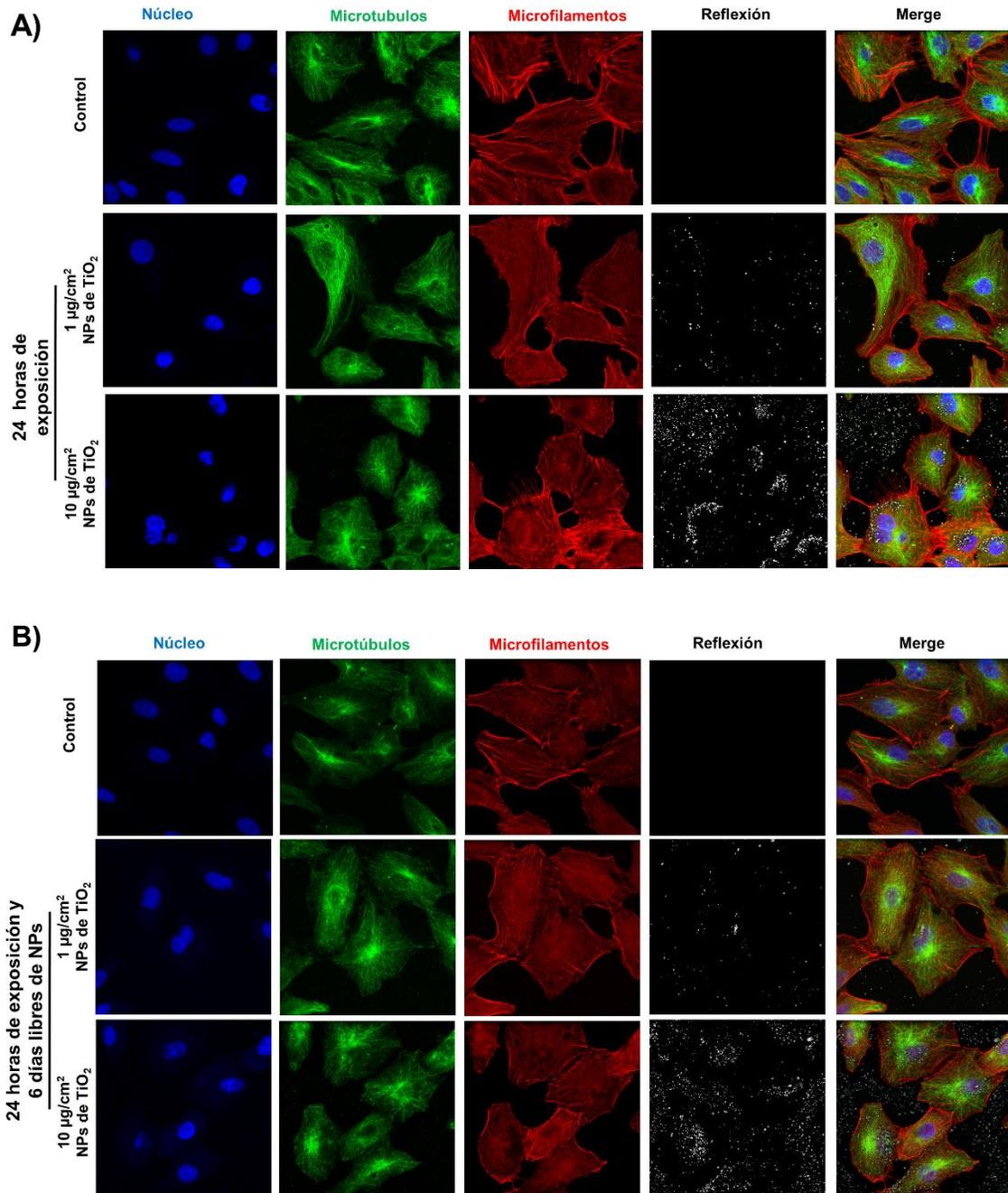


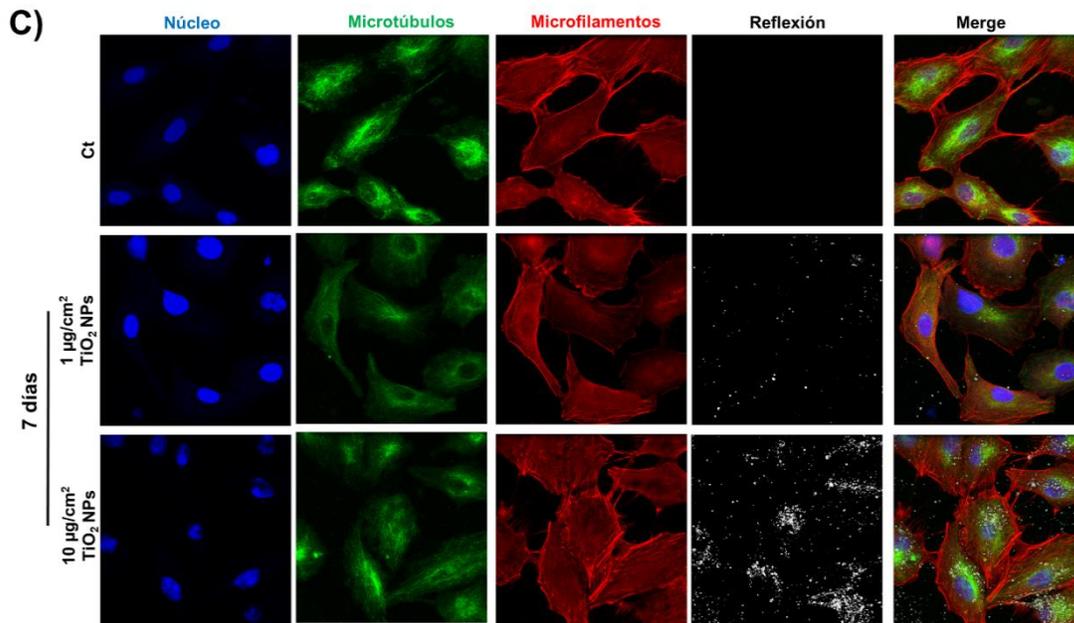
Figura 5. Viabilidad celular de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO_2 . Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a NPs de TiO_2 a los diferentes tiempos y recolectadas para determinar la viabilidad mediante exclusión de azul tripano. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar, ** $p < 0.01$ vs control.

7.4 NPs de TiO_2 afecta la polimerización de tubulina y actina de células epiteliales de pulmón de manera irreversible

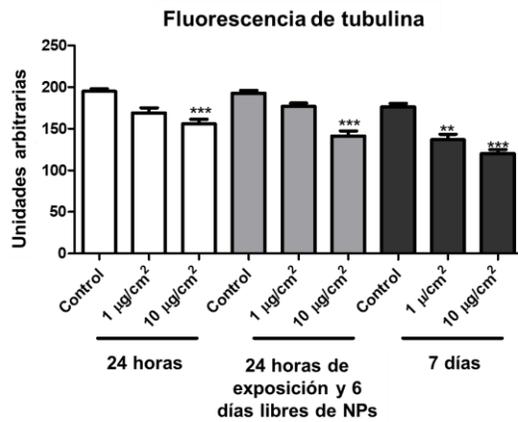
El citoesqueleto de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO_2 fue analizado mediante inmunofluorescencia y los resultados mostraron que el citoesqueleto de tubulina y actina se ve afectado de manera irreversible con las concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO_2 a los tres diferentes tiempos (Figura 5A-C). Para determinar la localización de las NPs de TiO_2 dentro de la célula fue utilizada la reflexión confocal y los resultados mostraron que las NPs de TiO_2 se encuentran localizadas alrededor del núcleo (Figura 6A-C). Específicamente las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO_2 durante 24 horas tuvieron un decremento del 20.2% en la señalización de tubulina (Figura 6D) y 25.1% en la de actina (Figura 6E). Células epiteliales de pulmón expuestas durante 24 horas y 6 días libres de NPs tuvieron un decremento del 26.6% en la presencia de tubulina (Figura 6D) y del 21.3% en la de actina (Figura 6E). Células epiteliales de pulmón expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 7 días la cantidad de tubulina disminuyó en un 22.4% y 30.7% (Figura 6D) respectivamente. El mismo efecto fue observado con la cantidad de actina la cual disminuyó 28.7% y 46.2% en células epiteliales de pulmón expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y

10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO_2 (Figura 6E) respectivamente. Estos resultados sugieren que el citoesqueleto de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO_2 durante 24 horas generan daño al citoesqueleto de tubulina y actina sin que pueda recuperarse si se retiran las NPs de TiO_2 del cultivo celular.





D)



E)

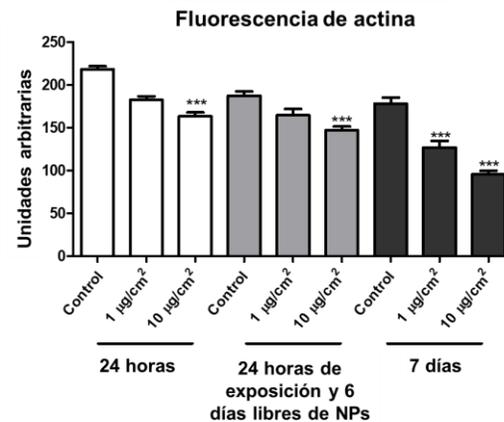
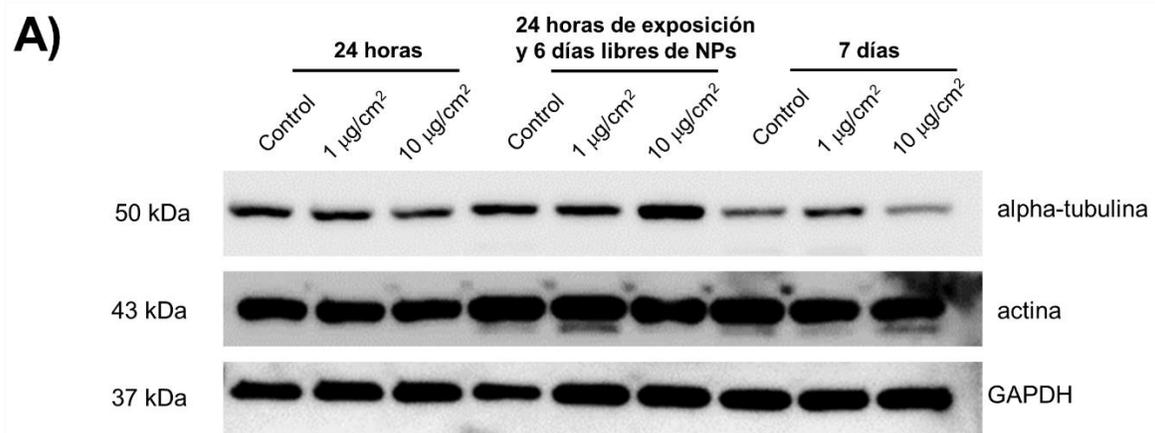


Figura 6. Disminución de tubulina y actina en células epiteliales de pulmón. A-C) El citoesqueleto fue analizado mediante inmunofluorescencias (anti-tubulina mostrado en color verde, anti-actina color rojo y los núcleos teñidos con Hoechst mostrados en color azul) usando microscopia confocal. La cuantificación de la fluorescencia de **D)** tubulina y **E)** actina están presentadas como media \pm error estándar, *** $p < 0.001$ vs control. Tres experimentos independientes fueron realizados.

7.5 NPs de TiO₂ afecta la expresión de actina a los 7 días de exposición en elevadas concentraciones

Debido a que observamos que el citoesqueleto de células epiteliales de pulmón fue afectado por la exposición a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO₂ durante 24 horas, 24 horas y 6 días libres de NPs y 7 días, decidimos investigar si el daño que causaban las NPs de TiO₂ era a nivel de proteína. Por lo que realizamos ensayos de Western blot para observar la expresión de tubulina y actina (Figura 7A). Los resultados mostraron que la expresión de tubulina disminuye un 77.7% cuando las células epiteliales de pulmón son expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO₂ durante 7 días (Figura 7B). Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de actina en células epiteliales de pulmón expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO₂ durante 24 horas, 24 horas y 6 días libres de NPs y 7 días (Figura 7C).



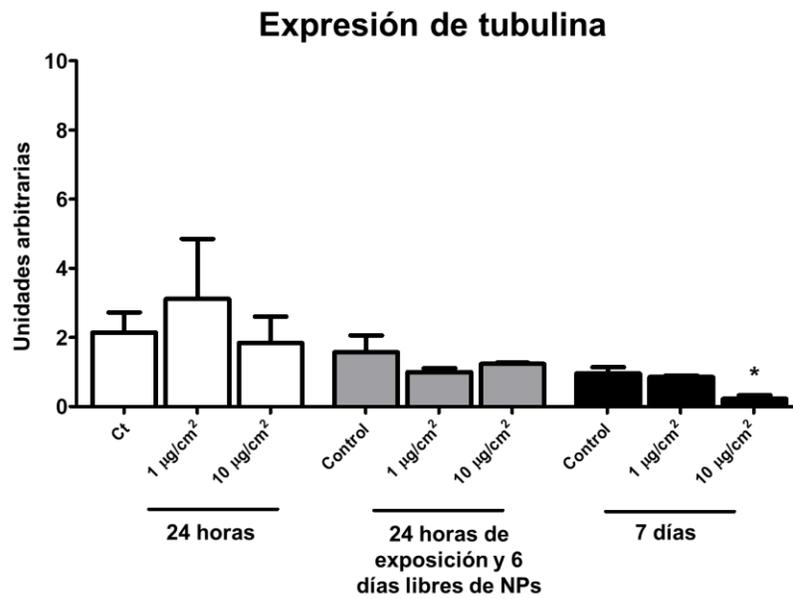
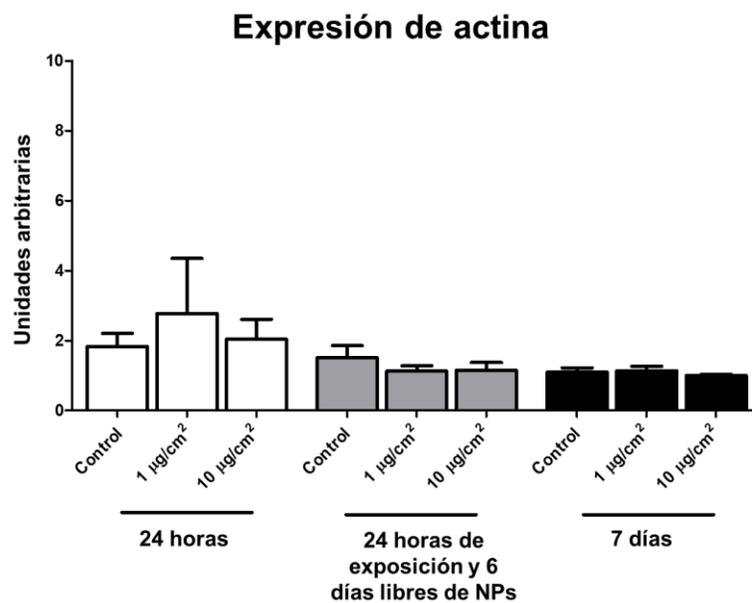
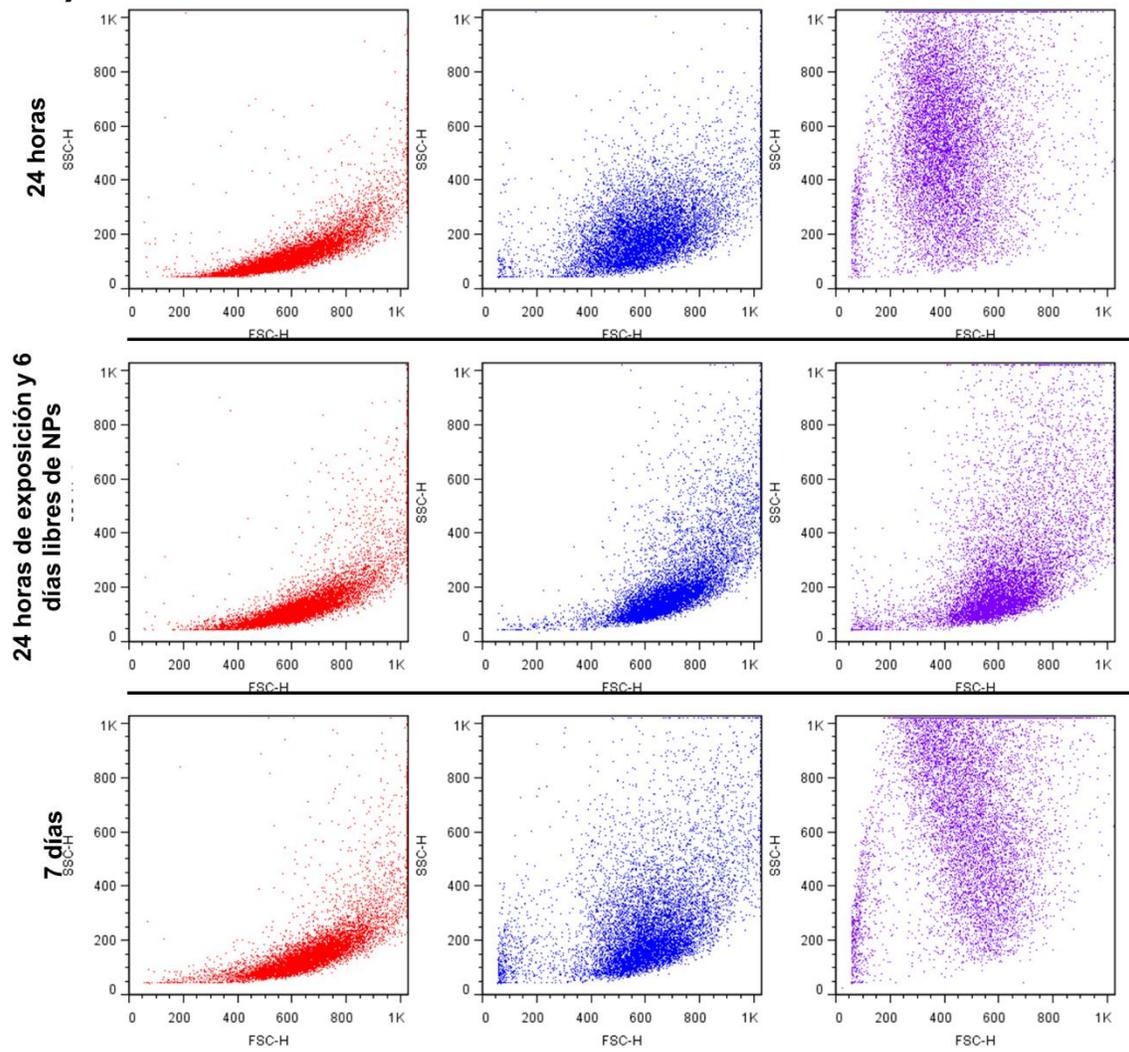
B)**C)**

Figura 7. Expresión de tubulina y actina de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂. **A)** Presencia de tubulina y actina analizada mediante western blot usando GDAPH como control de expresión en todos los tratamientos. La densitometría de **B)** tubulina y **C)** actina fue realizada mediante ImageJ. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media ± error estándar, *p<0.05 vs control.

7.6 El tamaño y la granularidad celular son afectados por las NPs de TiO₂

El tamaño celular (forward scatter) y la granularidad celular (side scatter) fueron analizados para investigar si las NPs de TiO₂ afectan estos parámetros celulares (Figura 8A). Células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a 1 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 24 horas no presentaron cambios en el tamaño celular. Sin embargo, cuando las células epiteliales de pulmón fueron expuestas a 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ el tamaño celular disminuyó en un 20.4% (Figura 8B). Las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 24 horas y 6 días libres de NPs no mostraron cambios en el tamaño celular (Figura 7B). El tamaño celular de las células que fueron expuestas a 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 7 días fue reducido en un 7.17% y 16.97% respectivamente (Figura 7B). La granularidad de las células epiteliales de pulmón expuestas a 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 24 horas incrementó un 90.5% (Figura 8B). Sin embargo, la granularidad de células epiteliales de pulmón expuestas a 1 µg/cm² de y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 24 horas y 6 días libres de NPs aumentó un 6.77% u 19.73% respectivamente. La exposición a 1 µg/cm² de y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 7 días incrementó la granularidad de las células epiteliales de pulmón en un 14.66% y 71.63% respectivamente (Figura 8B). Las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 24 horas tuvieron un gran incremento en la granularidad en comparación con las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a la misma concentración durante 24 horas y 6 días libres de nanopartículas lo cual sugiere que las NPs de TiO₂ pueden estar liberándose del interior de las células epiteliales de pulmón. Otro resultado interesante es el cambio de granularidad de las células epiteliales de pulmón expuestas durante 24 horas y 7 días mostrando un comportamiento similar lo cual puede indicar que las células epiteliales de pulmón pueden alcanzar una capacidad máxima de internalización de NPs de TiO₂.

A)



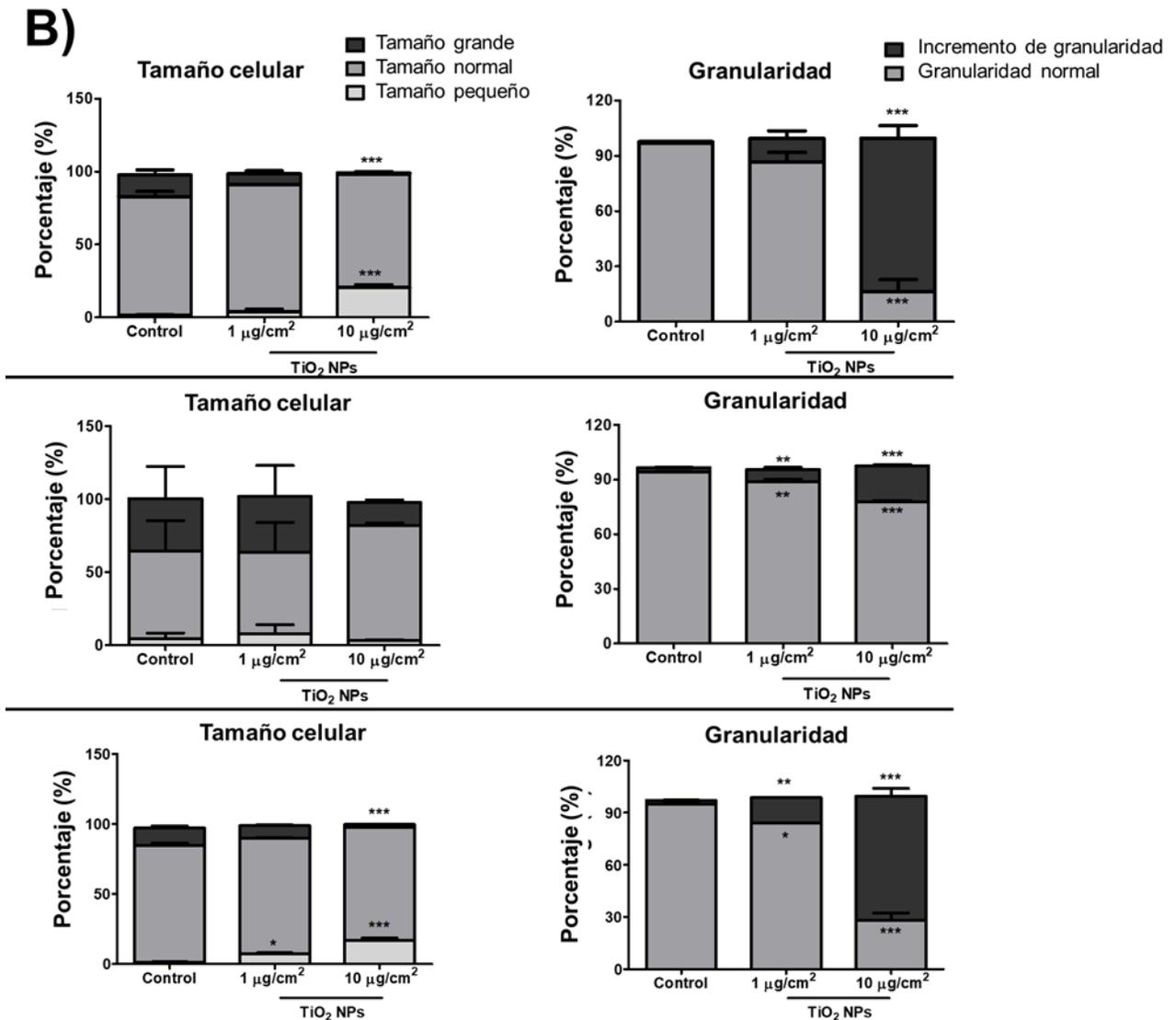
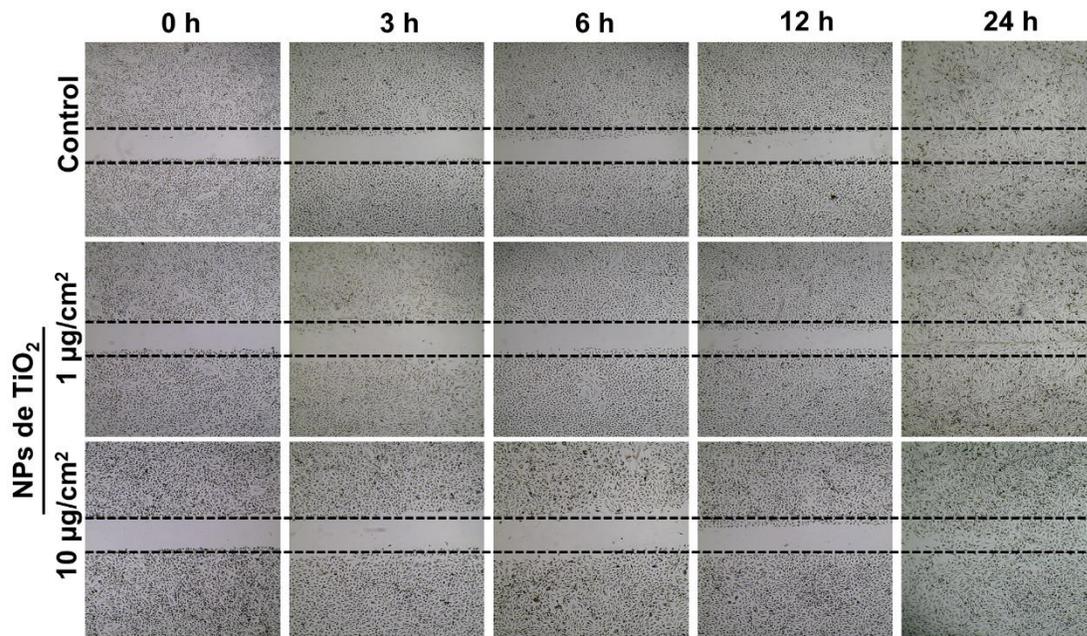


Figura 8. Decremento en el tamaño celular e incremento en la granularidad de células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂. A) Dot plots representativos de forward scatter (FSC-H; tamaño celular) vs side scatter (SSC-H; granularidad) fueron realizados mediante citometría de flujo. B) Cuantificación de las poblaciones celulares de los diferentes parámetros. El tamaño celular fue dividido en tres tipos, Tamaño grande (barras negras), tamaño normal (barras grises) y tamaño pequeño (barras blancas). La granularidad fue dividida en granularidad normal (barras grises) e incremento de granularidad (barras negras). Se analizaron 10,000 eventos de al menos tres experimentos independientes. Los datos están presentados como media ± error estándar, **p<0.05; ***p<0.001 vs control.

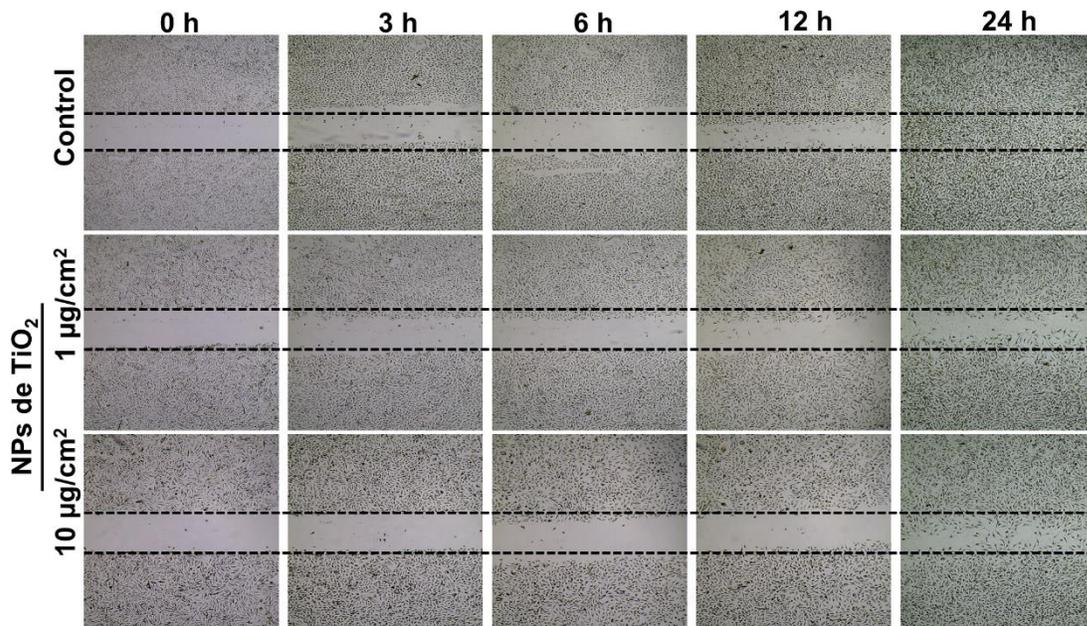
7.7 NPs de TiO₂ disminuye la migración celular

La migración de las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a NPs de TiO₂ durante 24 horas, 24 horas y 6 días libres de NPs y 7 días al igual que las células control comenzó a partir de las 6 horas (Figura 9A-C). La migración celular fue monitoreada a diferentes tiempos 0, 3, 6, 12 y 24 horas y el área de migración fue cuantificada. Los resultados muestran que la migración celular disminuyó a las 12 horas de exposición a NPs de TiO₂ a los diferentes tiempos, sin embargo, aparentemente fue recuperada a las 24 horas (Figura 9D). Células epiteliales de pulmón que fueron expuestas durante 24 horas a NPs de TiO₂ no mostraron cambios en la migración celular ya que migraron de forma similar a las células control. La migración de las células epiteliales de pulmón que fueron expuestas a 1 µg/cm² y 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 24 horas y 6 días libres de NPs disminuyó en un 40.7% y 59.2% respectivamente (Figura 9D). La exposición a 1 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 7 días no afectó la migración de las células epiteliales de pulmón. Sin embargo, la exposición a 10 µg/cm² de NPs de TiO₂ durante 7 días disminuyó la migración celular en un 65.5% (Figura 9D). Estos resultados sugieren que la exposición prolongada a NPs de TiO₂ afecta la estructura del citoesqueleto teniendo como consecuencia un decremento en la migración celular. Los resultados también sugieren, que una sola exposición de 24 horas y 6 días libres de NPs es suficiente para que el daño causado por las NPs de TiO₂ sea irreversible en las células epiteliales de pulmón.

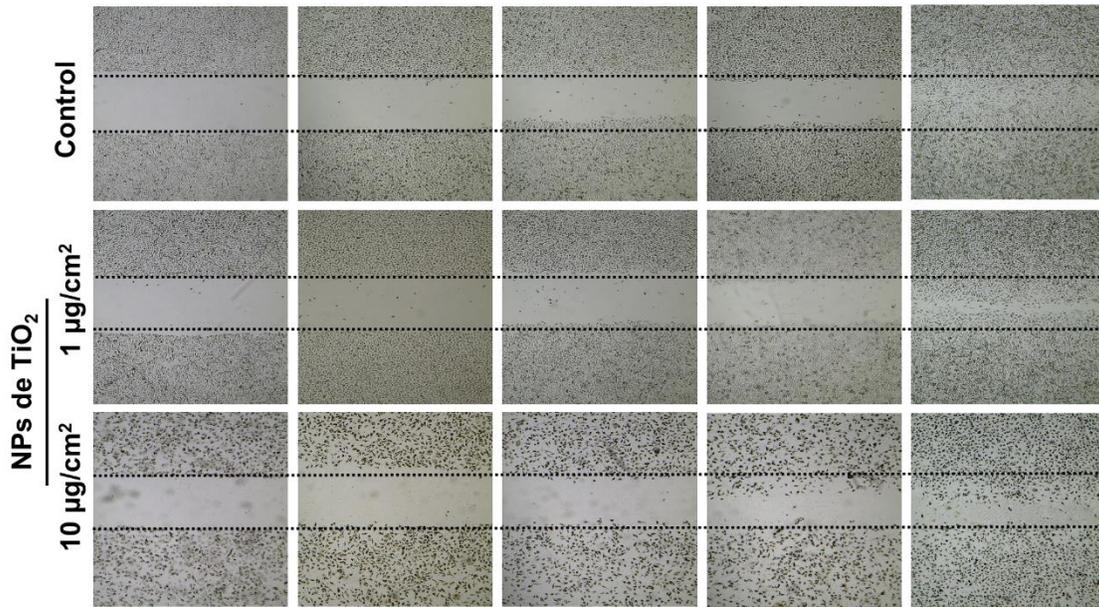
A) Migración posterior a 24 horas de exposición



B) Migración posterior a 24 horas de exposición seguido de 6 días libres de NPs



C) Migración posterior a 7 días de exposición



D)

Migración celular después de tratamientos

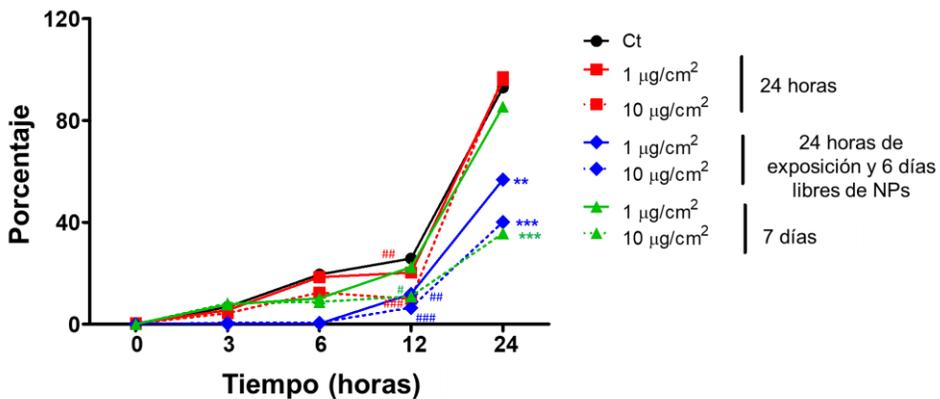


Figura 9. Decremento de la migración celular después de la exposición a NPs de TiO₂. A-C) Imágenes representativas del ensayo de migración de células expuestas a NPs de TiO₂. El ensayo de migración fue monitoreado durante 0 horas, 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas. Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio invertido Leica DM IL LED (4X magnificación). D) cuantificación de la migración. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media ± error estándar. Líneas rojas ##p<0.01 vs Ct (12 horas); ###p<0.001 vs Ct (12 horas); **p<0.01 vs Ct (24 horas) ***p<0.001 vs Ct (24 h); Líneas azules: ##p<0.01 vs Ct (12 h), ###p<0.001 vs Ct (12 h), **p<0.01 vs Ct (24 h), ***p<0.001 vs Ct (24 h); Líneas verdes: #p<0.05 vs Ct (12 h), ***p<0.001 vs Ct (24 h).

7.8 La expresión de Ki67 y SFTPb incrementa después de la exposición a NPs de TiO₂

Las bandas de cada gen fueron detectadas con geles de agarosa al 1% y se observó que la expresión de Ki67 incrementó un 20% después de la exposición a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas y 25.8% después de la exposición a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 24 horas y 6 días libres de NPs. La expresión de Ki67 no fue afectada después de la exposición de 7 días (Figura 10A). Adicionalmente, la expresión de SFTPb incrementó un 53% después de la exposición a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO₂ durante 24 horas, sin embargo, la expresión no fue afectada en las células epiteliales de pulmón expuestas durante 24 horas y 6 días libres de NPs. Las células epiteliales de pulmón expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 7 días incrementó la expresión en un 59% (Figura 10B). Finalmente, las NPs de TiO₂ no afectaron la expresión de MMP2 en ningún tratamiento (Figura 10C).

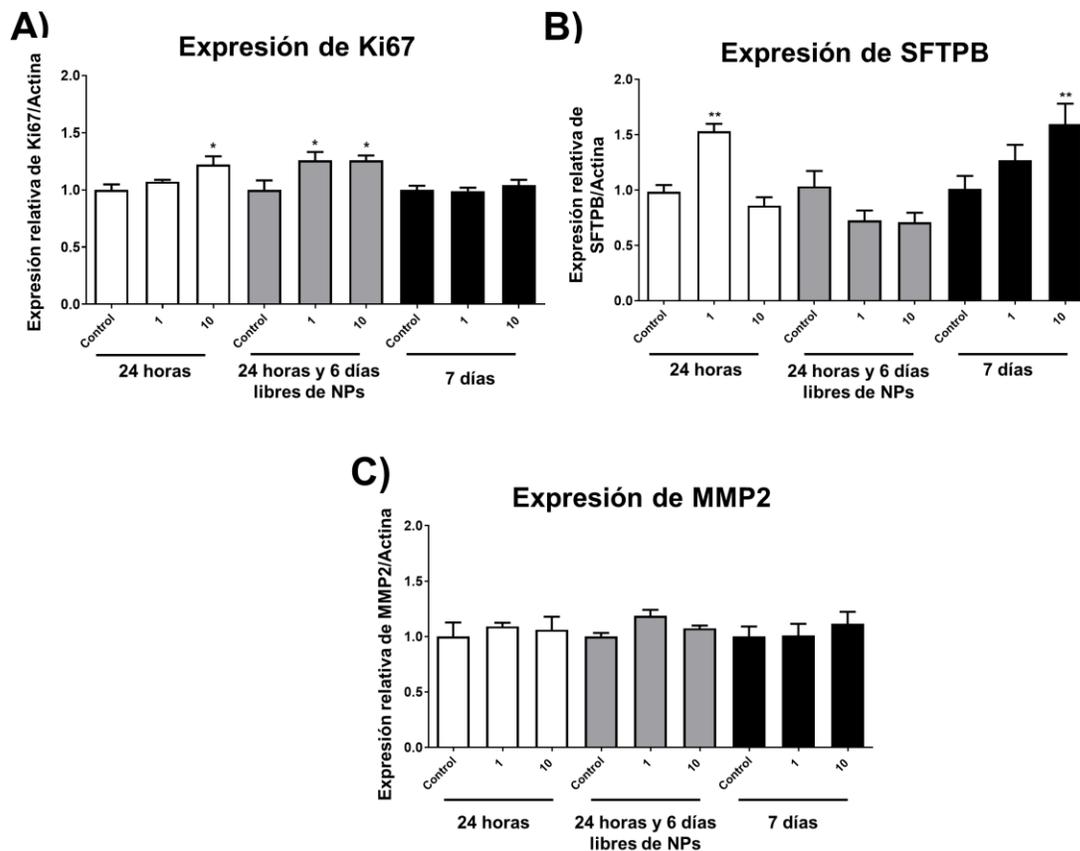


Figura 10. Las NPs de TiO₂ afectan la expresión de Ki67 y SFTPb sin alterar la expresión de MMP2. Células epiteliales de pulmón fueron expuestas a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs de TiO₂ durante 24 horas, 24 horas y 6 días libres de NPs y 7 días y la expresión de los genes **A) Ki67, B)**

SFTPb y **C**) MMP2 fueron analizadas. Los valores de expresión relativa se encuentran normalizados con respecto al gen de carga que fue actina. Tres experimentos independientes fueron realizados. Los datos están presentados como media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

8. Discusión

Se ha demostrado que el TiO₂ inducen la formación de tumores en pulmones de ratas por lo que la IARC lo ha clasificado en el grupo 2B como posible carcinógeno para humanos (Lee et al., 1985). Esto ha llevado a una investigación en la que se han analizado los efectos en los pulmones y es importante utilizar concentraciones adecuadas para estudios *in vitro*. Las estimaciones de la retención alveolar utilizando modelos de dosimetría pulmonar para NPs de TiO₂ en un tiempo de vida laboral sugieren que la inhalación de 0.1 a 1 mg/m³ en entornos ocupacionales podría estudiarse utilizando sistemas *in vitro* que oscilan entre 30 µg/mL y 400 µg/mL (Gangwal et al., 2011). Con base en lo anterior, utilizamos 7 µg/mL (1 µg/cm²) y 70 µg/mL (10 µg/cm²) que cae en concentraciones relevantes relacionadas con la exposición ocupacional.

Los efectos adversos de los NP se atribuyen parcialmente a sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, la forma y la forma cristalina. El valor obtenido en nuestro estudio para el potencial zeta (-9.57 mV) se considera como una carga neutra y se ha reportado que las NPs con potencial zeta negativo o neutro pueden causar daño limitado a la membrana celular (Clogston & Patri, 2011). Esto sugiere que la toxicidad de las NPs de TiO₂ mostradas en este estudio tiene baja asociación con la disrupción de las membranas celulares.

Las NPs por definición tienen un tamaño inferior a 100 nm y las NPs dispersas en suspensiones líquidas de 100 nm se consideran aglomerados (Schneider et al., 2013) y el tamaño depende del medio de dispersión (Magdolenova et al., 2012).

En este estudio se utilizaron NPs de TiO₂ amorfas las cuales formaron aglomerados de 385 nm en medio de cultivo F12k y los efectos encontrados en este estudio pueden atribuirse al tamaño de los aglomerados. Los aglomerados más pequeños pueden ser internalizados por la vía de endocitosis mediada por el receptor de clatrina (Magdolenova et al., 2012) o endocitosis, mientras que los aglomerados más grandes pueden ser internalizados mediante macropinocitosis (Murugan et al., 2015).

La internalización de las NPs de TiO₂ fue observada mediante TEM mostrando la captación de las NPs de TiO₂ de una manera concentración dependiente en el citoplasma de las células expuestas durante 24 horas y 7 días. Además, en el análisis mediante el TEM no se observaron evidencias de alteraciones en los cuerpos lamelares con las NPs de TiO₂ al menos en los tiempos aquí utilizados. Sin embargo, se ha demostrado que otro tipo de NPs tales como las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético recubiertas de silicio (SiO₂-SPIONs) tienen la capacidad de generar daño en los cuerpos lamelares de las células epiteliales de pulmón (Kononenko et al., 2017). Por otro lado, se observaron alteraciones en las crestas mitocondriales en las células epiteliales de pulmón expuestas a NPs de TiO₂. Se ha demostrado en otros estudios que las NPs de TiO₂ generan alteraciones morfológicas en las mitocondrias tales como la disrupción de las membranas mitocondriales externas e internas daño que afecta a las proteínas relacionadas con la cadena respiratoria (Yu et al., 2015)

Por otro lado, el incremento de la granularidad que mostraron las células epiteliales de pulmón después de 24 horas de exposición podría ser atribuido a la internalización de las NPs de TiO₂ pero también a la alteración del contenido de organelos (Ghasempour et al., 2015; Ali et al., 2018). El decremento de la granularidad después de 6 días post exposición sin NPs de TiO₂ sugiere la exocitosis de dichas NPs proceso que se ha reportado en células A549 expuestas a NPs poliméricas en las cuales ocurre la exocitosis de dichas NPs (Adinolfi et al., 2018). De hecho, las células A549 tienen activo el proceso de exocitosis debido a la liberación de la proteína surfactante la cual es la encargada de dar tensión a los pulmones para evitar el colapso. (Khan et al., 2018).

En este estudio se demostró que las NPs de TiO₂ tienen la capacidad de disminuir la cantidad de tubulina y actina de manera irreversible después de 6 días libres de NPs de TiO₂. Por lo que sospechamos que las células desarrollan una respuesta adaptativa contra la desorganización del citoesqueleto debido a que la presencia de las proteínas no siguió disminuyendo después de 7 días continuos de exposición.

La disminución de la fluorescencia de tubulina y la actina sin alteraciones en la expresión de las proteínas puede deberse probablemente al proceso de

despolimerización inducido por NPs de TiO_2 , con la excepción de tubulina en la concentración más alta después de 7 días de exposición. De acuerdo con los resultados obtenidos, las NPs de TiO_2 se internalizan en las células epiteliales del pulmón despolimerizando la red del citoesqueleto, lo que podría tener un impacto en la integridad de la función de los alvéolos, por ejemplo, en las proteínas tensioactivas como el surfactante, es necesaria la red del citoesqueleto debido a que esta proteína es liberada mediante vesículas, además, de que también es importante para la respuesta inmune (Madsen et al., 2000; Kingma & Whitsett, 2006). Además, es importante mencionar que en los estudios en donde se describen las alteraciones del citoesqueleto en diferentes tipos celulares, la recuperación del citoesqueleto no se ha abordado anteriormente. En este estudio se ha demostrado que las alteraciones del citoesqueleto son irreversibles al menos en las células epiteliales de pulmón, sin embargo, no pudimos extrapolar este hallazgo a otros tipos celulares.

Algunos otros tipos de NPs han mostrado efectos adversos en el citoesqueleto, por ejemplo, las NPs de SiO_2 afectan principalmente en la red de tubulina de las células epiteliales de pulmón (Gonzalez et al., 2015), mientras que las NPs de oro y plata reducen la migración celular en fibroblastos (Vieira et al., 2017). Por otro lado, se observó que las NPs de TiO_2 estaban presentes en el citoplasma de las células epiteliales de pulmón aun después de 6 días libres de NPs lo que sugiere que las NPs de TiO_2 son retenidas durante la división celular y esta acumulación podría estar asociada con el daño irreversible del citoesqueleto.

Cuando las células epiteliales de pulmón fueron expuestas durante 7 días las NPs de TiO_2 se observó una disminución de actina y un decremento en la migración celular a concentraciones elevadas. Este mismo efecto se observó con la exposición a concentraciones bajas disminuyendo la cantidad de actina en igual proporción que en concentraciones elevadas, pero disminuyendo en menor proporción la migración celular. Esto sugiere que una exposición a bajas concentraciones de TiO_2 NP podría tener un mayor impacto en el citoesqueleto y un bajo impacto en la migración celular, pero una alta exposición a NPs de TiO_2 afecta tanto al citoesqueleto como a la migración celular.

La despolimerización del citoesqueleto inducida por diferentes tipos de NPs puede tener una aplicación antineoplásica por lo que algunas drogas aprobadas por la FDA ejercen citotoxicidad en células cancerosas al estabilizar o desestabilizar los microtúbulos (Steinmetz & Prota., 2018) mientras que novedosas terapias enfocadas en combatir el cáncer de mama proponen la despolimerización de la tubulina, además de inhibir la migración celular, sin embargo estas terapias van acompañadas de un alta citotoxicidad (van Vuuren et al., 2019). En esta tercera parte del estudio se encontró que la tubulina y la actina son afectadas por las NPs de TiO₂ sin comprometer la viabilidad celular. Esto puede explicar que, durante la exposición inhalatoria, la función pulmonar y la reparación de tejidos podrían verse afectadas y tener consecuencias severas.

Adicionalmente, se analizó la expresión de genes involucrados en la función epitelial de los pulmones incluyendo Ki67 que indica el estado de proliferación de las células y el incremento en esta expresión es un indicativo de un aumento en la actividad mitótica. Por otro lado, se analizó la transcripción del gen SFTPB que es un componente del surfactante pulmonar que mantienen la tensión superficial de los pulmones en la interfaz aire-líquido y la disminución de la transcripción de este gen está relacionada con el deterioro pulmonar. Por otro lado, se analizó el MMP2 el cual está a cargo de la homeostasis de la matriz extracelular y la transducción de señales y la desregulación de este gen compromete la integridad del tejido.

Los resultados obtenidos muestran un incremento en la expresión de mRNA de Ki67 cuando las células son expuestas a elevadas concentraciones de NPs de TiO₂ durante 24 horas y también en las células expuestas a las dos concentraciones utilizadas durante 24 horas y 6 días libres de NPs, El aumento en la proliferación celular concuerda con algunos estudios en donde este es el principal efecto causado por NPs de óxido de cobre en tejido pulmonar (Costa et al., 2018). La exposición crónica a NPs de TiO₂ en células epiteliales de pulmón activan la vía de P53 que hace lenta la progresión del ciclo celular reduciendo la proliferación celular (Armand et al., 2016). Con base en los resultados se sugiere que la exposición a NPs de TiO₂ podría estar involucrada en alteraciones de la proliferación celular. La expresión de aumentó a las bajas concentraciones en tiempos de exposición prolongados. Los

resultados tienen una interpretación limitada, pero coinciden con la sobreexpresión en la proteína surfactante de lavados bronqueoalveolares y suero reportado en ratas expuestas a NPs de TiO_2 (Okada et al., 2019). La expresión del mRNA MMP2 no fue afectada por la exposición a NPs de TiO_2 esto puede deberse a que la exposición tiene mayor impacto en el citoplasma que en la matriz extracelular.

9. Conclusiones

- Las NPs de TiO₂ con un tamaño primario de 25 nm tienen la capacidad de formar aglomerados de 385 nm en medio de cultivo celular suplementado con 10% de SFB, tamaño que puede ser internalizado por las células epiteliales de pulmón.
- Las células epiteliales de pulmón tienen la capacidad de internalizar a las NPs de TiO₂ las cuales se depositaron en el citoplasma de las células de manera concentración dependiente. Además, causaron alteraciones morfológicas en las crestas mitocondriales con los diferentes tratamientos utilizados.
- Las NPs de TiO₂ disminuyeron la viabilidad celular con la concentración más elevada a los 7 días de exposición, sin embargo, la viabilidad de células expuestas durante 24 horas al igual que las células expuestas durante 24 horas y 6 días libres de NPs de TiO₂.
- Las NPs de TiO₂ causan mayor disminución en la polimerización de actina seguida por la tubulina. La exposición continua a NPs de TiO₂ no induce una despolimerización acumulativa en las proteínas del citoesqueleto estudiadas lo cual puede estar atribuido a una respuesta adaptativa.
- La cantidad de tubulina disminuyó en células epiteliales de pulmón expuestas durante 7 días a 10 µg/cm² de NPs de TiO₂, sin embargo, no se observaron cambios en la presencia de actina analizadas por Western Blot.
- La morfología de las células epiteliales de pulmón fue alterada por la exposición a las NPs de TiO₂ causando una disminución en el tamaño celular y un aumento en la granularidad a los diferentes tiempos de exposición.
- La migración de las células epiteliales de pulmón disminuyó de manera significativa después de 24 horas de exposición lo que significa que las alteraciones en la migración celular podrían ser una respuesta tardía de una exposición a NPs de TiO₂.

La expresión de los genes Ki67 y SFTPB incremento a partir de las 24 horas de exposición a NPs de TiO₂. Sin embargo, la exposición a dichas NPs no afectó la expresión de MMP2.

10 Referencias

- Adinolfi B, Pellegrino M, Tombelli S, Trono C, Giannetti A, Domenici C, Varchi G, Sotgiu G, Ballestri M, Baldini F. Polymeric nanoparticles promote endocytosis of a survivin molecular beacon: Localization and fate of nanoparticles and beacon in human A549 cells. *Life Sci.* 2018; 15:106-12.
- Ali K, Ahmed B, Khan MS, Musarrat J. Differential surface contact killing of pristine and low EPS *Pseudomonas aeruginosa* with Aloe vera capped hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles. *J Photochem Photobiol B.* 2018;188:146-58.
- Armand L, Biola-Clier M, Bobyk L, Collin-Faure V, Diemer H, Strub JM, Cianferani S, Van Dorsselaer A, Herlin-Boime N, Rabilloud T, Carriere M. Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view. *J Proteomics.* 2016;134:163-173.
- Armand L, Dagouassat M, Belade E, Simon-Deckers A, Le Gouvello S, Tharabat C, Duprez C, Andujar P, Pairon JC, Boczkowski J, Lanone S. Titanium dioxide nanoparticles induce matrix metalloproteinase 1 in human pulmonary fibroblasts partly via an interleukin-1 β -dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48:354-63.
- Askri D, Cunin V, Ouni S, Béal D, Rachidi W, Sakly M, Amara S, Lehmann SG, Sève M. Effects of Iron Oxide Nanoparticles (γ -Fe₂O₃) on Liver, Lung and Brain Proteomes following Sub-Acute Intranasal Exposure: A New Toxicological Assessment in Rat Model Using iTRAQ-Based Quantitative Proteomics. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20). pii: E5186.
- Chézeau L, Kohlstaedt LA, Le Faou A, Cosnier F, Rihn B, Gaté L. Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in rat exposed to TiO₂ nanostructured aerosol by inhalation. *J Proteomics.* 2019;207:103451.
- Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol.* 2011;697:63-70.
- Corvol H, Rousselet N, Thompson KE, Berdah L, Cottin G, Foussigniere T, Longchamp E, Fiette L, Sage E, Prunier C, Drumm M, Hodges CA, Boëlle PY, Guillot L. FAM13A is a modifier gene of cystic fibrosis lung phenotype regulating rhoa activity, actin cytoskeleton dynamics and epithelial-mesenchymal transition. *J Cyst Fibros.* 2018;17(2):190-203.
- Costa PM, Gosens I, Williams A, Farcas L, Pantano D, Brown DM, Stone V, Cassee FR, Halappanavar S, Fadeel B. Transcriptional profiling reveals gene expression changes associated with inflammation and cell proliferation following short-term inhalation exposure to copper oxide nanoparticles. *J Appl Toxicol.* 2018 Mar;38(3):385-397.

- Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5(7):772-7.
- Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, Nawrocki-Raby B, Lagonotte E, Delepine G, Birembaut P, Gilles C, Polette M. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2013;81(1):117-22.
- Flozak AS, Lam AP, Russell S, Jain M, Peled ON, Sheppard KA, Beri R, Mutlu GM, Budinger GR, Gottardi CJ. Beta-catenin/T-cell factor signaling is activated during lung injury and promotes the survival and migration of alveolar epithelial cells. *J Biol Chem.* 2010;285:3157-67.
- Forth S, Kapoor TM. The mechanics of microtubule networks in cell division. *J Cell Biol.* 2017;216:1525-31.
- Fukunaga Y, Bandoh S, Fujita J, Yang Y, Ueda Y, Hojo S, Dohmoto K, Tojo Y, Takahara J, Ishida T. Expression of cytokeratin 8 in lung cancer cell lines and measurement of serum cytokeratin 8 in lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2002;38(1):31-8.
- Gangwal S, Brown JS, Wang A, Houck KA, Dix DJ, Kavlock RJ, Hubal EA. Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential. *Environ Health Perspect.* 2011;119:1539-46.
- 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;35:1073-85.
- Ghasempour S, Shokrgozar MA, Ghasempour R, Alipour M. Investigating the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro studies. *Exp Toxicol Pathol.* 2015;67:509-15.
- Gheshlaghi ZN, Riazi GH, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(9):777-82.
- Goldmann T, Zissel G, Watz H, Drömann D, Reck M, Kugler C, Rabe KF, Marwitz S. Human alveolar epithelial cells type II are capable of TGF β -dependent epithelial-mesenchymal-transition and collagen-synthesis. *Respir Res.* 2018;19(1):138.
- Gonzalez L, De Santis Puzzon M, Ricci R, Aureli F, Guarguaglini G, Cubadda F, Leyns L, Cundari E, Kirsch-Volders M. Amorphous silica nanoparticles alter microtubule dynamics and cell migration. *Nanotoxicology.* 2015;9:729-36.

- Ishii T, Bandoh S, Fujita J, Ohtsuki Y, Tojo Y, Kanaji N, Fukunaga Y, Ueda Y, Ishida T, Kubo A. Full-length cytokeratin 8 is released and circulates in patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 2008;29(1):57-62.
- Ispanixtlahuatl-Meráz O, Schins RPF, Chirino YI. Cell type specific cytoskeleton disruption induced by engineered nanoparticles. *Environ. Sci. Nano.* 2018;5:228-45.
- Kononenko V, Erman A, Petan T, Križaj 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):419-429.
- Jones JC, Kam CY, Harmon RM, Woychek AV, Hopkinson SB, Green KJ. Intermediate Filaments and the Plasma Membrane. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(1). pii: a025866.
- Karki P, Birukova AA. Microtubules-associated Rac regulation of endothelial barrier: a role of Asef in acute lung injury. *J Investig Med.* 2017;65(8):1089-1092.
- Kashina AS. Regulation of actin isoforms in cellular and developmental processes. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;pii: S1084-9521(18)30321-5.
- Khan P, Fytianos K, Tamò L, Roth M, Tamm M, Geiser T, Gazdhar A, Hostettler KE. Culture of human alveolar epithelial type II cells by sprouting. *Respir Res.* 2018;19:204.
- Kingma PS, Whitsett JA. In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6:277-83.
- Kononenko V, Erman A, Petan T, Križaj 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):419-429.
- Kristó I, Bajusz I, Bajusz C, Borkúti P, Vilmos P. Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus. *Histochem Cell Biol.* 2016;145(4):373-88.
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985;79:179-92.
- Li B, Ze Y, Sun Q, Zhang T, Sang X, Cui Y, Wang X, Gui S, Tan D, Zhu M, Zhao X, Sheng L, Wang L, Hong F, Tang M. Molecular mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced pulmonary injury in mice. *PLoS One.* 2013;8:e55563.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

- Madsen J, Kliem A, Tornøe I, Skjødtt K, Koch C, Holmskov U. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol*. 2000;164:5866-70.
- Magdolenova Z, Bilaničová D, Pojana G, Fjellsbø LM, Hudecova A, Hasplova K, Marcomini A, Dusinska M. Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity. *J Environ Monit*. 2012;14:455-64.
- Mao Z, Xu B, Ji X, Zhou K, Zhang X, Chen M, Han X, Tang Q, Wang X, Xia Y. Titanium dioxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the microtubule dynamics. *Nanoscale*. 2015;7(18):8466-75.
- Moujaber O, Stochaj U. The Cytoskeleton as Regulator of Cell Signaling Pathways. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(2):96-107.
- Murugan K, Choonara YE, Kumar P, Bijukumar D, du Toit LC, Pillay V. Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:2191-206.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005;113:823-39.
- Okada T, Lee BW, Ogami A, Oyabu T, Myojo T. Inhalation of titanium dioxide (P25) nanoparticles to rats and changes in surfactant protein (SP-D) levels in bronchoalveolar lavage fluid and serum. *Nanotoxicology*. 2019;13(10):1396-1408.
- Paluch E, Heisenberg CP. Biology and physics of cell shape changes in development. *Curr Biol*. 2009;19: 790-9.
- Pitchaimani A, Nguyen TDT, Koirala M, Zhang Y, Aryal S. Impact of cell adhesion and migration on nanoparticle uptake and cellular toxicity. *Toxicol In Vitro*. 2017;43:29-39.
- Povea-Cabello S, Oropesa-Ávila M, de la Cruz-Ojeda P, Villanueva-Paz M, de la Mata M, Suárez-Rivero JM, Álvarez-Córdoba M, Villalón-García I, Cotán D, Ybot- González P, Sánchez-Alcázar JA. Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis. *Int J Mol Sci*. 2017;18: pii E2393.
- Qin Y, Chen K, Gu W, Dong X, Lei R, Chang Y, Bai X, Xia S, Zeng L, Zhang J, Ma S, Li J, Li S, Xing G. Small size fullerene nanoparticles suppress lung metastasis of breast cancer cell by disrupting actin dynamics. *J Nanobiotechnology*. 2018;16:54.
- Roostalu J, Surrey T. Microtubule nucleation: beyond the template. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(11):702-710.

- Rounds S, Lu Q. Cigarette smoke alters lung vascular permeability and endothelial barrier function (2017 Grover Conference Series). *Pulm Circ.* 2018;8(3):2045894018794000.
- Sanghvi-Shah R, Weber GF. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:81.
- Schneider J, Walter D, Brückel B, Rödelsperger K. Primary particles and their agglomerate formation as modifying risk factors of nonfibrous nanosized dust. *J Toxicol Environ Health A.* 2013;76(2):131-41.
- Stanganello E, Zahavi EE, Burute M, Smits J, Jordens I, Maurice MM, Kapitein LC, Hoogenraad CC. Wnt Signaling Directs Neuronal Polarity and Axonal Growth. *iScience.* 2019;13:318-327.
- Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2018;28:776-92.
- Sun M, Zaman MH. Modeling, signaling and cytoskeleton dynamics: integrated modeling-experimental frameworks in cell migration. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2017;9.
- Sund J, Palomäki J, Ahonen N, Savolainen K, Alenius H, Puustinen A. Phagocytosis of nano-sized titanium dioxide triggers changes in protein acetylation. *J Proteomics.* 2014;108:469-83.
- Svitkina T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(1). pii: a018267.
- Tang DD, Gerlach BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res.* 2017;18:54.
- Thai SF, Wallace KA, Jones CP, Ren H, Prasad RY, Ward WO, Kohan MJ, Blackman CF. Signaling Pathways and MicroRNA Changes in Nano-TiO₂ Treated Human Lung Epithelial (BEAS-2B) Cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015;15:492-503.
- Tilley AE, Walters MS, Shaykhiev R, Crystal RG. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:379-406.
- van Vuuren RJ, Botes M, Jurgens T, Joubert AM, van den Bout I. Novel sulphamoylated 2-methoxy estradiol derivatives inhibit breast cancer migration by disrupting microtubule turnover and organization. *Cancer Cell Int.* 2019;19:1.
- van Buul JD, Timmerman I. Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions. *Small GTPases.* 2016;7:21-31.

- Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol.* 1978;126(4):783-802.
- Vieira LFA, Lins MP, Viana IMM, Dos Santos JE, Smaniotto S, Reis MDDS. Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro. *Nanoscale Res Lett.* 2017;12:200.
- Virtanen JA, Vartiainen MK. Diverse functions for different forms of nuclear actin. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;46:33-38.
- Warheit DB, Donner EM. Risk assessment strategies for nanoscale and fine-sized titanium dioxide particles: Recognizing hazard and exposure issues. *Food Chem Toxicol.* 2015;85:138-47.
- Wen J, Zhao Z, Tong R, Huang L, Miao Y, Wu J. Prussian Blue Nanoparticle-Labeled Mesenchymal Stem Cells: Evaluation of Cell Viability, Proliferation, Migration, Differentiation, Cytoskeleton, and Protein Expression In Vitro. *Nanoscale Res Lett.* 2018; 22;13:329.
- Wu Y, Ali MRK, Dong B, Han T, Chen K, Chen J, Tang Y, Fang N, Wang F, El-Sayed MA. Gold Nanorod Photothermal Therapy Alters Cell Junctions and Actin Network in Inhibiting Cancer Cell Collective Migration. *ACS Nano.* 2018;12:9279- 90.
- Willmann W, Dringen R. Monitoring of the Cytoskeleton-Dependent Intracellular Trafficking of Fluorescent Iron Oxide Nanoparticles by Nanoparticle Pulse-Chase Experiments in C6 Glioma Cells. *Neurochem Res.* 2018;43(11):2055-2071.
- Yi H, Ku NO. Intermediate filaments of the lung. *Histochem Cell Biol.* 2013;140(1):65-9.
- Yu KN, Chang SH, Park SJ, Lim J, Lee J, Yoon TJ, Kim JS, Cho MH. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death via Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane Disruption in Normal Lung Cells. *PLoS One.* 2015;10(6):e0131208.
- Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1429-37.
- Zhang X, Li W, Yang Z. Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Arch Toxicol.* 2015;89:2207-17.

Apéndice

-AGRADECIMIENTOS

-PUBLICACIONES INTERNACIONALES
CON AGRADECIMIENTO AL PDCB



Agradecimientos

Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 268769), el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN224119) y el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) del cual fui becario de CONACyT con número de beca 582547.

Agradezco la participación y colaboración de:

-Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

-Dra. Yesennia Sánchez-Pérez y Dra Claudia M. García-Cuéllar. Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.

-Dra. Adriana Ganem-Rondero. División de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

-Dr. José O. Flores-Flores. Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

-Dr. Gustavo J. Vázquez-Zapién y Dra. Mónica M. Mata-Miranda. Laboratorio de Embriología, Escuela Militar de Medicina, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional.

-Dra. María del Pilar Ramos-Godinez. Departamento de Microscopía Electrónica, Instituto Nacional de Cancerología.

Publicaciones con agradecimiento al PDCB

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, Tlalnepanla, 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, Tlalnepanla 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 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/mrd.22657

Mol. Reprod. Dev. 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

(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

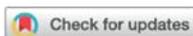
compared by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test. Differences at $*P < 0.05$ were considered significant.

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, Mattheij NJ, Cosemans JM, Collins PW, Heemskerck 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.
- Baltierrez-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, Shtemall 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, Pemier 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.



Cite this: *Environ. Sci.: Nano*, 2019, 6, 286

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,^{†a} Alejandro Déciga-Alcaraz,^{†a} Verónica Freyre-Fonseca,^{†a} José O. Flores-Flores,[†] Rogelio Hernández-Pando,^c Jorge Barrios-Payán,^c Julio C. Carrero,^d Yesennia Sánchez-Pérez,^{†e} Claudia M. García-Cuéllar,^{†e} Felipe Vaca-Paniagua^{†e,f} and Yolanda I. Chirino^{†*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.

^aLaboratorio 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: irusomachirino@gmail.com; Tel: +52 55 56231333

^bInstituto 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

^cSección 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

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

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

^fLaboratorio 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. Hyttiäinen, 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.

RESEARCH ARTICLE

Food-grade titanium dioxide (E171) by solid or liquid matrix administration induces inflammation, germ cells sloughing in seminiferous tubules and blood-testis barrier disruption in mice

Juan Carlos Rodríguez-Escamilla¹ | Estefany I. Medina-Reyes^{1,2} |
Carolina Rodríguez-Ibarra^{1,2} | Alejandro Déciga-Alcaraz^{1,2} | José O. Flores-Flores³ |
Adriana Ganem-Rondero⁴ | Miriam Rodríguez-Sosa¹ | Luis I. Terrazas¹ |
Norma L. Delgado-Buenrostro¹ | Yolanda I. Chirino¹

¹Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalhepantla, Estado de México, México

²Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

³Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México

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

Correspondence

Norma L. Delgado-Buenrostro and Yolanda I. Chirino, Laboratorio de Carcinogénesis y Toxicología, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de Los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalhepantla 54090, Estado de México, México.
Email: nlbuenrostro@gmail.com; irasemachirino@gmail.com

Funding information

National Council of Science and Technology, Grant/Award Number: 268769; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Grant/Award Number: PAPIIT RN224119

Abstract

Food-grade titanium dioxide labeled as E171 has been approved for human consumption by the Food and Drug Administration (USA) and by the European Union for five decades. However, titanium dioxide has been classified as a possible carcinogen for humans by the International Agency of Research in Cancer raising concerns of its oral intake and the translocation to bloodstream, which could disturb barriers such as the blood-testis barrier. There is evidence that titanium dioxide by intragastric/intraperitoneal/intravenous administration induced alterations on testosterone levels, testicular function and architecture, but studies of the E171 effects on the testicle structure and blood-testis barrier are limited. E171 is contained not only in foods in liquid matrix but also in solid ones, which can exert different biological effects. We aimed to compare the effects of E171 consumption in a solid matrix (0.1%, 0.5% and 1% in pellets) and liquid suspension (5 mg/kg body weight) on testis structure, inflammation infiltrate and blood-testis barrier disruption of male BALB/c mice. Results showed that none of the administration routes had influence on body weight but an increase in germ cell sloughing and the infiltrate of inflammatory cells in seminiferous tubules, together with disruption of the blood-testis barrier were similar in testis of both groups even if the dose received in mice in liquid matrix was 136 or 260 times lower than the dose reached by oral intake in solid E171 pellets in 0.5% E171 and 1% E171, respectively. This study highlights the attention on matrix food containing E171 and possible adverse effects on testis when E171 is consumed in a liquid matrix.

KEYWORDS

blood-testis barrier, cell sloughing, E171, epithelium detachment, seminiferous tubules, titanium dioxide food grade

5 | CONCLUSIONS

The daily dose reached by the consumption of re-baked pellets containing 0.1% E171, 0.5% E171 and 1% E171 was 102, 682 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 the body weight of mice during the study. Interestingly, regardless of the dose reached, both types of E171 administration, the oral consumption at doses of 682 and 1379 mg/kg bw or the intragastric administration of 5 mg/kg bw, induced germ cell sloughing and increased MHC-II expression, which demonstrated inflammatory cell infiltration in the testis. The decrease of N-cadherin and collagen type I was also found in both types of administration indicating disruption of the blood-testis barrier (effects summarized in Table 4). This means that similar effects in the testis that were reached in spite of the solid matrix were 136 times higher than the liquid matrix.

This study highlights the importance of the matrix of E171 consumption, and liquid foods might have greater biological effects than expected. Finally, as children have a higher E171 consumption, this could lead to longer E171 exposure, which could affect spermatozoa function or fertility during adulthood.

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 with a grant from 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 fellowships 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 to Biologist Tomás Ernesto Villamar Duque, MVZ María Leticia Flores Sánchez and M. en C. Fernando Barrón Moreno for their help in the animal facilities. We also thank Federico Castro-Muñoz Ledo from the Department of Cell Biology from the Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN for the antibodies provided to perform occludin and ZO-1 assays.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to report.

ORCID

Estefany I. Medina-Reyes  <https://orcid.org/0000-0002-6658-2870>
Carolina Rodríguez-Ibarra  <https://orcid.org/0000-0002-7839-9168>
Alejandro Déciga-Alcaraz  <https://orcid.org/0000-0002-9045-2590>
José O. Flores-Flores  <https://orcid.org/0000-0001-8007-2204>
Adriana Ganem-Rondero  <https://orcid.org/0000-0001-6516-5832>

Miriam Rodríguez-Sosa  <https://orcid.org/0000-0003-2911-9390>
Luis I. Terrazas  <https://orcid.org/0000-0003-1635-9467>
Norma L. Delgado-Buenrostro  <https://orcid.org/0000-0002-9528-8750>
Yolanda I. Chirino  <https://orcid.org/0000-0001-6627-3392>

REFERENCES

- Asadpour, R., Shahbazfar, A. A., Kianifard, D., Azari, M., & Zaboli, N. (2013). Comparison of the protective effects of garlic (*Allium sativum* L.) extract, vitamin E and N acetyl cystein on testis structure and sperm quality in rats treated with lead acetate. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164(1), 27–33.
- Ault, A. P., Stark, D. I., Axson, J. L., Keeney, J. N., Maynard, A. D., Bergin, I. L., & Philbert, M. A. (2016). Protein corona-induced modification of silver nanoparticle aggregation in simulated gastric fluid. *Environmental Science: Nano*, 3(6), 1510–1520. <https://doi.org/10.1039/C6EN00278A>
- Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., ... Houdeau, E. (2017). Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific Reports*, 7(40373). <https://doi.org/10.1038/srep40373>
- Blanco-Rodríguez, J., & Martínez-García, C. (1998). Apoptosis precedes detachment of germ cells from the seminiferous epithelium after hormone suppression by short-term oestradiol treatment of rats. *International Journal of Andrology*, 21(2), 109–115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1998.00109.x>
- Braun, J. H. (1997). Titanium dioxide—A review. *Journal of Coatings Technology*, 69(868), 59–72. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68883>
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., & Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, 388(6644), 782–787. <https://doi.org/10.1038/42030>
- DeFalco, T., Potter, S. J., Williams, A. V., Waller, B., Kan, M. J., & Capel, B. (2015). Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. *Cell Reports*, 12(7), 1107–1119. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.015>
- Disdier, C., Chalansonnet, M., Gagnaire, F., Gaté, L., Cosnier, F., Devoy, J., ... Mabondzo, A. (2017). Brain inflammation, blood brain barrier dysfunction and neuronal synaptophysin decrease after inhalation exposure to titanium dioxide nano-aerosol in aging rats. *Scientific Reports*, 7(1), 12196. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12404-5>
- Elmagar, A. M. B., Ibrahim, A., & Soliman, A. M. (2018). Histopathological effects of titanium dioxide nanoparticles and the possible protective role of N-acetylcysteine on the testes of male albino rats. *International Journal of Fertility & Sterility*, 12(3), 249–256. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2018.5389>
- El-Missiry, M. A., Fayed, H., Othman, A. I., Gouida, M. S., Shabana, S., & Khalifa, E. (2017). Testicular injury and apoptosis in sperm through oxidative stress-activated mitochondrial and deathreceptor pathways. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 3(11), 517–525.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2016). Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA Journal*, 14(9), 4545. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4545>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2018). Evaluation of four new studies on the potential toxicity of titanium dioxide used as a food additive (E 171). *EFSA Journal*, 16(7), 5366. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5366>
- Faust, J. J., Doudrick, K., Yang, Y., Capco, D. G., & Westerhoff, P. (2016). A facile method for separating and enriching nano and submicron



Mini review

International landscape of limits and recommendations for occupational exposure to engineered nanomaterials



Carolina Rodríguez-Ibarra^{a,b}, Alejandro Déciga-Alcaraz^{a,b}, Octavio Ispanixtlahuatl-Meráz^{a,b}, Estefany I. Medina-Reyes^{a,b}, Norma L. Delgado-Buenrostro^a, Yolanda I. Chirino^{a,*}

^aLaboratorio 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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Engineered nanomaterials
Regulatory agencies
Nanotoxicology
Occupational exposure limits

ABSTRACT

The increasing concern of possible adverse effects on human health derived from occupational engineered nanomaterials (ENMs) exposure is an issue addressed by entities related to provide guidelines and/or protocols for ENMs regulation. Here we analysed 17 entities from America, Europe and Asia, and some of these entities provide limits of exposure extrapolated from the non-nanosized counterparts of ENMs. The international landscape shows that recommendations are mostly made for metal oxide based ENMs and tonnage is one of the main criteria for ENMs registration, however, sub-nanometric ENMs are emerging and perhaps a novel category of ENMs will appear soon. We identify that besides the lack of epidemiological evidence of ENMs toxicity in humans and difficulties in analysing the toxicological data derived from experimental models, the lack of information on airborne concentrations of ENMs in occupational settings is an important limitation to improve the experimental designs. The development of regulations related to ENMs exposure would lead to provide safer work places for ENMs production without delaying the nanotechnology progress but will also help to protect the environment by taking opportune and correct measures for nanowaste, considering that this could be a great environmental problem in the coming future.

1. Introduction

Nanomaterials are natural, incidental or manufactured particles with at least one dimension sized in nanometric scale between 1 and 100 nm in an unbound state or as an aggregate/agglomerate and where, 50 % or more of the particles are in the nanometric distribution, according to the definition adopted by the European Commission (2017) (EU; https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm; a number of definitions are already collected by Garduño-Balderas et al., 2015). ENMs applications have exceeded expectations of technology innovation in a broad spectrum of fields including biomedicine, food industry, agriculture, wearable electronics, waste water treatment, fuel industry, longer lasting batteries and electronic components in satellites and aircraft (Mirri et al., 2016; Medina-Reyes et al., 2017; Bishoge et al., 2018; Jayathilaka et al., 2019). However, the main concern of ENMs exposure is the potential hazard for workers in occupational settings and through foods, personal care products and medicines containing ENMs for consumers, however

even if the safety is still uncertain, the research of novel applications of ENMs is increasing. Furthermore, prediction of ENMs toxicity is still unreachable since risk assessment used for other chemicals is not applicable to ENMs but still efforts for prediction of toxicity are being developed (Choi et al., 2018; Jha et al., 2018; Lorent et al., 2018).

According to PubMed database, over 25,000 papers published are linked to ENMs applications while less than 3 % are related to ENMs occupational safety (Fig. 1). However, it has been well described that nanoparticles induce toxicity at subcellular, cellular, tissue and organ level in diverse experimental models. For instance, after exposure to nanoparticles by inhalation these are deposited in the deep lung (Okada et al., 2019; Lee et al., 2019) while microparticles are retained in the bronchial area (El-Sherbiny et al., 2015). In order to clear the airways, the nanoparticles are carried to the blood-stream and consequently are deposited in other organs such as liver, spleen and has been described to reach the brain, testis and embryo since nanoparticles are able to cross the blood-brain barrier, the blood-testis barrier and placenta (Larson et al., 2014; Wang et al., 2018). Additionally, at cellular level

* Corresponding author at: 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, Mexico.

E-mail addresses: irasemachirino@gmail.com, chirino@campus.iztacala.unam.mx (Y.I. Chirino).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.01.016>

Received 23 September 2019; Received in revised form 24 December 2019; Accepted 21 January 2020

Available online 22 January 2020

0378-4274/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

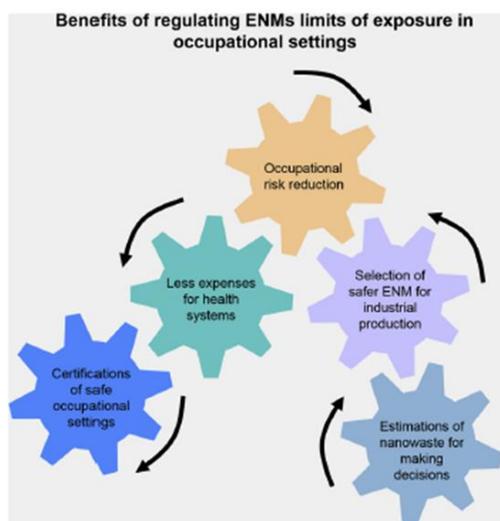


Fig. 4. Benefits of regulating exposure to ENMs. Regulations concerning to ENMs exposure in occupational settings would reduce the health risk of personnel exposed to ENMs providing at the same time, safer workplaces. In addition, it would help for selecting safer ENMs for production and for making nanowaste estimation. Later, it could contribute to decrease the health expenses for companies and governments.

TSCA according to the EPA. Some important criteria to register novel ENMs include tonnage, physicochemical properties, production volume, exposure information, and available health and safety data. In addition, based on the information delivered by 17 entities analysed here, we identified that there are some entities that do not establish limits of exposure of ENMs but consider the bulk material as a reference for recommendations. For instance, limits of exposure recommended for titanium dioxide, are based on limits established for microsized or fine particles according to ACGIH (USA), NEDO (Japan), NIOSH (USA) and the SE (Mexico). These limits might be applicable to nanosized titanium dioxide manufactured nowadays. In general terms, the metal oxide ENMs and carbon based ENMs are the most advanced in terms of limits of exposure.

We identified possible key points for regulation that include, 1) to uniform the criteria for registration. In this regard, perhaps an exhaustive physicochemical characterization plus tonnage might be considered together. 2) Priority for the potential ENMs to be produced at industrial scale, for instance, all types of carbon based ENMs, any type of ENMs shaped as fibers. 3) To encourage occupational settings to measure airborne ENMs in the occupational settings and make public this information. This information will also be necessary for toxicologists in order to improve experimental designs. 4) To speculate about safety of future ENMs for instance, sub-nanometric ENMs, which are already under development, at least gold and graphene (Alves et al., 2011; Sakaguchi et al., 2014). In addition, the benefits of regulating ENMs in occupational settings could impact three important sectors including industrial economy, occupational health and environmental safety (Fig. 4).

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This project was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN224119). GRI, ADA, OIM and EIMR are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM and received fellowships 626239, 582547, 599447 and 576227 respectively, from CONACYT. We thank Natalie Jimenez Barrios for her contribution to this paper.

References

- ACGIH, 2016. Defining the Science of Occupational and Environmental Health. <https://www.acgih.org/forms/store/ProductFormPublic/>.
- Alves, L., Ballesteros, B., Boronat, M., Cabrero-Antonino, J.R., Concepción, P., Corma, A., Correa-Duarte, M.A., Mendoza, E., 2011. Synthesis and stabilization of subnanometric gold oxide nanoparticles on multiwalled carbon nanotubes and their catalytic activity. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (26), 10251–10261. <https://doi.org/10.1021/ja202862k>.
- ANSES French Agency for Food, 2019. Environmental and Occupational Health & Safety France. <https://www.anses.fr/fr/system/files/AP2008sa0407R%20aEN.pdf>.
- Assessment of Impacts of a European Register of Products Containing Nanomaterials. 2014. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte_23_2014_assessment_of_impacts_of_a_european_register_of_products_containing_nanomaterials-schwirn.pdf.
- Bishoge, O.K., Zhang, L., Suntu, S.L., Jin, H., Zewde, A.A., Qi, Z., 2018. Remediation of water and wastewater by using engineered nanomaterials: a review. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Subst. Environ. Eng.* 53 (6), 537–554. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1424991>.
- Choi, J.S., Ha, M.K., Trinh, T.X., Yoon, T.H., Byun, H.G., 2018. Towards a generalized toxicity prediction model for oxide nanomaterials using integrated data from different sources. *Sci. Rep.* 8 (1), 6110. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24483-z>.
- Commission regulation (EU), 2018. 2018/1881. Official Journal of the European Union NIA Nanotechnology Industries Association, Regulations 4.12.2018.
- Corvi, R., Madia, F., 2017. In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? *Food Chem. Toxicol.* 106 (Pt B), 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.024>.
- Deveau, M., Chen, C.P., Johanson, G., Krewski, D., Maier, A., Niven, K.J., Ripple, S., Schulte, P.A., Silk, J., Urbanus, J.H., Zalk, D.M., Niemeier, R.W., 2015. The global landscape of occupational exposure limits—implementation of harmonization principles to guide limit selection. *J. Occup. Environ. Hyg.* 12 (1), S127–S144. <https://doi.org/10.1080/15459624.2015.1060327>.
- Dudofol, W., Terrisse, H., Popa, A.F., Gautron, E., Humbert, B., Ropers, M.H., 2018. Evaluation of the content of TiO₂ nanoparticles in the coatings of chewing gums. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 35 (2), 211–221. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1384576>.
- ECHA, 2018. Nanomaterials. <https://echa.europa.eu/regulations/nanomaterials>.
- EFSA, 2019. European Food Safety Authority. https://europea.eu/european-union/about-eu/agencies/efsa_es.
- El-Sherbiny, I.M., El-Baz, N.M., Yacoub, M.H., 2015. Inhaled nano- and microparticles for drug delivery. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2015, 2. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2015.2>.
- EPA United States Environmental Protection Agency, 2017. Reviewing New Chemicals under the Toxic Substances Control Act (TSCA). Control of Nanoscale Materials under the Toxic Substances Control Act. <https://www.epa.gov/reviewing-new-chemicals-under-toxic-substances-control-act-tsca/control-nanoscale-materials-under>.
- European Commission, 2017. Commission Staff Working Document Impact Assessment Impact Assessment C(2017)2628:1-79 Final. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm.
- Forest, V., Leclerc, L., Hocheppied, J.F., Trounev, A., Sarry, G., Pourchez, J., 2017. Impact of cerium oxide nanoparticles shape on their in vitro cellular toxicity. *Toxicol. In Vitro* 38 (1), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.022>.
- Garduño-Baldems, L.G., Urrutia-Ortega, I.M., Medina-Reyes, E.L., Chirino, Y.I., 2015. Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an imbalance between benefits and risks. *J. Appl. Toxicol.* 35 (1), 1073–1085. <https://doi.org/10.1002/jat.3180>.
- Government of Canada Consultation document: prioritization approach for nanoscale forms of substances on the Domestic Substances List. 2016. <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/canadian-environmental-protection-act-registry/consultation-document-prioritization-approach-nanoscale.html>.
- Grosse, Y., Loomis, D., Guyton, K.Z., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., Straif, K., 2014. International agency for research on cancer monograph working group. *Lancet Oncol.* 15 (13), 1427–1428. [https://doi.org/10.1016/S1473-0245\(14\)7109-X](https://doi.org/10.1016/S1473-0245(14)7109-X).



Differences in cytotoxicity of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanofibers and nanoparticles: Comparison of air-liquid interface and submerged cell cultures



Estefany I. Medina-Reyes^{a,*}, Norma L. Delgado-Buenrostro^a, Daan L. Leseman^b,
Alejandro Déciga-Alcaraz^{a,1}, Ruiwen He^{b,d}, Eric R. Gremmer^b, Paul H.B. Fokkens^b,
José O. Flores-Flores^c, Flemming R. Cassee^{b,d}, Yolanda I. Chirino^a

^aLaboratorio de Carcinogénesis y Toxicología, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, Mexico

^bNational Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands

^cInstituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510 Ciudad de México, Mexico

^dInstitute of Risk Assessment Sciences, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands

ARTICLE INFO

Keywords:

Air liquid interface system
TiO₂ nanofibers
DNA damage
TiO₂ nanoparticles
ROS production
Cytotoxicity

ABSTRACT

Air Liquid Interface (ALI) system has emerged as a useful tool for toxicity evaluation of nanomaterials related to inhalation since the system mimics the aerosol exposure. We compared the biological responses of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide (TiO₂) nanofibers and nanoparticles in ALI and submerged cell cultures systems. Cells were exposed to 2 and 10 µg/cm² for 24 h, 48 h and 72 h and LDH release, TiO₂ internalization, DNA-double strand breaks (DSBs) and ROS production were assessed. LDH release was similar in both systems and particles had higher cytoplasmic uptake in submerged systems. Both TiO₂ types were located in the cytoplasm but nanofibers had nuclear uptake regardless to the system tested. Cells exposed to TiO₂ nanofibers had higher DSBs in the ALI system than in submerged cell cultures but cells exposed to TiO₂ nanoparticles had similar DSBs in both systems. ROS production was higher in cells exposed to TiO₂ nanofibers compared to cells exposed to TiO₂ nanoparticles. In conclusion, cytotoxicity of lung epithelial cells was similar in ALI or submerged cell cultures, however cells exposed to TiO₂ nanofibers displayed higher toxicity than cells exposed to TiO₂ nanoparticles.

1. Introduction

Inhalation and respiratory toxicology of particles has been dealing with the fact that lung epithelium is operating at air-liquid interface and exposure to particles occur as via aerosols interacting via lung surfactant. However, these conditions are not entirely realistic in traditional submerged cell cultures, in which particles are immersed in a relatively large volume of liquid cell culture medium while in the air liquid interface (ALI) system the nanoparticles exposure occurs through an aerosol resulting in a more realistic physiology. In ALI system, cells are in contact with a gas phase on the apical side and with an aqueous phase in the basolateral side simulating the lung physiological conditions. One of the main differences between submerged cell cultures and

ALI is that nanoparticles interact with cell culture medium components and agglomerate in submerged cell cultures while in ALI, nanoparticles are delivered as an aerosol with low degree of agglomeration (Lacroix et al., 2018) and this is important because agglomerate state impacts biological effects, for instance agglomerates with higher size are internalized by macropinocytosis and cause less toxicity than smaller agglomerates, which in addition are internalized by other cell uptake mechanisms such as clathrin or caveolin-mediated internalization and pinocytosis clathrin-mediated (Wojcieszek et al., 2019; Xia et al., 2019; Gutierrez et al., 2015; Huerta-García et al., 2015; Thurn et al., 2011). The particle shape also impacts on biological responses, for instance, amorphous or spherical particles display lower toxicity compared with their fibrous counterparts with same chemical composition (Abdelgied

* Corresponding author at: Laboratorio 10, Carcinogénesis y Toxicología, 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, Mexico.

E-mail address: medinaingrid0@gmail.com (E.I. Medina-Reyes).

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104798>

Received 30 October 2019; Received in revised form 16 January 2020; Accepted 13 February 2020

Available online 19 February 2020

0887-2333/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

4. Discussion

Submerged cell cultures have been used extensively for in vitro toxicology. Recently, ALI model has emerged as a closer physiological system that mimics exposure in gaseous and liquid phases. We found that exposure to TiO₂ nanofibers and nanoparticles displays similar toxicity both the ALI and submerged cell cultures, at least for the parameters assessed in this study using lung epithelial A549 cells. Additionally, we detected for the first time that TiO₂ nanofibers were located into the nucleus in cells exposed by ALI or submerged cell cultures.

Data obtained by using an ALI exposure system might represent a more realistic evidence of effects of TiO₂ particles exposure, however, comparison of toxicity induced by TiO₂ nanofibers and nanoparticles exposed in ALI and submerged cell cultures was not utterly different. The most important difference between the systems was the particle deposition. We found that less particle deposits were located into the cytoplasm of cells exposed through ALI compared with submerged cell cultures regardless of the type of TiO₂. However, higher particle uptake in submerged cell cultures was not related to higher cytotoxicity or DNA damage. Indeed, no cytotoxicity was detected in cells exposed to TiO₂ nanoparticles in both ALI and submerged cell cultures in spite of the high particle accumulation in cells exposed through submerged cell cultures.

Toxic effects induced by nano-sized particles are associated with their physicochemical characteristics such as hydrodynamic size, zeta potential, protein corona and surface charge among others, and those characteristics are strongly related to the interaction between the particle and dispersion media (Fröhlich, 2012; Bhattacharjee et al., 2013). In this study we evaluated the hydrodynamic size and zeta potential of TiO₂ nanofibers and TiO₂ nanoparticles dispersed in cell culture medium and ultrapure water. For both shapes of particles, the hydrodynamic size was higher in cell culture medium compared with ultrapure water, which could be attributed to the interaction between the particles and proteins contained in the medium (Ritz et al., 2015). We suggest that this protein interaction, which occurs in submerged cell cultures only helped for particle uptake and could even decrease their toxicity.

In terms of biological response, TiO₂ nanofibers display higher toxicity than nanoparticles regardless to exposure method. If ALI represents a more physiological model, it would be possible two scenarios: 1) that submerged cell cultures overestimate the cytotoxicity for TiO₂ particles and perhaps for other shapes of nano-sized particles and this overestimation could be related to a higher particle deposition; and 2) that particle interaction with proteins and cell culture medium components dismiss the cytotoxicity for TiO₂ particles. Regarding to this, we found that a higher rate of TiO₂ nanofibers uptake in submerged cell cultures did not correlate with higher cytotoxicity, indeed lower nanofiber deposits were detected in cells exposed by ALI and higher LDH release and DNA damage were found. Differences in toxicity of cells exposed to nano-sized particles using ALI and submerged cell cultures have been reported by others. For instance, lung adenocarcinoma cells exposed to silica nanoparticles showed higher cytotoxicity (LDH and IL-8 release were 2-fold and 3.9-fold higher) in submerged cell cultures even if cells were treated with a lower concentration of silica nanoparticles compared to ALI (Panas et al., 2014). Oppositely, lung adenocarcinoma cells exposed to zinc nanoparticles in ALI showed higher inflammatory markers (IL-8 release and IL-6) than submerged cell cultures (Lenz et al., 2013).

On another hand, we demonstrated by orthogonal images that cells exposed to TiO₂ nanofibers in ALI or submerged cell cultures showed particles into the nucleus while cells exposed to TiO₂ nanoparticles showed nearby and perinuclear particles. This is the first time that TiO₂ nanofibers are shown into the nucleus. The fibers used in this study had 3 μm length at maximum as dry material and we suggest that shorter nanofibers or nano-sized particles that are not uptake by vesicles it

might be possible to reach the nucleus. By contrast, TiO₂ nanoparticles internalized by endocytosis, pinocytosis and clathrin-mediated among others might avoid nuclear entry. Further analysis to explore nuclear location of other type of fibers, mechanism of nuclear entrance and nuclear disturbances need to be performed. However, the higher DNA damage found in cells exposed to TiO₂ nanofibers could be attributed to the nuclear location in spite of low cell uptake by ALI exposure.

On the other hand, the results from this study might be restricted to lung epithelial transformed cells and a different outcome could be found in other cell lineages, for instance primary human bronchial epithelial cells because this cell line drives to a mucociliary phenotype, which is even a more realistic in vitro system representative of the in vivo airways.

5. Conclusions

Cytotoxicity of TiO₂ nanofibers and nanoparticles was similar in lung epithelial cells exposed in ALI and submerged cell cultures. The TiO₂ nanofibers and nanoparticles had predominant cytoplasmic location and the uptake was higher in submerged cell cultures than in ALI system. Only TiO₂ nanofibers were located into the nucleus regardless to the system of exposure. We expected higher cytotoxicity in cells with larger uptake, however, TiO₂ nanofibers had low uptake and high toxicity in ALI system, while larger TiO₂ nanofibers internalization in submerged cell cultures had lower cytotoxicity. As we hypothesized, TiO₂ nanofibers showed higher cytotoxicity than TiO₂ nanoparticles regardless to the ALI or submerged cells cultures. Finally, ALI or submerged cells cultures seem suitable for TiO₂ nanofibers or TiO₂ nanoparticles cytotoxicity testing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This project was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN224119) and National Council of Science and Technology (CONACyT 268769). EIMR and ADA are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 576227 and 582547, respectively, from CONACyT. We thank Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) from Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT, UNAM) for the scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. EIMR received an additional fellowship from Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) to perform part of the experiments at RIVM.

References

- Abdelgied, M., El-Gazzar, A.M., Alexander, D.B., Alexander, W.T., Numano, T., Iigou, M., Naiki-Ito, A., Takase, H., Abdou, K.A., Hirose, A., Taquahashi, Y., Kanno, J., Abdelhamid, M., Tsuda, H., Takahashi, S., 2019. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. *Arch. Toxicol.* 93 (4), 909–920.
- Bhattacharjee, S., Rietjens, I.M., Singh, M.P., Atkins, T.M., Purkait, T.K., Xu, Z., Regli, S., Shukaliak, A., Clark, R.J., Mitchell, B.S., Alink, G.M., Marcellis, A.T., Fink, M.J., Veinot, J.G., Kauzlarich, S.M., Zuilhof, H., 2013. Cytotoxicity of surface-functionalized silicon and germanium nanoparticles: the dominant role of surface charges. *Nanoscale* 5 (11), 4870–4883.
- Bonner, J.C., Silva, R.M., Taylor, A.J., Brown, J.M., Hilderbrand, S.C., Castranova, V., Porter, D., Elder, A., Oberdorster, G., Harkema, J.R., Bramble, L.A., Kavanagh, T.J., Botta, D., Nel, A., Pinkerton, K.E., 2013. Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO consortium. *Environ. Health Perspect.* 121 (6), 676–682.
- Chézeau, L., Sébillaud, S., Safar, R., Seidel, C., Dembêlé, D., Lorcin, M., Langlais, C.,



Irreversible disruption of the cytoskeleton as induced by non-cytotoxic exposure to titanium dioxide nanoparticles in lung epithelial cells



Alejandro Déciga-Alcaraz^{a,b}, Norma L. Delgado-Buenrostro^{a,c}, Octavio Ispanixtlahuatl-Meráz^{a,b}, Verónica Freyre-Fonseca^a, José O. Flores-Flores^d, Adriana Ganem-Rondero^e, Felipe Vaca-Paniagua^{a,f}, María del Pilar Ramos-Godínez^g, Rocío Morales-Barcenás^f, Yesennia Sánchez-Pérez^f, Claudia M. García-Cuéllar^f, Yolanda I. Chirino^{a,**}

^aUnidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, CP 54090, Estado de México, México

^bPrograma de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Unidad de Posgrado Edificio B, Primer Piso, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510, Ciudad de México, México

^cDivisión de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, CP 54740, Estado de México, México

^dInstituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510, Ciudad de México, México

^eDivisión de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, CP 54740, Estado de México, México

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

^gDepartamento de Microscopía Electrónica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22, Colonia Sección XVI, Tlalpan, C.P. 14080, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Cytoskeleton
Tubulin
Actin
Titanium dioxide nanoparticles
Cell migration

ABSTRACT

Exposure to TiO₂ NPs induces several cellular alterations after NPs uptake including disruption of cytoskeleton that is crucial for lung physiology but is not considered as a footprint of cell damage. We aimed to investigate cytoskeleton disturbances and the impact on cell migration induced by an acute TiO₂ NPs exposure (24 h) and the recovery capability after 6 days of NPs-free treatment, which allowed investigating if cytoskeleton damage was reversible. Exposure to TiO₂ NPs (10 µg/cm²) for 24 h induced a decrease 20.2% and 25.1% in tubulin and actin polymerization. Exposure to TiO₂ NPs (10 µg/cm²) for 24 h followed by 6 days of NPs-free had a decrease of 26.6% and 21.3% in tubulin and actin polymerization, respectively. The sustained exposure for 7 days to 1 µg/cm² and 10 µg/cm² induced a decrease of 22.4% and 30.7% of tubulin polymerization respectively, and 28.7% and 46.2% in actin polymerization. In addition, 24 h followed 6 days of NPs-free exposure of TiO₂ NPs (1 µg/cm² and 10 µg/cm²) decreased cell migration 40.7% and 59.2%, respectively. Cells exposed (10 µg/cm²) for 7 days had a decrease of 65.5% in cell migration. Ki67, protein surfactant B (SFTPB) and matrix metalloprotease 2 (MMP2) were analyzed as genes related to lung epithelial function. The results showed a 20% of Ki67 upregulation in cells exposed for 24 h to 10 µg/cm² TiO₂ NPs while a downregulation of 20% and 25.8% in cells exposed to 1 µg/cm² and 10 µg/cm² for 24 h followed by 6 days of NPs-free exposure. Exposure to 1 µg/cm² and 10 µg/cm² for 24 h and 7 days upregulates SFTPB expression in 53% and 59% respectively, MMP2 expression remain unchanged. In conclusion, exposure of TiO₂ NPs affected cytoskeleton of lung epithelial cells irreversibly but this damage was not cumulative.

1. Introduction

The worldwide production of engineered nanomaterials (particle size < 100 nm) has highlighted the attention of possible adverse effects

on human health, specifically those related to occupational exposure. Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are one of the most engineered nanomaterials synthesized [1] due to its wide spectrum of applications, which includes cosmetics, foods, pharmaceuticals, water

* Corresponding author. Laboratorio de Carcinogénesis y Toxicología, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de Los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, CP 54090, Estado de México, México.

E-mail address: chirino@campus.iztacala.unam.mx (Y.I. Chirino).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109063>

Received 4 November 2019; Received in revised form 11 March 2020; Accepted 18 March 2020

Available online 26 March 2020

0009-2797/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

administration. **Yolanda I. Chirino:** Project administration, Resources, Funding acquisition, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This project was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN224119) and National Commission for Science and Technology (CONACyT 268769). **Deciga-Alcázar Alejandro and Ispanixtlahuatl-Meráz Octavio are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 582547 and 599447 from CONACyT, respectively.** We thank Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE; Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM) for the support in the nanoparticle characterization.

References

- L.G. Garduño-Balderas, L.M. Urrutia-Ortega, E.I. Medina-Reyes, Y.I. Chirino, Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an imbalance between benefits and risks, *J. Appl. Toxicol.* 35 (2015) 1073–1085.
- G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 823–839.
- X. Zhang, W. Li, Z. Yang, Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update, *Arch. Toxicol.* 89 (2015) 2207–2217.
- D.B. Waite, E.M. Donner, Risk assessment strategies for nanoscale and fine-sized titanium dioxide particles: recognizing hazard and exposure issues, *Food Chem. Toxicol.* 85 (2015) 138–147.
- O. Ispanixtlahuatl-Meráz, R.P.F. Schins, Y.I. Chirino, Cell type specific cytoskeleton disruption induced by engineered nanoparticles, *Environ. Sci. Nano.* 5 (2018) 228–245.
- S.F. Thai, K.A. Wallace, C.P. Jones, H. Ren, R.Y. Prasad, W.O. Ward, M.J. Kohan, C.F. Blackman, Signaling pathways and MicroRNA changes in nano-TiO₂ treated human lung epithelial (BEAS-2B) cells, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 (2015) 492–503.
- B. Li, Y. Ze, Q. Sun, T. Zhang, X. Sang, Y. Cui, X. Wang, S. Gui, D. Tan, M. Zhu, X. Zhao, L. Sheng, L. Wang, F. Hong, M. Tang, Molecular mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced pulmonary injury in mice, *PLoS One* 8 (2013) e55563.
- L. Armand, M. Dagouassat, E. Belade, A. Simon-Deckers, S. Le Gouvello, C. Tharabat, C. Duprez, P. Andujar, J.C. Pairen, J. Boczkowski, S. Lanone, Titanium dioxide nanoparticles induce matrix metalloproteinase 1 in human pulmonary fibroblasts partly via an interleukin-1 β -dependent mechanism, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48 (2013) 354–363.
- J. Sund, J. Palomäki, N. Ahonen, K. Savolainen, H. Alenius, A. Puustinen, Phagocytosis of nano-sized titanium dioxide triggers changes in protein acetylation, *J. Proteomics* 108 (2014) 469–483.
- Y. Nishimura, K. Kasahara, M. Inagaki, Intermediate filaments and IF-associated proteins: from cell architecture to cell proliferation, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 95 (8) (2019) 479–493.
- E. Paluch, C.P. Heisenberg, Biology and physics of cell shape changes in development, *Curr. Biol.* 19 (2009) 790–799.
- S. Forth, T.M. Kapoor, The mechanics of microtubule networks in cell division, *J. Cell Biol.* 216 (2017) 1525–1531.
- J.D. van Buul, I. Timmeman, Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions, *Small GTPases* 7 (2016) 21–31.
- M. Sun, M.H. Zaman, Modeling, signaling and cytoskeleton dynamics: integrated modelling-experimental frameworks in cell migration, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 9 (2017).
- D.D. Tang, B.D. Gerlach, The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration, *Respir. Res.* 18 (2017) 54.
- A.S. Flozak, A.P. Lam, S. Russell, M. Jain, O.N. Peled, K.A. Sheppard, R. Beri, G.M. Mutlu, G.R. Budinger, C.J. Gottardi, Beta-catenin/T-cell factor signaling is activated during lung injury and promotes the survival and migration of alveolar epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 3157–3167.
- J. Wen, Z. Zhao, R. Tong, L. Huang, Y. Miao, J. Wu, Prussian blue nanoparticle-labeled mesenchymal stem cells: evaluation of cell viability, proliferation, migration, differentiation, cytoskeleton, and protein expression in vitro, *Nanoscale Res. Lett.* 22 (13) (2018) 329.
- T. Mironava, M. Hadjiargyrou, M. Simon, V. Jurukovski, M.H. Rafailovich, Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time, *Nanotoxicology* 4 (1) (2010) 120–137.
- Y. Wu, M.R.K. Ali, B. Dong, T. Han, K. Chen, J. Chen, Y. Tang, N. Fang, F. Wang, M.A. El-Sayed, Gold nanorod photothermal therapy alters cell junctions and actin network in inhibiting cancer cell collective migration, *ACS Nano* 12 (2018) 9279–9290.
- Y. Qin, K. Chen, W. Gu, X. Dong, R. Lei, Y. Chang, X. Bai, S. Xia, L. Zeng, J. Zhang, S. Ma, J. Li, S. Li, G. Xing, Small size fullerene nanoparticles suppress lung metastasis of breast cancer cell by disrupting actin dynamics, *J. Nanobiotechnol.* 16 (2018) 54.
- A. Pitchaimani, T.D.T. Nguyen, M. Koirala, Y. Zhang, S. Aryal, Impact of cell adhesion and migration on nanoparticle uptake and cellular toxicity, *Toxicol. Vitro* 43 (2017) 29–39.
- H. Xiao, Y. Chen, M. Alnaggar, Silver nanoparticles induce cell death of colon cancer cells through impairing cytoskeleton and membrane nanostructure, *Micron* 126 (2019) 102750.
- S. Povea-Cabello, M. Oropesa-Ávila, P. de la Cruz-Ojeda, M. Villanueva-Paz, M. de la Mata, J.M. Suárez-Rivero, M. Álvarez-Górdoba, I. Villalón-García, D. Cotán, P. Ybot-González, J.A. Sánchez-Alcázar, Dynamic reorganization of the cytoskeleton during apoptosis: the two coffins hypothesis, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) pii E2393.
- L. Chézeau, L.A. Kohlstaedt, A. Le Faou, F. Cosnier, B. Rihn, L. Gaté, Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in rat exposed to TiO₂ nanostructured aerosol by inhalation, *J. Proteomics* 207 (2019) 103451.
- E. Huerta-García, M.D.P. Ramos-Godínez, A. López-Saavedra, E. Alfaro-Moreno, N.P. Gómez-Crisóstomo, Z. Colín-Val, H. Sánchez-Barrera, R. López-Marure, Internalization of titanium dioxide nanoparticles is mediated by actin-dependent reorganization and clathrin- and dynamin-mediated endocytosis in H9c2 rat cardiomyoblasts, *Chem. Res. Toxicol.* 32 (4) (2019) 578–588.
- T. Mironava, M. Hadjiargyrou, M. Simon, M.H. Rafailovich, Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: adipose Derived Stromal cells, *Nanotoxicology* 8 (2) (2014) 189–201.
- Y. Xu, M. Hadjiargyrou, M. Rafailovich, T. Mironava, Cell-based cytotoxicity assays for engineered nanomaterials safety screening: exposure of adipose derived stromal cells to titanium dioxide nanoparticles, *J. Nanobiotechnol.* 15 (1) (2017) 50 11.
- M. Wright Muelas, F. Ortega, R. Breitling, C. Bendtsen, H.V. Westerhoff, Rational cell culture optimization enhances experimental reproducibility in cancer cells, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 3029.
- W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Curr. Protoc. Im.* 111 (2015) A3.B.1-3.
- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275.
- K.P. Lee, H.J. Trochimowicz, C.F. Reinhardt, Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 79 (1985) 179–192.
- IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Carbon black, titanium dioxide, and talc, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 93 (2010) 1–413.
- S. Gangwal, J.S. Brown, A. Wang, K.A. Houck, D.J. Dix, R.J. Kavlack, E.A. Hubal, Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential, *Environ. Health Perspect.* 119 (2011) 1539–1546.
- J.D. Clogston, A.K. Patri, Zeta potential measurement, *Methods Mol. Biol.* 697 (2011) 63–70.
- J. Schneider, D. Walter, B. Brückel, K. Rödelberger, Primary particles and their agglomerate formation as modifying risk factors of nonfibrous nanosized dust, *J. Toxicol. Environ. Health* 76 (2) (2013) 131–141.
- Z. Magdolonova, D. Bilaničová, G. Pojana, L.M. Fjellsbø, A. Hudcová, K. Hasplová, A. Marcomini, M. Dusínska, Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity, *J. Environ. Monit.* 14 (2012) 455–464.
- K. Murugan, Y.E. Choonara, P. Kumar, D. Bjukkumar, L.C. du Toit, V. Pillay, Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 2191–2206.
- V. Kononenko, A. Erman, T. Petan, I. Kržaj, S. Kralj, D. Makovec, D. Drobne, Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO₂-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells, *Nanotoxicology* 11 (3) (2017) 419–429.
- K.N. Yu, S.H. Chang, S.J. Park, J. Lim, J. Lee, T.J. Yoon, J.S. Kim, M.H. Cho, Titanium dioxide nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress-mediated autophagic cell death via mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane disruption in normal lung cells, *PLoS One* 10 (6) (2015) e0131208.
- S. Ghasempour, M.A. Shokrgozar, R. Ghasempour, M. Alipour, Investigating the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles in vivo and in vitro studies, *Exp. Toxicol. Pathol.* 67 (2015) 509–515.
- K. Ali, B. Ahmed, M.S. Khan, J. Musarat, Differential surface contact killing of pristin and low EPS *Pseudomonas aeruginosa* with Aloe vera capped hematite (Fe₂O₃) nanoparticles, *J. Photochem. Photobiol., B* 188 (2018) 146–158.
- B. Adinolfi, M. Pellegrino, S. Tombelli, C. Trono, A. Giannetti, C. Domenici, G. Varchi, G. Sotgiu, M. Ballestri, F. Baldini, Polymeric nanoparticles promote endocytosis of a survivin molecular beacon: localization and fate of nanoparticles and beacon in human A549 cells, *Life Sci.* 15 (2018) 106–112.
- P. Khan, K. Fytianos, L. Tamò, M. Roth, M. Tamm, T. Geiser, A. Gazdhar, K.E. Hostettler, Culture of human alveolar epithelial type II cells by sprouting, *Respir. Res.* 19 (2018) 204.
- Z. Mao, B. Xu, X. Ji, K. Zhou, X. Zhang, M. Chen, X. Han, Q. Tang, X. Wang, Y. Xia,

Article

Astrocytes Are More Vulnerable than Neurons to Silicon Dioxide Nanoparticle Toxicity in Vitro

Jorge Humberto Limón-Pacheco¹, Natalie Jiménez-Barrios^{2,3}, Alejandro Déciga-Alcaraz³,
Adriana Martínez-Cuazitl¹, Mónica Maribel Mata-Miranda¹,
Gustavo Jesús Vázquez-Zapién⁴, Jose Pedraza-Chaverri⁵, Yolanda Irasema Chirino³ and
Marisol Orozco-Ibarra^{2,*}

¹ Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Escuela Militar de Medicina, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de San Isidro, Alcaldía Miguel Hidalgo, Ciudad de Mexico 11200, Mexico; akelason1977@gmail.com (J.H.L.-P.); adyta0@hotmail.com (A.M.-C.); mmcmaribel@gmail.com (M.M.M.-M.)

² Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, Av. Insurgentes Sur # 3877, La Fama, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de Mexico 14269, Mexico; nataliej.k.barrios@gmail.com

³ Laboratorio de Carcinogénesis y Toxicología, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Avenida de los Barrios # 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de Mexico 54090, Mexico; alejandro.deciga01@gmail.com (A.D.-A.); irasemachirino@gmail.com (Y.I.C.)

⁴ Laboratorio de Embriología, Escuela Militar de Medicina, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de San Isidro, Alcaldía Miguel Hidalgo, Ciudad de Mexico 11200, Mexico; gus1202@hotmail.com

⁵ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de Mexico 04510, Mexico; pedraza@unam.mx

* Correspondence: orozco_ibarra@ciencias.unam.mx; Tel.: +52-55-5606-3822 (ext. 2074)

Received: 30 June 2020; Accepted: 25 July 2020; Published: 29 July 2020



Abstract: Some studies have shown that silicon dioxide nanoparticles (SiO₂-NPs) can reach different regions of the brain and cause toxicity; however, the consequences of SiO₂-NPs exposure on the diverse brain cell lineages is limited. We aimed to investigate the neurotoxic effects of SiO₂-NP (0–100 µg/mL) on rat astrocyte-rich cultures or neuron-rich cultures using scanning electron microscopy, Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR), FTIR microspectroscopy mapping (IQ mapping), and cell viability tests. SiO₂-NPs were amorphous particles and aggregated in saline and culture media. Both astrocytes and neurons treated with SiO₂-NPs showed alterations in cell morphology and changes in the IR spectral regions corresponding to nucleic acids, proteins, and lipids. The analysis by the second derivative revealed a significant decrease in the signal of the amide I (α -helix, parallel β -strand, and random coil) at the concentration of 10 µg/mL in astrocytes but not in neurons. IQ mapping confirmed changes in nucleic acids, proteins, and lipids in astrocytes; cell death was higher in astrocytes than in neurons (10–100 µg/mL). We conclude that astrocytes were more vulnerable than neurons to SiO₂-NPs toxicity. Therefore, the evaluation of human exposure to SiO₂-NPs and possible neurotoxic effects must be followed up.

Keywords: cerebellar granule neurons; nanoparticle exposure; neurotoxic effects; secondary astrocytes; silicon dioxide

1. Introduction

Silicon dioxide (SiO₂), labeled as E551 in Europe, has been authorized as a food additive for more than two decades. However, as nanotechnology develops, the use of SiO₂ in nanometric size has

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2305-6304/8/3/51/s1>, Table S1: Spectral bands (cm^{-1}) of chemical bonds of biomolecules detected by ATR-FTIR Spectroscopy in rat astrocytes and neurons exposed to SiO_2 -NPs; Figure S1. Identification of cell cultures; Figure S2. A spectral fingerprint of rat astrocytes and neurons exposed to SiO_2 -NPs; Figure S3. FTIR microscopy and IQ mapping analysis of the spectral region of $989\text{--}1185\text{ cm}^{-1}$ of astrocytes exposed to SiO_2 -NPs; Figure S4. FTIR microscopy and IQ mapping analysis of the spectral region of $989\text{--}1185\text{ cm}^{-1}$ of astrocytes exposed to SiO_2 -NPs. FTIR microscopy analysis and IQ mapping of neurons exposed to SiO_2 -NPs.

Author Contributions: Conceptualization, J.H.L.-P., Y.I.C. and M.O.-I.; formal analysis, J.H.L.-P., N.J.-B., A.M.-C., M.M.M.-M., G.J.V.-Z., and M.O.-I.; funding acquisition, J.P.-C. and Y.I.C.; investigation, J.H.L.-P., N.J.-B., A.D.-A., and M.O.-I.; resources, M.M.M.-M., G.J.V.-Z., J.P.-C., Y.I.C., and M.O.-I.; supervision, Y.I.C. and M.O.-I.; visualization, J.H.L.-P., A.M.-C., and M.O.-I.; writing—original draft, J.H.L.-P. and M.O.-I.; writing—review and editing, A.D.-A., J.P.-C., and Y.I.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Universidad Nacional Autónoma de México, grant numbers 5000-9105 to J.P.-C. and IN224119 to Y.I.C., and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, grant number 268769 to Y.I.C.

Acknowledgments: Thanks to MSc. Miguel Sánchez Brito for the development of an algorithm used in the analysis of the ATR-FTIR spectra and to M.C. Mayor Emanuel Noriega at the Research Unit at the EMM for his technical support. Alejandro Déciga-Alcaraz is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received the fellowship 582547 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Dekkers, S.; Krystek, P.; Peters, R.J.; Lankveld, D.P.; Bokkers, B.G.; van Hoeven-Arentzen, P.H.; Bouwmeester, H.; Oomen, A.G. Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 393–405. [CrossRef]
- Younes, M.; Aggett, P.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Dusemund, B.; Filipic, M. Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA J.* **2018**, *16*, e05088. [CrossRef]
- Napierska, D.; Thomassen, L.C.J.; Lison, D.; Martens, J.A.; Hoet, P.H. The nanosilica hazard: Another variable entity. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, 39. [CrossRef] [PubMed]
- Turci, F.; Pavan, C.; Leinardi, R.; Tomatis, M.; Pastoro, L.; Garry, D. Revisiting the paradigm of silica pathogenicity with synthetic quartz crystals: The role of crystallinity and surface disorder. *Part. Fibre Toxicol.* **2016**, *13*, 32. [CrossRef] [PubMed]
- Murugadoss, S.; Lison, D.; Godderis, L.; Van den Brule, S.; Mast, J.; Brassinne, F. Toxicology of silica nanoparticles: An update. *Arch Toxicol.* **2017**, *91*, 2967–3010. [CrossRef] [PubMed]
- Du, Z.J.; Chen, S.Y.; Cui, G.Q.; Yang, Y.; Zhang, E.G.; Wang, Q. Silica nanoparticles induce cardiomyocyte apoptosis via the mitochondrial pathway in rats following intratracheal instillation. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *43*, 1229–1240. [CrossRef] [PubMed]
- Yamashita, K.; Yoshioka, Y.; Higashisaka, K.; Mimura, K.; Morishita, Y.; Nozaki, M. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 321–328. [CrossRef]
- Wu, J.; Wang, C.; Sun, J.; Xue, Y. Neurotoxicity of Silica Nanoparticles: Brain Localization and Dopaminergic Neurons Damage Pathways. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4476–4489. [CrossRef]
- Parveen, A.; Rizvi, S.H.M.; Mahdi, F.; Tripathi, S.; Ahmad, I.; Shukla, R.K. Silica nanoparticles mediated neuronal cell death in corpus striatum of rat brain: Implication of mitochondrial, endoplasmic reticulum and oxidative stress. *J. Nanopart. Res.* **2014**, *16*, 2664. [CrossRef]
- Parveen, A.; Rizvi, S.H.M.; Sushma; Mahdi, F.; Ahmad, I.; Singh, P.P. Intranasal exposure to silica nanoparticles induces alterations in pro-inflammatory environment of rat brain: Involvement of oxidative stress. *Toxicol. Ind. Health* **2017**, *33*, 119–132. [CrossRef]
- Liu, X.; Sui, B.; Sun, J. Blood-brain barrier dysfunction induced by silica NPs in vitro and in vivo: Involvement of oxidative stress and Rho-kinase/JNK signaling pathways. *Biomaterials* **2017**, *121*, 64–82. [CrossRef] [PubMed]



Toxicity of engineered nanomaterials with different physicochemical properties and the role of protein corona on cellular uptake and intrinsic ROS production



Alejandro Déciga-Alcaraz^{a,1}, Estefany I. Medina-Reyes^b, Norma L. Delgado-Buenrostro^a, Carolina Rodríguez-Ibarra^{a,1}, Adriana Ganem-Rondero^c, Gustavo J. Vázquez-Zapién^d, Mónica M. Mata-Miranda^e, Jorge H. Limón-Pacheco^e, Claudia M. García-Cuellar^f, Yesennia Sánchez-Pérez^f, Yolanda I. Chirino^{a,*}

^a Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, CP 54090, Estado de México, México

^b Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Programa de becas posdoctorales en la UNAM, DGAPA, México

^c División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, CP 54740, Estado de México, México

^d Laboratorio de Embriología, Escuela Militar de Medicina, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de San Isidro, Alcaldía Miguel Hidalgo, C.P. 11200, Ciudad de México, México

^e Laboratorio de Biología Celular y Tissular, Escuela Militar de Medicina, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de San Isidro, Alcaldía Miguel Hidalgo, C.P. 11200, Ciudad de México, México

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Protein adsorption
Nanomaterials
Toxicity
Indium-tin oxide
Physicochemical properties

ABSTRACT

The Organisation for Economic Co-operation and Development has listed thirteen engineered nanomaterials (ENM) in order to investigate their toxicity on human health. Silicon dioxide (SiO₂) and titanium dioxide (TiO₂) are included on that list and we added indium tin oxide (ITO) nanoparticles (NPs) to our study, which is not listed on OECD suggested ENM to be investigated, however ITO NPs has a high potential of industrial production. We evaluate the physicochemical properties of SiO₂ NPs (10–20 nm), TiO₂ nanofibers (NFs; 3 μm length) and ITO NPs (< 50 nm) and the impact of protein-corona formation on cell internalization. Then, we evaluated the toxicity of uncoated ENM on human lung epithelial cells exposed to 10 and 50 μg/cm² for 24 h. TiO₂ NFs showed the highest capability to adsorb proteins onto the particle surface followed by SiO₂ NPs and ITO NPs after acellular incubation with fetal bovine serum. The protein adsorption had no impact on Alizarin Red S conjugation, intrinsic properties for reactive oxygen (ROS) formation or cell uptake for all types of ENM. Moreover, TiO₂ NFs induced highest cell alterations in human lung epithelial cells exposed to 10 and 50 μg/cm² while ITO NPs induced moderated cytotoxicity and SiO₂ NPs caused even lower cytotoxicity under the same conditions. DNA, proteins and lipids were mainly affected by TiO₂ NFs followed by SiO₂ NPs with toxic effects in protein and lipids while limited variations were detected after exposure to ITO NPs on spectra analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

1. Introduction

Nanotechnology has improved biotechnology and biomedicine without doubts, however there are some concerns regarding to

potential risk for personnel through engineered nanomaterials (ENM) inhalation in occupational settings. By definition, ENM is an intentionally produced material containing nanoparticles sized below 100 nm (NPs; Garduño-Balderas et al., 2015). The evidence indicates that

* Corresponding author at: Laboratorio de Carcinogénesis y Toxicología, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de Los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, CP 54090, Estado de México, México.

E-mail address: chirino@unam.mx (Y.I. Chirino).

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Unidad de Posgrado Edificio B, Primer Piso, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510, Ciudad de México, México.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152545>

Received 26 March 2020; Received in revised form 15 July 2020; Accepted 27 July 2020

Available online 02 August 2020

0300-483X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

in toxicity of these ENM after inhalation, for instance, the role of coating of abundant proteins in bloodstream (albumin, apolipoproteins, immunoglobulins) and lung surfactant, as a critical component in lung fluids.

5. Conclusion

The surface of TiO₂ NFs adsorbed higher amount of proteins than SiO₂ NPs and limited adsorption was detected on ITO NPs. Proteins adsorbed onto TiO₂ NFs displayed a pattern between 66 kDa and 45 kDa, while SiO₂ NPs had a broad protein pattern adsorption from 100 kDa to 50 kDa and ITO NPs had a limited pattern of adsorbed proteins on 60 kDa. However, in spite of the differences between physico-chemical properties of ENM and the amount of protein adsorbed onto the ENM surface, the FBS coating slightly decreased the ARS-conjugation and ARS-derived fluorescence was detected into the cells after exposure to all types of ENM. The coating of all ENM tested in this study had limited influence on intrinsic ROS generation. The intrinsic MTT reduction ability increased of all ENM tested in this study induced an increase of 50% above 106 µg/mL but no differences between uncoated and coated ENM were detected. The toxicological effects of uncoated ENM on lung epithelial cells were evaluated and we found that TiO₂ NF induce higher toxicity than SiO₂ NPs and ITO NPs. TiO₂ NFs induced the most evident cellular alterations on cell viability, granularity, cell size, cell cycle distribution, and molecular fingerprints of DNA, proteins and lipids. Overall, SiO₂ NPs induced intermediate degree of alterations and ITO NPs had limited cellular and molecular effects. High detection of proteins adsorbed onto TiO₂ NFs correlated with severe cytotoxicity while low detection of protein-corona formation of ITO NPs was associated with limited toxicity effects in lung epithelial cells. Finally, according to the two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons among ENM at the highest concentration in the *in vitro* studies, the ranking of toxicity is TiO₂ NFs > ITO NPs > SiO₂ NPs, excluding the molecular fingerprints of DNA, proteins and lipids of cells.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

This project was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN224119). National Council of Science and Technology supported the confocal microscopy acquisition (CONACYT 268769). Alejandro Déciga-Alcaraz and Carolina Rodríguez-Ibarra are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 582547 and 626239 from CONACYT. Medina-Reyes EI received a postdoctoral fellowship from "Programa de becas posdoctorado en la UNAM" DGAPA, UNAM. We thank Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) from Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología from UNAM for the support in the nanoparticles characterization.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152545>.

References

- Afroz, T., Hiraku, Y., Ma, N., Ahmed, S., Oikawa, S., Kawanishi, S., Murata, M., 2018. Nitritative DNA damage in cultured macrophages exposed to indium oxide. *J. Occup. Health* 60 (2), 148–155. <https://doi.org/10.1539/joh.17-0146-OA>.
- Ahmed, M., 2013. Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 32 (2), 186–195. <https://doi.org/10.1177/0960327112459206>.
- Ahmed, M., Akhtar, M.J., Khan, M., Alhadlaq, H.A., Aldalbah, A., 2017. Nanocubes of indium oxide induce cytotoxicity and apoptosis through oxidative stress in human lung epithelial cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 156 (1), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.020>.
- Allegrì, M., Bianchi, M.G., Chiu, M., Varet, J., Costa, A.L., Orrelli, S., Blosi, M., Bussoletti, O., Poland, C.A., Bergamaschi, E., 2016. Shape-related toxicity of titanium dioxide nanofibers. *PLoS One* 11 (3), e0151365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151365>.
- Badding, M.A., Fix, N.R., Orandle, M.S., Barger, M.W., Dunnick, K.M., Cummings, K.J., Leonard, S.S., 2016. Pulmonary toxicity of indium-tin oxide production facility particles in rats. *Journal of applied toxicology: JAT* 36 (4), 618–626. <https://doi.org/10.1002/jat.3253>.
- Blatnik, J., Luebke, L., Simonet, S., Nelson, M., Price, R., Leek, R., Zeng, L., Wu, A., Brown, E., 2012. Dye surface coating enables visible light activation of TiO₂ nanoparticles leading to degradation of neighboring biological structures. *Microsc. Microanal.* 18 (1), 134–142. <https://doi.org/10.1017/S1431927611012414>.
- Breznan, D., Das, D.D., O'Brien, J.S., MacKinnon-Roy, C., Nimesh, S., Vuong, N.Q., Bernatchez, S., DeSilva, N., Hill, M., Kumarathasan, P., Vincent, R., 2017. Differential cytotoxic and inflammatory potency of amorphous silicon dioxide nanoparticles of similar size in multiple cell lines. *Nanotoxicology* 11 (2), 223–235. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1287313>.
- Capaso, L., Camatini, M., Gualtieri, M., 2014. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 226 (1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.040>.
- Chen, Z., Li, J., Chen, L., Zhao, F., Jiang, J., 2019. The pneumotoxic effect and indium ion release induced by indium tin oxide nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 19 (8), 4357–4365. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16924>.
- Cristian, R.E., Mohammad, I.J., Mernea, M., Sbarcea, B.G., Trica, B., Stan, M.S., Dinischiotu, A., 2019. Analyzing the Interaction between Two Different Types of Nanoparticles and Serum Albumin. *Materials Basel (Basel)* 12 (19), 3183. <https://doi.org/10.3390/ma12193183>.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Atefi, S., Hasanizadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M.R., 2018. Impact of Particle Size and Polydispersity. Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 10 (2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- de Oliveira, E.M., Suzuki, M.F., do Nascimento, P.A., da Silva, M.A., Okazaki, K., 2001. Evaluation of the effect of 90Sr beta-radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mutat. Res.* 476 (1–2), 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00100-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00100-2).
- Escamilla-Rivera, V., Uribe-Ramírez, M., González-Pozos, S., Lozano, O., Lucas, S., De Vizcaya-Ruiz, A., 2016. Protein corona acts as a protective shield against Fe₃O₄-PEG inflammation and ROS-induced toxicity in human macrophages. *Toxicol. Lett.* 240 (1), 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.018>.
- Fischella, M., Dabbou, H., Bhattacharyya, S., Saboungi, M.L., Salvatet, J.P., Hevor, T., Guerin, M., 2009. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. *Toxicol. Vitro* 23 (4), 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.02.007>.
- Gan, N., Sun, Q., Zhao, L., Tang, P., Suo, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Zhang, M., Wang, W., Li, H., 2019. Protein corona of metal-organic framework nanoparticles: study on the adsorption behavior of protein and cell interaction. *Int. J. Biol. Macromol.* 140 (1), 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.183>.
- Gangwal, S., Brown, J.S., Wang, A., Houck, K.A., Dix, D.J., Kavlock, R.J., Hubal, E.A., 2011. Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast *in vitro* testing based on occupational exposure potential. *Environ. Health Perspect.* 119 (11), 1539–1546. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103750>.
- Garduño-Balderas, L.G., Urrutia-Ortega, I.M., Medina-Reyes, E.I., Chirino, Y.L., 2015. Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an imbalance between benefits and risks. *J. Appl. Toxicol.* 35 (10), 1073–1085. <https://doi.org/10.1002/jat.3180>.
- Gato, W.E., Hunter, D.A., Byrd, L.C., Mays, C.A., Yau, W., Wu, J., 2017. Assessment of the short-term toxicity of TiO₂ nanofiber in Sprague Dawley rats. *Environ. Toxicol.* 32 (6), 1775–1783. <https://doi.org/10.1002/tox.22400>.
- Gonzalez, L., De Santis Puzzonza, M., Ricci, R., Aureli, F., Guarguaglini, G., Cubadda, F., Leyns, L., Cundari, E., Kirsch-Volders, M., 2015. Amorphous silica nanoparticles alter microtubule dynamics and cell migration. *Nanotoxicology* 9 (6), 729–736. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.969791>.
- Hamilton, R.F., Wu, N., Porter, D., Buford, M., Wolfarth, M., Holian, A., 2009. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part. Fibres Toxicol.* 6 (35), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-35>.
- Hozayen, W.G., Mahmoud, A.M., Desouky, E.M., El-Nahass, E.S., Soliman, H.A., Farghali, A.A., 2019. Cardiac and pulmonary toxicity of mesoporous silica nanoparticles is associated with excessive ROS production and redox imbalance in Wistar rats. *Biomed. Pharmacother.* 109 (1), 2527–2538. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.093>.
- Hsiao, I.L., Bierkandt, F.S., Reichardt, P., Luch, A., Huang, Y.J., Jakubowski, N., Tentschert, J., Haase, A., 2016. Quantification and visualization of cellular uptake of TiO₂ and Ag nanoparticles: comparison of different ICP-MS techniques. *J.*