



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

**RESPUESTA DIFERENCIAL DE LA BARRERA INMÓVIL
(NEUMOCITOS TIPO II) Y MÓVIL (MONOCITOS) FRENTE A DOS
TIPOS DE NANOPARTÍCULAS ÓXIDO METÁLICAS**

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

PRESENTA:
OCTAVIO ISPANIXTLAHUATL MERÁZ

TUTORA:
DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. LUIS VACA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA, UNAM
DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO
MARZO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

Además agradezco al comité tutor conformado por el Dr. Juan Miranda Ríos y el Dr. Luis Vaca Domínguez quienes me asesoraron y contribuyeron objetivamente con este trabajo durante todo el doctorado.

Gracias a los recursos de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el apoyo otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN224119), los cuales permitieron la realización de este proyecto de tesis doctoral.

Todas las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas con un microscopio confocal Leica SP8 X, el cual fue adquirido mediante un donativo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (268769).

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) porque mediante el proyecto A1-S-28619 de forma indirecta, benefició en la realización de esta tesis, así como por la beca otorgada con el número de becario 599447 y CVU 735412.

Así mismo agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM, por recibir el apoyo para asistir al 56th Annual Meeting de la Sociedad de Toxicología, que se llevó a cabo del 12 al 16 de marzo del 2018 en Baltimore, Maryland, Estados Unidos; presentando parte de este trabajo con número de registro: 1522/P610, titulado: "Effect of tin dioxide nanoparticles on cell viability, morphology, size, granularity and migration in lung epithelial cells".

Índice

1. Introducción	10
1.1 El sistema respiratorio	10
1.2 La barrera inmóvil y móvil del pulmón	11
1.3 El mundo de las NPs y sus efectos en las células	15
2. Justificación	20
3. Hipótesis	21
4. Objetivo	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. Materiales y método	22
5.1 Caracterización de las SnO ₂ NPs y TiO ₂ NPs	22
5.2 Cultivo celular y establecimiento de las condiciones de exposición	23
5.3 Viabilidad celular	24
5.4 Ultraestructura celular	24
5.5 Granularidad celular	25
5.6 Patrón molecular	25
5.7 Arreglo del citoesqueleto apical y basal	25
5.8 Localización de vacuolas	26
5.9 Activación de monocitos	26
5.10 Producción de citocinas	27
5.11 Análisis estadístico	27
6. Resultados	27
6.1 Caracterización de las NPs	27
6.2 Viabilidad celular	29
6.3 Morfología celular y presencia de las SnO ₂ NPs y TiO ₂ NPs en el cultivo	29
6.4 Ultraestructura celular	30
6.5 Granularidad celular	32
6.6 Patrón de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de neumocitos tipo II y monocitos ante la exposición a SnO ₂ NPs y TiO ₂ NPs	34
6.7 Arreglo del citoesqueleto	35
6.8 Localización de vacuolas	37

6.9	Activación y citocinas liberadas por monocitos.....	39
7.	Discusión	41
8.	Conclusiones.....	47
9.	Perspectivas	48
10.	Referencias	49
11.	Índice de esquemas, figuras y tablas	54
12.	Artículos derivados de esta tesis	55

Abreviaturas

NMs – Nanomateriales

NPs – Nanopartículas

SFB^{COM} – Suero fetal bovino comercial

SFB^{SV} – Suero fetal bovino libre de vesículas

F-12K – Kaighn's Nutrient Mixture F-12

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

A549 – Neumocitos tipo II

RAW 264.7 – Monocitos

SnO₂ – Dióxido de estaño

SnO₂ NPs– Nanopartículas de dióxido de estaño

TiO₂ – Dióxido de titanio

TiO₂ NPs– Nanopartículas de dióxido de titanio

ROS – Especies reactivas de oxígeno

nm – nanómetros

mV – milivolts

µg – microgramos

µL – microlitros

µm – micrómetros

µM – micromolar

FTIR - espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Resumen

Introducción: El pulmón es un órgano que día a día esta en constante daño por la inhalación de agentes exógenos sin embargo, el pulmón tiene la capacidad de contener a los agentes exógenos para posteriormente degradarlos o eliminarlos; esto básicamente consiste en una barrera inmóvil conformada por células epiteliales y una barrera móvil que incluye a células del sistema inmune; más específicamente, por neumocitos tipo II y monocitos, respectivamente. Sin embargo, la inhalación de nanopartículas (NPs) representa un problema grave de salud industrial porque difícilmente estas NPs pueden ser degradadas o eliminadas. Actualmente existen pocos estudios de toxicidad donde se evalúen los daños de NPs sobre dos tipos celulares bajo las mismas condiciones de exposición. Aunado a esto, la evidencia de la toxicidad de NPs se ha enfocado en alteraciones moleculares y no en daños estructurales. Por lo tanto, en este trabajo se compararon las alteraciones en neumocitos tipo II y monocitos producidas por la exposición a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs bajo las mismas condiciones de exposición y tiempo. Debido a que ambas NPs son de diferentes compuestos, nuestra **hipótesis** fue que ambas NPs formarían agregados de diferentes tamaños en suspensión y diferente potencial zeta y además serían amorfas. Por otro lado, los neumocitos tipo II y monocitos tendrían la capacidad de internalizar las NPs en su citoplasma, pero con diferente tasa de internalización, siendo mayor para el caso de los monocitos, por lo que la granularidad, cambios en el patrón de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y alteración en el citoesqueleto, sería mayormente afectada en monocitos que en neumocitos tipo II. **Materiales y método:** Se realizó la caracterización de las SnO₂ NPs (Sigma Aldrich, 549657-5G) y TiO₂ NPs (Sigma Aldrich, 637254-50G) para conocer su forma, potencial zeta y tamaño de aglomerados en suspensión. Por otro lado, se realizó el cultivo de neumocitos tipo II (ATCC, CCL-185) y monocitos (ATCC, TIB-71) en medio F-12K y DMEM, respectivamente, ambos medios suplementados con 20% de suero fetal bovino libre de vesículas extracelulares (SFB^{SV}). Posteriormente, ambos tipos celulares fueron expuestos a 1, 10 ó 50 µg/cm² de SnO₂ NPs ó TiO₂ NPs durante 24 h para evaluar la viabilidad, morfología, granularidad, ultraestructura celular, patrón biomolecular y arreglo del citoesqueleto.

Además en los monocitos se evaluó la posible activación y producción de citocinas. Como control positivo se utilizó el estímulo con LPS (1µg/mL) **Resultados:** Ambas NPs fueron amorfas, presentando potencial zeta de -8.41 ± 0.55 mV y tamaño hidrodinámico de 248.19 ± 13.38 nm en medio F-12K mientras que en medio DMEM presentaron potencial ζ de -8.79 ± 1.15 y tamaño hidrodinámico de 193.17 ± 4.36 nm. Las TiO₂ NPs tuvieron un potencial zeta de -9.69 ± 0.46 mV y tamaño hidrodinámico de 427.73 ± 1.73 nm en medio F-12K mientras que en medio DMEM presentaron potencial zeta ζ de -9.69 ± 0.46 y tamaño hidrodinámico de 426.27 ± 27.33 nm. Por otro lado, ninguna de las NPs disminuyó drásticamente la viabilidad ni alteraron la morfología, pero la granularidad fue 23.42 ± 1.98 % (con SnO₂) y 28.47 ± 3.59 % (con TiO₂) mayor en monocitos que en neumocitos tipo II, donde las TiO₂ NPs causaron mayor incremento de granularidad que las SnO₂ NPs. Así mismo, de las biomoléculas evaluadas, se observaron cambios en el patrón de ácidos nucleicos con ambas NPs y en ambos tipos celulares; de igual manera las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs alteraron sólo los filamentos de actina en neumocitos tipo II, mientras que, en monocitos, las SnO₂ NPs alteraron filamentos de actina y las TiO₂ NPs desorganizaron microtúbulos y filamentos de actina. Finalmente, la exposición de monocitos a ambas NPs no indujo la activación de monocitos ni un ambiente proinflamatorio, pero si se generaron enormes vacuolas que abarcaban gran área del citoplasma. **Conclusiones:** Los monocitos fueron las células mas susceptibles, debido a que tienen una mayor capacidad para internalizar a las NPs. Las alteraciones en el patrón de ácidos nucleicos y principalmente en el citoesqueleto pueden tener importantes implicaciones en el sistema respiratorio, ya que los monocitos son células móviles de defensa, por lo que una constante exposición a NPs puede conducir a una parcial supresión del sistema inmune que lo haga más vulnerable a otras enfermedades respiratorias.

Abstract

The lung is an organ that is constantly damaged every day by the inhalation of exogenous agents; However, the lung can internalize exogenous agents to later degrade or eliminate them; This basically consists of an immobile barrier made up of epithelial cells, and a mobile barrier that includes cells of the immune system; more specifically, by type II pneumocytes and monocytes, respectively. However, the inhalation of nanoparticles (NPs) represents a serious industrial health problem because these NPs can hardly be degraded or eliminated. Currently there are few toxicity studies evaluating the damage of NPs on two cell types under the same exposure conditions. In addition to this, the evidence for the toxicity of NPs has focused on molecular alterations and not on structural damage. Therefore, in this work the alterations in type II pneumocytes and monocytes produced by exposure to SnO₂ NPs and TiO₂ NPs under the same exposure conditions and time were compared. Because both NPs are of different compounds, our hypothesis was that both NPs would form aggregates of different sizes in suspension and different zeta potentials and would also be amorphous. On the other hand, type II pneumocytes and monocytes would have the ability to internalize NPs in their cytoplasm, but with a different rate of internalization, being higher in the case of monocytes, so granularity, changes in the lipid pattern, proteins, nucleic acids and alteration in the cytoskeleton will be more affected in monocytes than in type II pneumocytes.

Materials and method: SnO₂ NPs (Sigma Aldrich, 549657-5G) and TiO₂ NPs (Sigma Aldrich, 637254-50G) characterization was carried out to know their shape, zeta potential and size of agglomerates in suspension. On the other hand, type II pneumocytes (ATCC, CCL-185) and monocytes (ATCC, TIB-71) were cultured in F-12K medium and DMEM, respectively, both mediums supplemented with 20% extracellular vesicle-free fetal bovine serum (SFB^{SV}). Subsequently, both cell types were exposed to 1, 10 or 50µg/cm² of SnO₂ NPs or TiO₂ NPs for 24 h to evaluate viability, morphology, granularity, cell ultrastructure, biomolecular pattern and cytoskeleton arrangement. In the case of monocytes, the possible activation and production of cytokines were also evaluated. As a positive control, the stimulus with LPS (1µg/mL) was used. **Results:** Both NPs were amorphous, presenting zeta

potential of -8.41 ± 0.55 mV and hydrodynamic size of 248.19 ± 13.38 nm in F-12K medium while in DMEM medium they presented potential ζ of -8.79 ± 1.15 and hydrodynamic size of 193.17 ± 4.36 nm. The TiO₂ NPs had a zeta potential of -9.69 ± 0.46 mV and hydrodynamic size of 427.73 ± 1.73 nm in F-12K medium while in DMEM medium they presented zeta potential ζ of -9.69 ± 0.46 and hydrodynamic size of 426.27 ± 27.33 nm. On the other hand, both NPs did not drastically decrease viability or alter morphology, but the granularity was 23.42 ± 1.98 % (with SnO₂) and 28.47 ± 3.59 % (with TiO₂) greater in monocytes than in type II pneumocytes, where TiO₂ NPs caused a greater increase in granularity than SnO₂ NPs. Likewise, of the biomolecules evaluated, changes were observed in the nucleic acid pattern with both NPs and in both cell types; Similarly, SnO₂ NPs and TiO₂ NPs altered only actin filaments in type II pneumocytes, while, in monocytes, SnO₂ NPs altered actin filaments and TiO₂ NPs disorganized microtubules and actin filaments. Finally, the exposure of monocytes to both NPs did not induce the activation of monocytes or a pro-inflammatory environment, but it did generate huge vacuoles that covered a large area of the cytoplasm. **Conclusions:** Monocytes were the most susceptible cells, because they have a greater capacity to internalize NPs. Alterations in the nucleic acid pattern and mainly in the cytoskeleton, this can have important implications in the respiratory system, since monocytes are mobile defense cells, so that a constant exposure to NPs can lead to a partial suppression of the system. immune that makes you more vulnerable to other respiratory diseases.

1. Introducción

1.1 El sistema respiratorio

El sistema respiratorio, es un sistema indispensable para realizar el intercambio gaseoso a través de la inhalación de oxígeno (O₂) y exhalación de dióxido de carbono (CO₂); en general, este sistema está conformado por la nariz, laringe, tráquea, diafragma y los pulmones (Haddad & Sharma, 2020).

Este proceso de intercambio gaseoso es relativamente sencillo cuando el O₂ llega a los alveolos, el O₂ pasa al torrente sanguíneo a través de los capilares y es reclutado por los eritrocitos con ayuda de la hemoglobina; posteriormente la sangre rica en O₂ fluye de regreso al corazón, que a su vez la bombea a través de las arterias para que llegue a los diferentes tejidos. Una vez que llegan los eritrocitos a los tejidos, la molécula de O₂ se libera de la hemoglobina y el O₂ se traslada a la células. Por otro lado, el CO₂ producido por las células se va hacia los capilares, donde la mayor parte se disuelve en el plasma sanguíneo. Después, la sangre rica en CO₂ regresa al corazón a través de las venas y posteriormente se bombea a los pulmones, donde el CO₂ pasa a los alveolos para ser expulsado.

Todo este proceso ocurre en milisegundos donde el sistema respiratorio trabaja de manera coordinada e involuntaria; se calcula que para lograr una respiración exitosa el pulmón utiliza aproximadamente 40 diferentes tipos de células residentes, algunas de estas células se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Algunos tipos celulares que conforman el pulmón. Se calcula que aproximadamente en el pulmón hay más de 40 tipos celulares diferentes que participan en la respiración pulmonar, cada una de ellas con sus funciones específicas.

Tipo celular	Función	Referencia
Células epiteliales	Delimitar y formar una barrera entre el espacio pulmonar y el torrente sanguíneo	Edelblum & Turner, 2015
Células alveolares	Segregar surfactante para recubrir la superficie interna del alvéolo	Carel, 1998
Células de las glándulas salivales	Producir saliva en el pulmón para mantener humectado el tejido	Ligtenberg & Veerman, 2014
Células del tejido conectivo intersticial	Soporte estructural a todos los demás componentes anatómicos del pulmón	Marchiori, 2014
Células que componen los vasos sanguíneos	Formar redes en forma de tubos y rodear al lumen a través del cual pasa la sangre	Romereim & Cupp, 2018
Células hematopoyéticas y linfoides	Diferenciación celular para mantener todas las características celulares y funcionales necesarias de la sangre	Denner et al. 2010
Células de la pleura	Formar una capa muy delgada que cubre a los pulmones	Thrall, 2018

Además, al realizar el intercambio gaseoso no sólo inhalamos oxígeno, si no también uno puede respirar agentes exógenos como otros gases, bacterias, virus, polen, partículas, etc. Estos agentes exógenos van a causar alteraciones en los pulmones, sin embargo, el sistema puede presentar diferentes mecanismos de defensa para contrarrestar el daño que se este causando.

De manera natural el sistema respiratorio cuenta con células especializadas que van a actuar cuando algún agente exógeno entre al sistema respiratorio, un ejemplo de estas células son los neumocitos tipo II que tienen la capacidad de endocitar en vesículas a bacterias como *Pseudomona aeruginosa* o *Klebsiella pneumoniae* sin embargo los neumocitos tipo II no son capaces de degradar a estos organismos, por lo tanto, sólo las almacenan en su citoplasma para evitar que dañe a otro tipo de células (Chi et al. 1991; de Astorza et al. 2004).

Otro tipo de célula especializada que se encuentra en el pulmón son los monocitos, los cuales tienen la capacidad de internalizar y degradar a diferentes bacterias y hongos como *Listeria monocytogenes* (Narni-Mancinelli et al. 2011), *Escherichia coli* (Li et al. 2021), *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida* (Heung, 2020).

Por lo tanto, los neumocitos tipo II y los monocitos juegan un papel muy importante cuando agentes exógenos ingresan al pulmón, y básicamente podríamos mencionar que el pulmón cuenta con dos barreras principales: la barrera inmóvil y la barrera móvil.

1.2 La barrera inmóvil y móvil del pulmón

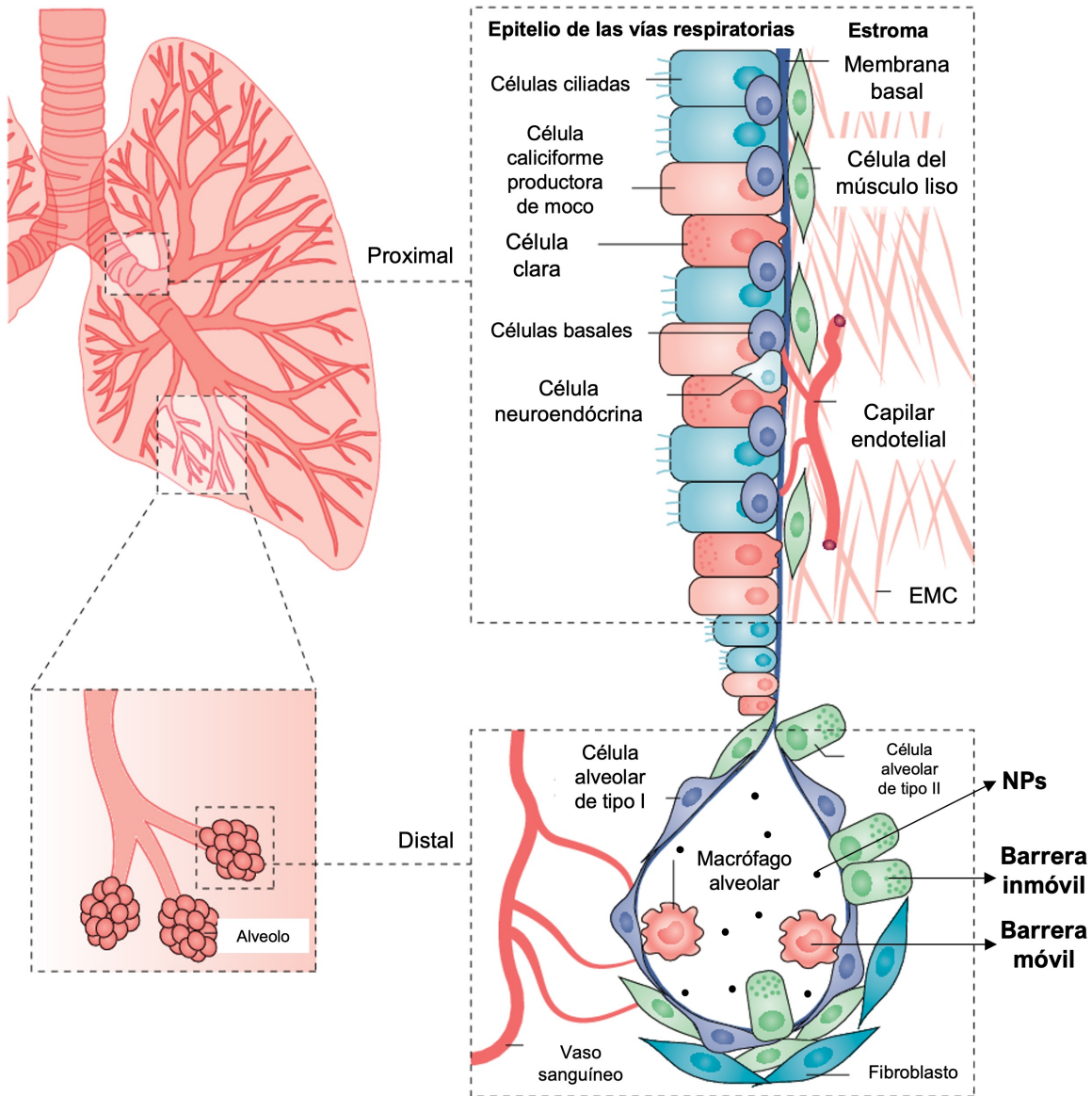
En la región alveolar de los pulmones, que es la región más profunda podemos encontrar diferentes tipos celulares como fibroblastos, neumocitos tipo I, células endoteliales, neumocitos tipo II y células del sistema inmune como monocitos y macrófagos. De este conjunto y de otro tipo de células se forman dos tipos de barreras: la barrera inmóvil compuesta por fibroblastos, neumocitos tipo I, células endoteliales, neumocitos tipo II, entre otras; y la barrera móvil compuesta por monocitos, macrófagos y otras células del sistema inmune. La función estructural de la barrera inmóvil es actuar como barrera física que proteja el tejido

subepitelial (Brune et al. 2015). Se caracteriza por secretar enzimas contra bacterias gram-positivas y gram-negativas (Ellison & Giehl, 1991), inhibidores de proteasas como el inhibidor de serina proteasa, inhibidor de proteasa de leucocitos secretores y elafina, los cuales reducen los efectos de las proteasas que son producidas por los patógenos (Ibrahim et al. 2002). Además, en la barrera inmóvil también se secretan péptidos antimicrobianos de superficie como las β -defensinas que protegen aún más contra numerosos patógenos, incluidos bacterias y virus (McCray & Bentley, 1997).

Básicamente la barrera inmóvil evita que cualquier agente exógeno pueda llegar al tejido subepitelial; por lo que algún daño en esta barrera inmóvil puede conducir a infecciones bacterianas, fibrosis quística (Livraghi & Randell, 2007), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Jansen et al. 1995; Bhowmik et al. 2009) y discinesia ciliar (Boon et al. 2013; Boon et al. 2014).

Por otro lado, la barrera móvil consiste en un arsenal de células del sistema inmune que detectan de inmediato el ingreso de agentes exógenos al tejido pulmonar (Chaudhuri & Sabroe, 2008; Hiemstra et al. 2015) y desencadenan una respuesta pro-inflamatoria o anti-inflamatoria a través de quimioatrayentes mediadores lipídicos, factores de complemento o citocinas (Gerard & Rollins, 2001; Owen, 2001; Sabroe et al. 2002; Panina-Bordignon & D'Ambrosio, 2003).

Para darnos una mejor idea de como se encuentra la barrera móvil e inmóvil podemos observar en el Esquema 1.



Esquema 1.- Tipos celulares presentes en el pulmón. El pulmón está organizado en la zona proximal y distal, a lo largo de estas dos zonas los tipos celulares presentes van cambiando. En los alveolos podemos encontrar a la barrera móvil e inmóvil y también se señalan a las NPs que es la zona en donde se pueden depositar. EMC= matriz extracelular (Imagen modificada de Altorki et al. 2019).

Nosotros nos enfocamos a los neumocitos tipo II que precisamente son parte de la barrera inmóvil y que tienen como funciones principales: 1) síntesis y secreción de las moléculas tensoactivas; 2) metabolismo xenobiótico; 3) movimiento transepitelial del agua y 4) regeneración del epitelio pulmonar después de alguna lesión. También los neumocitos tipo II poseen en su superficie microvellosidades y su citoplasma es rico en organelos como retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, mitocondria, lisosomas, cuerpos multivesiculares y aparato de Golgi. Un

característica especial son los cuerpos lamelares que miden entre 0.2 y 2 μ m de diámetro y que comprenden el 25% del citoplasma de los neumocitos tipo II (Morgenroth & Ebsen, 2008). Esos cuerpos lamelares en su mayoría contienen surfactante, una mezcla de fosfolípidos (principalmente dipalmitoilfosfatidilcolina [DPPC]) y carbohidratos que constituyen el 90%, mientras que el porcentaje restante corresponde a proteínas surfactantes (SP-A, SP-B, SP-C y SP-D). Cuando se libera el surfactante del neumocitos tipo II, se produce una monocapa que recubre la superficie alveolar interna, con una fase acuosa inferior y una fase lipídica superficial (Lowe & Anderson, 2015). Esto ayuda a reducir la tensión superficial en el pulmón, previniendo el colapso alveolar durante la exhalación, manteniendo así la capacidad residual funcional y mejorando la distensibilidad del pulmón (Gien & Kinsella, 2017).

Ahora bien, cuando el epitelio alveolar se expone a ciertos agentes exógenos y el epitelio de los neumocitos tipo I se daña, los neumocitos tipo II pueden diferenciarse y servir como precursores de los neumocitos tipo I para poder reparar el daño epitelial. En el caso de los monocitos que forman a la barrera móvil, este tipo de células se encuentran en los pulmones desde la etapa embrionaria (células residentes) o diferenciarse a partir de células madre pluripotentes de la médula ósea y llegar al pulmón por medio del torrente sanguíneo.

Dentro de las principales funciones de los monocitos es eliminar el exceso de surfactante a través de lisosomas y secretar gran cantidad de enzimas, como colagenasas, elastasas e hidrolasas ácidas. Además, estas células presentan una gran movilidad ya que pueden remodelar fácilmente su adherencia celular, esto les ayuda para fungir como sensoras tisulares y ante un agente exógeno o algún daño tisular, llevar a cabo la fagocitosis. El movimiento de los monocitos esta basado en el principio de la quimiotaxis, un fenómeno donde las células tienden a moverse en una dirección determinada por la influencia de estímulos químicos, en este caso estos estímulos pueden ser producidos por alguna bacteria o por células que se encuentran en el sitio de alguna lesión o alguna invasión (Shereck et al. 2012).

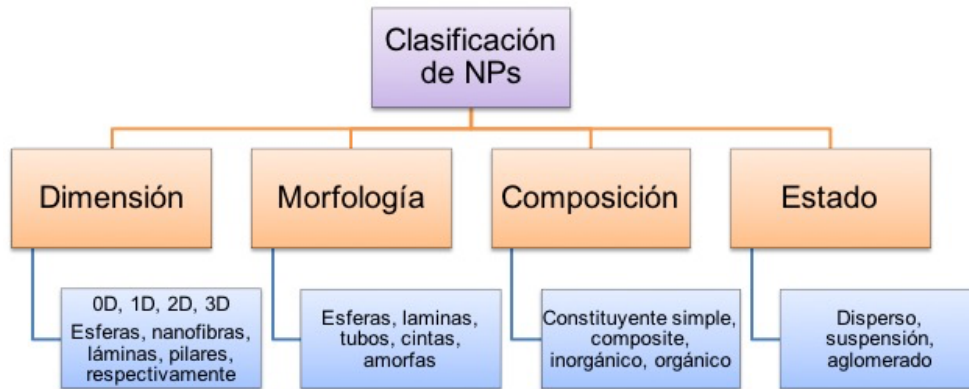
Por consiguiente, los neumocitos tipo II y monocitos tienen diferentes funciones sin embargo sus papeles en el pulmón son complementarios y esto da pauta a que se mantenga la integridad del pulmón.

Un área donde se ha estudiado poco la respuesta de la barrera inmóvil y móvil es en la nanotoxicología, es decir; la exposición de tipos celulares que conformen a las dos barreras ante el estímulo a NPs; esto resulta ser muy interesante porque cada día la exposición de los humanos a las NPs por vía inhalatoria ha ido incrementando.

1.3 El mundo de las NPs y sus efectos en las células

De acuerdo con la Comisión Europea las NPs y los nanomateriales están muy relacionados ya que las NPs son partículas que en alguna de sus dimensiones tiene un tamaño de 1 a 100 nm; mientras que un nanomaterial puede ser de origen natural, incidental o manufacturado, pero necesariamente debe de contener NPs, al menos el 50% de su volumen, no importando si las NPs se encuentran en un estado libre, agregado o aglomerado (Comisión Europea, 2011). Sin embargo, dependiendo de la organización que uno consulte, la definición de NPs y nanomaterial puede variar.

También la clasificación de las NPs y nanomateriales puede variar según el autor o dependiendo del área de interés (Esquema 2), sin embargo, la más utilizada es la clasificación por su dimensión reflejada en si son de 0 (puntos cuánticos), 1 (nanovarillas), 2 (grafeno) o 3 dimensiones (fulerenos); o por su composición ya sea que estén formadas por carbón (nanotubos de carbón), con base en polímeros o lípidos (NPs orgánicas), metales (oro, plata), metaloides (silicio) u óxidos metálicos (dióxido de titanio y dióxido de estaño) (Malakar et al. 2020).



Esquema 2.- Clasificación de NPs dependiendo de su estudio. Estas son algunos tipos de clasificación de NPs basados en su dimensión, morfología, composición y estado, sin embargo, dependiendo del autor es la clasificación que uno puede encontrar (Imagen modificada de Saleh et al. 2020).

Cada una de las NPs antes mencionadas tienen diferentes aplicaciones y por lo tanto el humano está expuesto por diferentes vías que son por ingestión, penetración a través de la piel, inyección o por vía inhalatoria. Esta última vía es la ruta principal de exposición, debido a que las NPs fácilmente se suspenden en el aire (Malakar et al. 2020) y en los ambientes ocupacionales donde se sintetiza, almacena, se aplican y se transportan las NPs, los trabajadores están expuestos principalmente por vía inhalatoria ya que en muchas ocasiones el material de seguridad que se les brinda no es el adecuado debido a que las NPs son menores a 100nm, por lo que las NPs fácilmente pueden atravesar un cubrebocas común o también un respirador desechable para partículas N100, 8233.

El depósito de NPs depende de su tamaño, ya que partículas grandes se van a alojar al principio de las vías respiratorias mientras que las de menor tamaño pueden llegar hasta la zona de los alveolos. Sea donde sea el depósito de NPs, siempre va a existir una interacción entre las NPs y las células que conforman esa región del sistema respiratorio. Se ha reportado que diferentes tipos de NPs principalmente generan estrés oxidativo, genotoxicidad, lipoperoxidación y liberación de moléculas que inducen inflamación tisular y esto se ve reflejado en asma, neumoconiosis y fibrosis pulmonar (Li et al. 2010).

A nosotros nos interesa la región alveolar porque es la región precisamente en donde se realiza el intercambio gaseoso y es en donde pueden llegar las NPs

más pequeñas, de las cuales se ha reportado que entre más pequeñas sean las NPs más toxicidad pueden presentar.

Algo muy importante de mencionar es que las células que conforman a la barrera inmóvil y móvil son capaces de internalizar NPs en su citoplasma.

Cuando las NPs son internalizadas, las funciones antes mencionadas de los neumocitos tipo II y los monocitos pueden ser alteradas, debido a que las NPs pueden interaccionar con los componentes biológicos y no pueden ser degradadas debido a que son materiales sólidos e insolubles.

La inhalación de NPs es un problema de salud ocupacional y dos NPs que han llamado la atención son las NPs de dióxido de titanio (TiO_2 NPs) y dióxido de estaño (SnO_2 NPs) ya que estas NPs tienen propiedades fisicoquímicas muy similares y se emplean en el campo de energías renovables y purificación de aguas residuales.

En el caso de las TiO_2 NPs, estas han sido estudiadas desde la década de los 60, sin embargo, su utilización y demanda ha ido incrementando con el paso de los años y actualmente en uno de los nanomateriales más producidos a nivel mundial, incluso está clasificado por la IARC como posible cancerígeno para humanos. Para las SnO_2 NPs, la toxicidad aún no es muy conocida y aún no hay suficientes estudios que evalúen sus efectos en células humanas, pero algo muy interesante es que la industria ha propuesto a las SnO_2 NPs como un material semiconductor que puede ser aprovechado de mejor manera y junto con otros materiales para mejorar el resultado de cierto producto, por lo que las SnO_2 NPs se consideran como NPs emergentes.

Las SnO_2 NPs y TiO_2 NPs comparten algunas propiedades fisicoquímicas que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Tabla comparativa de las propiedades físicas y químicas del dióxido de estaño y dióxido de titanio. Aunque el SnO₂ y TiO₂ son extraídos de diferente mineral y su composición química es diferente, tienen propiedades químicas muy similares.

	Dióxido de estaño (SnO₂)	Dióxido de titanio (TiO₂)
CAS	18282-10-5	1317-80-2
CID PubChem	29011	26042
Otros nombres	Óxido de estaño (IV), óxido estannico, casiterita	Óxido de titanio (IV), titania, aditivo E171
Composición química	Estaño (78.76%) Oxígeno (21.21%)	Titanio (59.93%) Oxígeno (40.55)
Principal fuente de extracción	Casiterita	Ilmenita
Peso molecular	150.71 g/mol	79.87 g/mol
Densidad 25°C	6.95 g/mL	3.9 g/mL
Solubilidad	Ácido sulfúrico y ácido clorhídrico	Ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico y ácido nítrico
Punto de fusión	1630°C	1830 °C
Punto de ebullición	1800-1900°C	2500 °C
Fase cristalina	Cúbica (alfa), tetragonal (beta) y ortorrómbica (gama)	Anatasa, rutilo y broquita
Band gap	3.6 eV	3.2 eV
Estado de oxidación	+4	+4
Tipo de conductor	n	n
Degradación de colorantes	Azul de metileno, naranja de metilo y negro de eriocromo T	Azul de metileno, naranja de metilo y negro de eriocromo T
Índice de refracción	2.0	2.5-3

La similitud entre algunas propiedades fisicoquímicas nos hace pensar que por esta razón es que se proponen que ambas NPs sean aplicadas en los nanomateriales para un mejor aprovechamiento de estas.

Se han realizado diferentes estudios para evaluar la toxicidad de SnO₂ NPs y TiO₂ NPs, sin embargo, en la mayoría, la toxicidad se evalúa sólo en un tipo celular y en concentraciones que no se asemejan a las concentraciones reales a las que un humano estaría expuesto. Por lo tanto, los diferentes estudios no son comparables y no se puede concluir si ciertas NPs son tóxicas o no.

Sin embargo, vamos a mencionar algunos artículos donde precisamente comparan la toxicidad de cierta NP sobre monocitos y neumocitos tipo II. Por ejemplo, en el 2008 se compararon los efectos de NPs de óxido de zinc en monocitos y neumocitos tipo II, encontraron que a una concentración de 25 µg/mL

se activa TNF- α y HO-1 (Xia et al. 2008). Así mismo, estas NPs causan una mayor generación de especies reactivas de oxígeno en la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Heng et al. 2011).

También otro trabajo, encontró que cuando estos dos tipos de células son expuestas a partículas derivadas de la combustión de gas se produce daño a DNA, sin embargo, quienes sufren más daño en el material genético son los monocitos en comparación con los neumocitos tipo II (Durga et al. 2014). Es importante mencionar es que en monocitos se induce la respuesta antioxidante a través de la expresión de γ -GCLC y HO-1 cuando son expuestas a NPs de dióxido de silicio (Panas et al. 2012).

Estos antecedentes donde comparan la toxicidad de cierta NPs en ambos tipos celulares nos hace pensar que los monocitos pueden ser más susceptibles que los neumocitos tipo II, sin embargo, no hay evidencia que respalde esta hipótesis. Además, nosotros realizamos la evaluación bajo las mismas condiciones de exposición y con concentraciones consideradas no tóxicas lo cual nos ayuda a poder tener una mejor perspectiva del comportamiento de estos dos tipos celulares y también enfocándonos en aspectos biomoleculares y estructurales, como son los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y el citoesqueleto.

2. Justificación

La barrera inmóvil y móvil del pulmón están diariamente en constante actividad para poder mantener la fisiología y homeostasis, las cuales pueden ser alteradas por la entrada de agentes exógenos.

Dos tipos de células que conforman a la barrera inmóvil y móvil son los neumocitos tipo II y los monocitos respectivamente, ambos tipos de células tienen la capacidad de internalizar agentes exógenos, como bacterias, virus y polen.

Sin embargo, los estudios aún no son suficientes sobre la internalización y efectos de las NPs en neumocitos tipo II y monocitos, además de que los estudios existentes utilizan elevadas concentraciones de NPs y no comparan un mismo tipo de NP sobre diferentes tipos celulares.

Lo específico de este trabajo radica en que utilizamos SnO₂ NPs, un material emergente en el campo de la nanotecnología y las TiO₂ NPs, que ha sido ampliamente estudiado, pero del que aún se sigue investigando su toxicidad para determinar si las TiO₂ NPs son carcinógenas para humanos.

Además, en este trabajo las células fueron expuestas a las mismas concentraciones y tiempo de exposición.

Es importante mencionar también que en este estudio se observó la internalización de las SnO₂ NPs en neumocitos tipo II y monocitos (anteriormente no reportado) y se realizó la evaluación del perfil biomolecular con respecto a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; además evaluamos el perfil estructural del citoesqueleto de estas células, aspectos que posiblemente son alterados por las NPs pero de lo que aún no se tiene suficiente evidencia.

3. Hipótesis

Las concentraciones utilizadas de NPs no disminuirán la viabilidad celular. Así mismo, las NPs serán internalizadas por los neumocitos tipo II y monocitos causando el aumento en la granularidad de ambos tipos celulares, pero debido a la capacidad fagocítica de los monocitos, la granularidad será mayor en este tipo de células.

La internalización de las NPs desencadenará estrés celular reflejada en la disminución de la absorbancia de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; esta condición de estrés también disminuirá la fluorescencia de filamentos de actina y microtúbulos y estos resultados serán más evidentes con las TiO₂ NPs.

En el caso de los monocitos la exposición a NPs incrementará los marcadores de activación de superficie como CD80, CD86 y MHCII, así como la liberación de citocinas pro-inflamatorias e inflamatorias como IL-6, INF- γ e IL-7.

Todos estos resultados serán mas evidentes por la exposición a TiO₂ NPs con respecto a las SnO₂ NPs.

4. Objetivo

4.1 Objetivo general

Comparar las alteraciones estructurales y biomoleculares de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a nanopartículas de dióxido de estaño y nanopartículas de dióxido de titanio.

4.2 Objetivos particulares

- Describir la forma de las nanopartículas, potencial zeta, diámetro hidrodinámico en medio de cultivo y espectro infrarrojo de emisión
- Evaluar la viabilidad de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a 1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nanopartículas de dióxido de estaño (SnO₂ NPs) ó nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂ NPs)

- Describir la morfología celular de neumocitos tipo II y monocitos, así como observar la presencia de las NPs en el cultivo
- Medir la internalización y cuantificar la granularidad de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs
- Evaluar la absorbancia de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs
- Observar el arreglo del citoesqueleto en la parte basal y apical de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs
- Analizar la activación de monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs.
- Evaluar la producción de citocinas en monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs

5. Materiales y método

5.1 Caracterización de las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs

Las SnO₂ NPs (Sigma Aldrich, No. de catálogo 549657-5G) y TiO₂ NPs (Sigma Aldrich, No. de catálogo 637254-50G) fueron caracterizadas para conocer su tamaño primario y forma a través de microscopía electrónica de barrido (SEM - por sus siglas en inglés), para lo cual se colocó una pizca de ambas NPs en dos portaobjetos para tomar las imágenes en el aparato JEOL 5800 (LV Japón) a un voltaje de 15 kV, magnificación de 5000X y resolución de 26 pixeles/nm².

Para conocer el tamaño hidrodinámico que forman las NPs en suspensión, así como la carga neta de las NPs (potencial zeta), las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs fueron suspendidas en medio F-12K+20% SFB^{SV} o DMEM+20% SFB^{SV} y sonicadas a 40 KHz por 30 min para realizar las lecturas subsecuentes en el aparato Zetasizer Nano-ZS90.

Además, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se utilizó para observar el patrón de difracción de las NPs, en el espectrómetro Jasco FT/IR-6600 (Jasco Corporation, Tokio Japón) en el modo de muestreo ATR-FTIR. Para lo cual se depositó una muestra de polvo seco de cada NP sobre la superficie del cristal ATR. Además, las NPs se suspendieron en 1 mL de solución salina (NaCl al 0,9%) y se secaron a temperatura ambiente durante 12 min antes de la lectura por FTIR.

5.2 Cultivo celular y establecimiento de las condiciones de exposición

Los neumocitos tipo II (células A549) (ATCC, No. de catálogo CCL-185) fueron cultivadas en medio F-12K (In Vitro, No. de catálogo ME-038). Por otro lado, los monocitos (células RAW 264.7) fueron donados por la Dra. Leticia Moreno Fierros de la FES Iztacala y cultivadas en medio DMEM (ThermoFisher, No. de catálogo 11995065). Ambos cultivos fueron suplementados con 20% de SFB^{SV}, 1% de antibiótico-antimicótico (InVitro, No. de catálogo A-07) y mantenidas a 37°C con 5% de CO₂ para mantener el pH óptimo. Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, los neumocitos tipo II fueron despegados con solución de tripsina (InVitro, No. de catálogo EN-008); mientras que los monocitos fueron despegados con ayuda de un “scraper”. Ambas suspensiones de células fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 min y se realizó el conteo de células totales en cámara de Neubauer con solución de azul de tripano al 0.4% (InVitro, No. de catálogo SR-15).

Para establecer las concentraciones de NPs para la exposición *in vitro* nos basamos en Gangwall y colaboradores (2011), donde reportan que la exposición de células a 40.6 µg/cm² de NPs (de 100 nm de diámetro) durante 24 h, es equivalente a la exposición ocupacional de un trabajador durante 45 años. Por lo tanto, basándonos en la ficha técnica de las NPs, las partículas utilizadas fueron menores a 100 nm, por consiguiente, decidimos utilizar las concentraciones de 1, 10 y 50 µg/cm² realizándose la exposición durante 24 h la cual simula una exposición ocupacional aguda. Para realizar la exposición *in vitro*, se pesó 1 mg de NPs las cuales fueron esterilizadas a 120°C por 20 min. Subsecuentemente, las NPs fueron suspendidas en 1 mL de F-12K+20% SFB^{SV} o DMEM+20% FBS^{U-CENT} (según fuera el caso) y sonicadas a 40 kHz por 30 min. La cantidad requerida de NPs (dependiendo del área de las cajas de cultivo) fue tomada de las soluciones stock para llevar a cabo la exposición de las células a las concentraciones antes mencionadas. La exposición de las células a NPs se realizó a 37°C con 5% CO₂ durante 24 h.

5.3 Viabilidad celular

La viabilidad celular se realizó por dos métodos, el primero consistió por exclusión de azul de tripano, donde en placa de 12 pozos, se sembraron 100,000 células y cultivadas por 24 h para posteriormente ser expuestas a SnO₂ NPs ó TiO₂ NPs por 24 h. Después de la incubación, las células fueron incubadas con solución de azul de tripano y tripsina (dilución 1:10) para despegar las células. El conteo de células no teñidas (células viables) y células teñidas (no viables) se realizó en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer. Para calcular el porcentaje de células viables, se utilizó la fórmula propuesta por Strober et al. (2001).

Por otro lado, otro método empleado para evaluar la viabilidad fue por reducción de MTT, donde se sembraron 20,000 monocitos en cada pozo de una placa de 96 pozos con 100 µL de medio completo durante 24 h. Enseguida el medio de cultivo fue retirado y las células fueron lavadas una vez con 100 µL de PBS 1X estéril por cada pozo, posteriormente las células fueron expuestas a 0, 1, 10 y 50 SnO₂ NPs y TiO₂ NPs por 24 h. Después el sobrenadante fue retirado y las células fueron incubadas con el reactivo de MTT durante 2.5 h. Posteriormente el sobrenadante fue desechado y los cristales de formazán fueron disueltos en 200 µL de isopropanol, enseguida se resuspendió la solución y los sobrenadantes fueron colocados en tubos de 200 µL para ser centrifugados a 1500 rpm. Después, el pellet de NPs fue descartado y 100 µL del sobrenadante fue colocado en una nueva placa de 96 pozos que fue leída a 750 nm en el sistema de espectrofotómetro BioTek Epoch Multi-Volumen.

5.4 Ultraestructura celular

Se sembraron 500,000 células las cuáles fueron expuestas a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs por 24 h. Después, las células fijadas con 2.5% de glutaraldehído-formaldehído en PBS por 1 h. Enseguida se realizó una segunda fijación con 2% de tetraóxido de osmio (O₂O₄) (1:1 en PBS) por 1 h. Después, las células fueron deshidratadas con diferentes concentraciones de etanol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90%) y embebidas en resina epóxica, cada intervalo por 10 min.

Después las células fueron infiltradas en una mezcla de etanol absoluto y resina epóxica (Epon 812, Sigma Aldrich). Ultrasecciones de 70nm fueron teñidas

con citrato de plomo y acetato de uranilo alcohólico y observadas en el microscopio Car Zeiss, modelo Auriga y procesadas en el software SmartSEM.

5.5 Granularidad celular

En cajas de 21 cm² se sembraron 500,000 células las cuales fueron cultivadas por 24 h y expuestas a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs por 24 h. Después las células fueron despegadas y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min para ser fijadas en alcohol etílico al 70% por 24 h. Para la lectura de las células, las células fueron suspendidas en 1 mL de Fasc Flow (BD Biosciences, No. de catálogo 342003) en tubos BD Falcon. Se realizó la lectura de 10,000 eventos en el citómetro de flujo (BD FASCalibur). Los datos fueron presentados en histogramas; el detector de dispersión frontal (forward-scattered light – FSC, por sus siglas en inglés) correspondió al tamaño celular mientras que detector de dispersión lateral (side-scattered light – SSC, por sus siglas en inglés) representó a la granularidad celular.

5.6 Patrón molecular

Las huellas dactilares moleculares de las células expuestas a las NPs se realizaron mediante FTIR en el rango espectral 4000-400 cm⁻¹. Después de la exposición a NPs, las células se recolectaron y lavaron dos veces y se suspendieron en solución salina. Luego, se depositaron 4 µL de suspensión celular sobre el cristal ATR-FTIR. El espectro derivado de 240 adquisiciones de datos y absorbancia de bandas espectrales se expresó como longitud de onda cm⁻¹.

5.7 Arreglo del citoesqueleto apical y basal

Se colocó un cubreobjetos estéril en cada pozo de una placa de 12 pozos y se sembraron 100,000 células las cuáles fueron expuestas a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs por 24 h. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% por 2 h, permeabilizadas con acetona fría por 5 min y bloqueadas con albúmina sérica (1%) a 37°C por 1.5 h. Después, las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal α -tubulina (ThermoFisher, No. de catálogo 322588, dilución 1:200 en PBS) y faloidina rodaminada (Molecular Probes, No. de catálogo R415, dilución 1:200 en PBS) a 37°C por 2 h. El núcleo fue teñido con el fluorocromo Hoechst (Thermo Scientific, No. de catálogo 62249, dilución 1:1500 en PBS). Después de cada incubación con los anticuerpos, las muestras fueron extraídas tres veces con

PBS-tritón (0.5%). Finalmente, las células fueron montadas en un portaobjetos con solución de PBS-glicerol (solución 1:3) y sellados con barniz de uñas. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio Leica TCS SP8 y se mostraron las imágenes más representativas de tres experimentos independientes.

5.8 Localización de vacuolas

Se colocó un cubreobjetos estéril en cada pozo de una placa de 12 pozos donde se sembraron 150,000 células, las cuáles fueron expuestas a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs por 24 h. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% por 2 h, permeabilizadas con acetona fría por 5 min y bloqueadas con albúmina sérica (1%) a 37°C por 1.5 h. Después, las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal α -tubulina (ThermoFisher, No. de catálogo 322588, dilución 1:200 en PBS) y faloidina rodaminada (Molecular Probes, No. de catálogo R415, dilución 1:200 en PBS) a 37°C por 2 h. El núcleo fue teñido con el fluorocromo Hoechst (Thermo Scientific, No. de catálogo 62249, dilución 1:1500 en PBS).

Después de cada incubación con los anticuerpos, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS-tritón (0.5%). Finalmente, las células fueron montadas en un portaobjetos con solución de PBS-glicerol (solución 1:3) y sellados con barniz de uñas. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio Leica TCS SP8; en cada muestra se realizó un aumento de 4X a partir de aumento de 63X. Se mostraron las imágenes más representativas de tres experimentos independientes.

5.9 Activación de monocitos

Se sembraron 500,000 células las cuáles fueron expuestas a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de SnO₂ NPs ó 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO₂ NPs por 24 h. Después de los tratamientos, los sobrenadantes fueron recuperados y almacenados a 4°C. Por otro lado, las células fueron extraídas constantemente con PBS, despegadas y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Las células fueron bloqueadas a 4°C con el anticuerpo anti-ratón CD16/32 (Biolegend, No. de catálogo 101302), dilución 1:100 en PBS con albúmina por 15 min. Después las células fueron fijadas con paraformaldehído por 20 min y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. El sobrenadante fue desechado y las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD11b-FITC, CD86-PE, CD80-(PE-Cy5), MHCII-Cy5, dilución 1:100 para todos los anticuerpos. Para la lectura, las

muestras fueron suspendidas en 1 mL de Fasc Flow (BD Biosciences, No. de catálogo 342003) en tubos BD Falcon llevándose a cabo la lectura de 10,000 eventos en el citómetro de flujo (BD FASCalibur).

5.10 **Producción de citocinas**

Los sobrenadantes previamente almacenados fueron utilizados para realizar la cuantificación de citocinas por medio del kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Bioscience, No. de catálogo 560485), de acuerdo con las indicaciones del fabricante y realizando las siguientes modificaciones: todos los pasos fueron realizados en microtubos, donde la curva estándar se realizó a partir de la concentración de 5 pg/mL para determinar las concentraciones de citocinas por debajo de la curva recomendada por el fabricante. Las intensidades de fluorescencia se midieron utilizando un citómetro FASCalibur y el software CB BDA.

5.11 **Análisis estadístico**

Para todos los experimentos al menos se realizaron tres experimentos independientes y se llevó a cabo el análisis estadístico con ANOVA con la prueba de Bonferroni. Los datos $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes y fueron plasmados en gráficas de barras con desviación estándar en el programa GraphPad Prism 6. Además en los datos cuantitativos los resultados con diferencia significativa fueron descritos con sus valores y grados de libertad.

6. **Resultados**

6.1 **Caracterización de las NPs**

La ficha técnica de las NPs menciona que son menores a 100 nm, pero nosotros decidimos corroborar esta información por microscopía electrónica de barrido, donde efectivamente se observó que las NPs fueron amorfas y menores a 100 nm de diámetro. Así mismo por medio de FTIR se registró una absorbancia entre 400 y 800 cm^{-1} que corresponde a la unión de O-Sn-O, por lo que las NPs no presentaban otros elementos; en el caso de las TiO_2 NPs se registraron dos picos de absorbancia, uno aproximadamente en 500 cm^{-1} que corresponde a la unión entre O-Ti-O y otro aproximadamente en 3300 cm^{-1} que es del grupo OH.

Por otro lado, al suspender las SnO_2 NPs y TiO_2 NPs en medio F-12K suplementado con 20% de SFB^{SV} las NPs formaron tamaños cercanos a 250 nm y

420 nm respectivamente, dando como resultado el potencial zeta de -9 mV. Sin embargo, cuando las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs fueron suspendidas en medio DMEM suplementado con 20% de SFB^{SV}, el tamaño de los aglomerados fue ~200 nm y ~400 nm respectivamente, con potencial zeta similar a -9 mV.

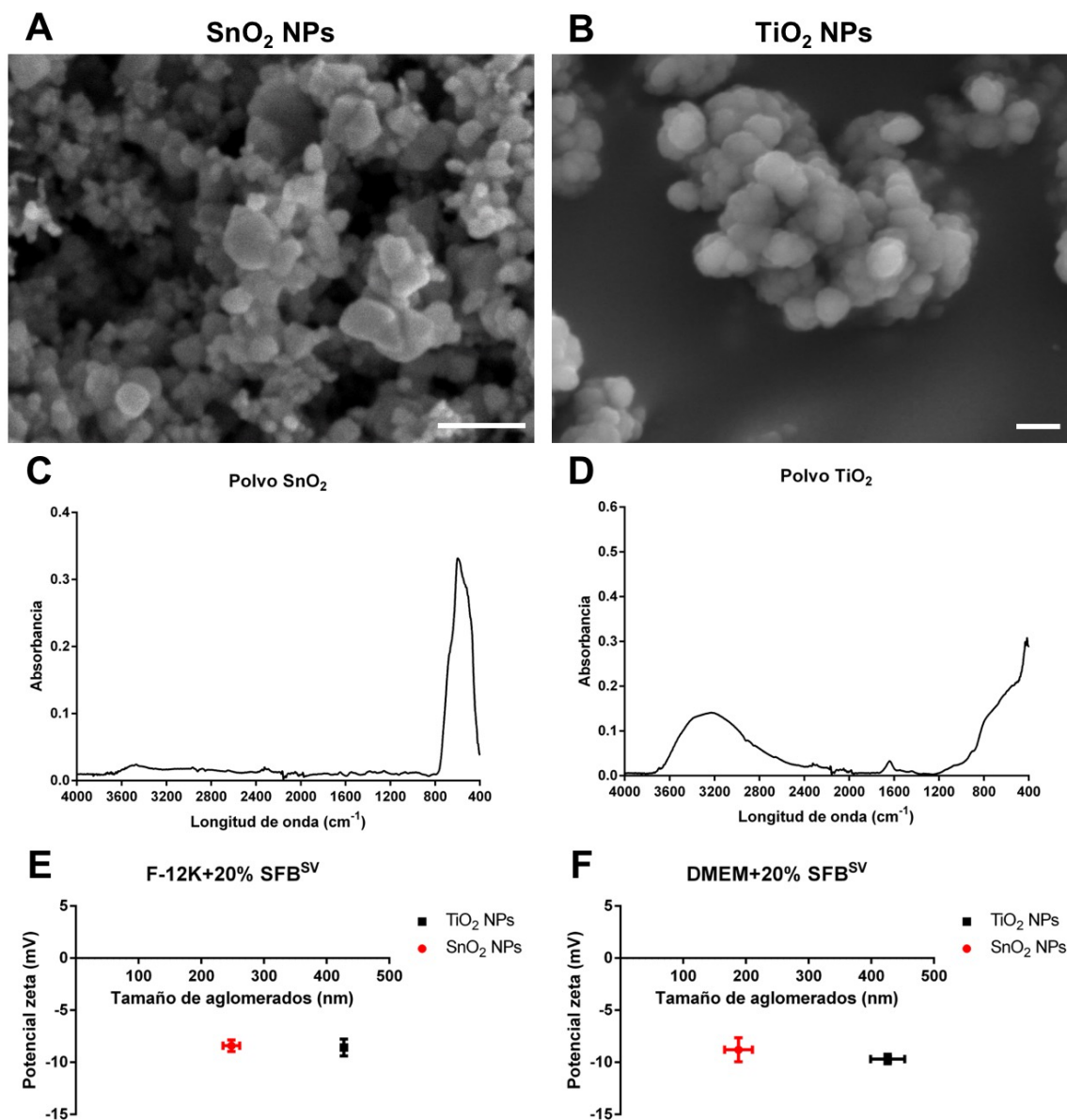


Fig. 1.- Ambas NPs fueron amorfas y menores a 100 nm, sin embargo, las TiO₂ NPs formaron aglomerados más grandes en suspensión. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de A) SnO₂ NPs y B) TiO₂ NPs donde se observa que las NPs son amorfas y menores a 100nm. C) Absorbancia del polvo de SnO₂ y D) TiO₂ en el rango de 400 a 4,000 cm⁻¹. E) Tamaño de aglomerados y potencial zeta de SnO₂ NPs y F) TiO₂ NPs suspendidas y sonicadas a 40 Hz por 30 min en medio F-12K+20% SFB^{SV} y DMEM+20% SFB^{SV}. Se muestran las imágenes representativas. n=3. Barra de escala=100 nm.

6.2 Viabilidad celular

El tratamiento de neumocitos tipo II a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs (1, 10 y 50 µg/cm²) no redujo la viabilidad celular a las 24 h. Para el caso de los monocitos, solo las TiO₂ NPs disminuyeron la viabilidad celular al 94.07 ±2.72% obteniéndose diferencias significativas comparado contra el grupo control.

Tabla 3.- Viabilidad celular de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. La viabilidad se evaluó por el método de reducción de MTT y exclusión de azul de tripano, para el caso del primero método los datos fueron normalizados con respecto al grupo control. Sólo se encontraron diferencias significativas en el caso de monocitos expuestos a 50 µg/cm² de TiO₂ NPs. Como control positivo se utilizó LPS, sin embargo, este estímulo tampoco redujo la viabilidad celular. Se muestran los resultados en porcentaje junto con la desviación estándar. n=3. *p<0.05 Vs Ct.

Neumocitos tipo II										
	SnO ₂ NPs				TiO ₂ NPs					
	Ct	1 µg/cm ²	10 µg/cm ²	50 µg/cm ²	LPS	Ct	1 µg/cm ²	10 µg/cm ²	50 µg/cm ²	LPS
Reducción de MTT	100	98.7±0.8	100.3±1.8	101.8±3.9	103.3±2.9	100	108.0±6.3	109.2±7.1	105.1±1.7	101.3±3.4
Método de exclusión de azul de tripano	99.3±0.5	99.4±0.3	98.2±0.3	98.4±0.3	99.3±0.4	98.7±1.2	97.7±1.9	98.0±2.1	94.8±0.7	95.5±3.7
Monocitos										
	SnO ₂ NPs				TiO ₂ NPs					
	Ct	1 µg/cm ²	10 µg/cm ²	50 µg/cm ²	LPS	Ct	1 µg/cm ²	10 µg/cm ²	50 µg/cm ²	LPS
Reducción de MTT	100.0	97.8±2.0	106.4±2.9	108.0±5.9	104.8±5.0	100	112.8±6.4	115.3±8.3	109.7±2.8	102.2±6.0
Método de exclusión de azul de tripano	98.7±0.7	99.2±0.3	98.4±0.9	97.4±1.2	97.1±2.1	99.1±0.3	97.8±1.7	98.0±1.2	94.1±2.7 *	97.8±1.9

*p<0.05 vs Ct

6.3 Morfología celular y presencia de las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs en el cultivo

Los neumocitos tipo II se observaron como células ovaladas y alargadas a través del microscopio de campo claro (Fig. 2A); mientras que las NPs se observaron puntos negros en el cultivo celular.

Por otro lado, los monocitos son células mas pequeñas de forma ovalada que tienden a formar especies de racimos en cultivo celular; y de la misma manera las NPs se observaron como puntos negros (Fig. 2B). Para el caso de las células tratadas con LPS, la morfología celular se observó aparentemente igual que las células sin tratamiento.

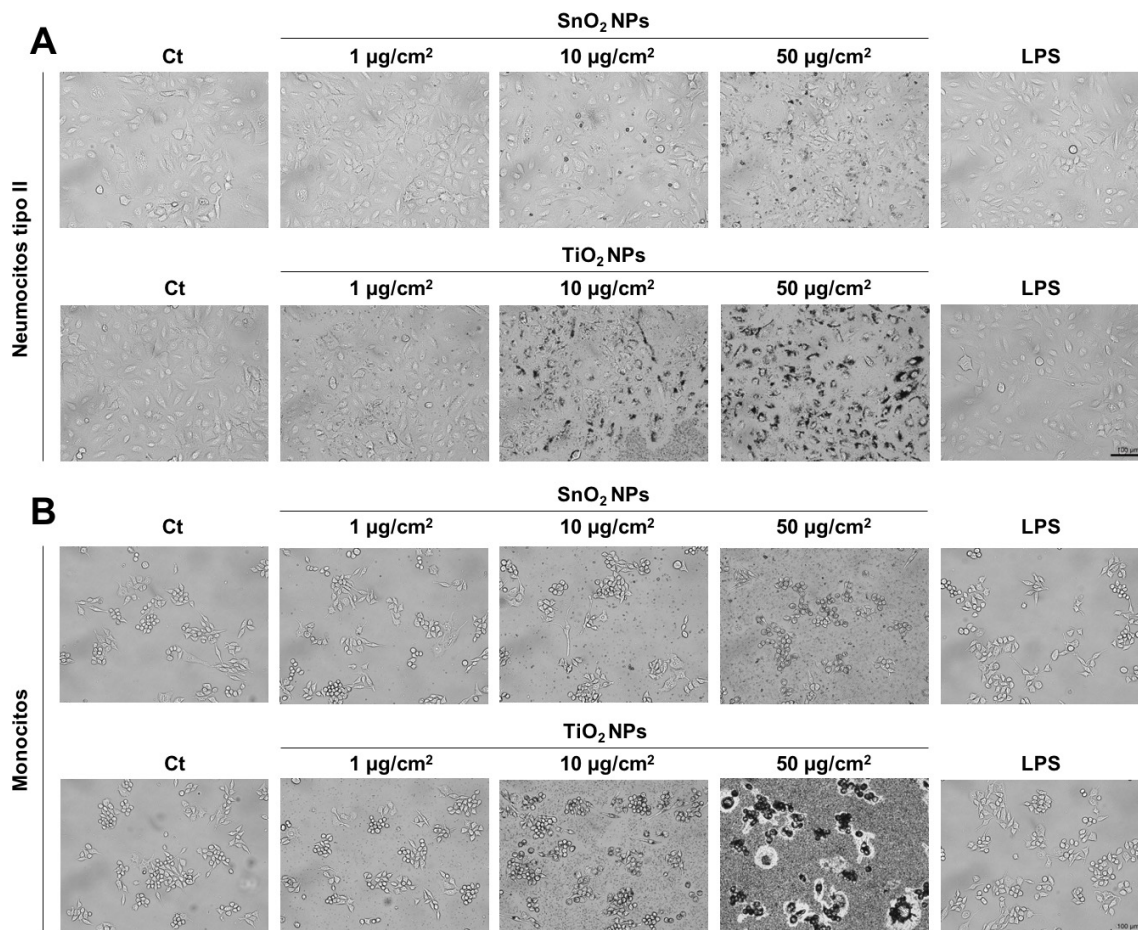


Fig. 2.- Imágenes del cultivo de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Imágenes de campo claro de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a 0 (Ct), 1, 10 y 50 µg/cm² SnO₂ NPs y TiO₂ NPs durante 24 h. Como control positivo se utilizó LPS. Ambos tipos de NPs se observan como puntos negros dentro del cultivo celular. Se muestran las imágenes más representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala: 100 µm.

6.4 Ultraestructura celular

Debido a la electrodensidad que presentan las NPs fue posible observarlas por diferentes técnicas de microscopía, por ejemplo, por microscopía electrónica de transmisión donde las NPs se pueden observar en aglomerados y como puntos negros con un fuerte contraste.

Cuando se realizó la toma de imágenes del grupo sin tratamiento, en los neumocitos tipo II se observó el núcleo bien definido y la presencia de organelos como mitocondrias, vesículas, lisosomas además de filamentos de actina y microtúbulos, entre otros. Cuando las células fueron expuestas a SnO₂ NPs y a TiO₂ NPs, algunas NPs se observaron libres en el citoplasma o dentro de vesículas y

endosomas; incluso cerca del aparato de Golgi y del núcleo pero no dentro del núcleo. Algo interesante fue que en la concentración de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs se observó gran cantidad de NPs en el citoplasma, incluso regiones del citoplasma con menos electrodensidad. Con el tratamiento de LPS, no se observó alteraciones en la ultraestructura de neumocitos tipo II y fue posible identificar al núcleo y organelos como mitocondrias, vesículas, lisosomas, filamentos de actina, microtúbulos y cuerpos lamelares, estos últimos característicos de este tipo de células (Fig. 3A).

En monocitos sin exposición, nuevamente se observó el núcleo bien definido y la presencia de microtúbulos, endosomas, mitocondrias y lisosomas. Mientras que en las células tratadas, las NPs se observaron en el citoplasma, sin embargo, desde la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se observó gran cantidad de NPs dentro de las células e inmersas en vesículas, este mismo resultado se observó con la concentración de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Por otro lado, los monocitos que fueron expuestos a LPS, presentaron gran cantidad de vesículas en su interior (Fig. 3B).

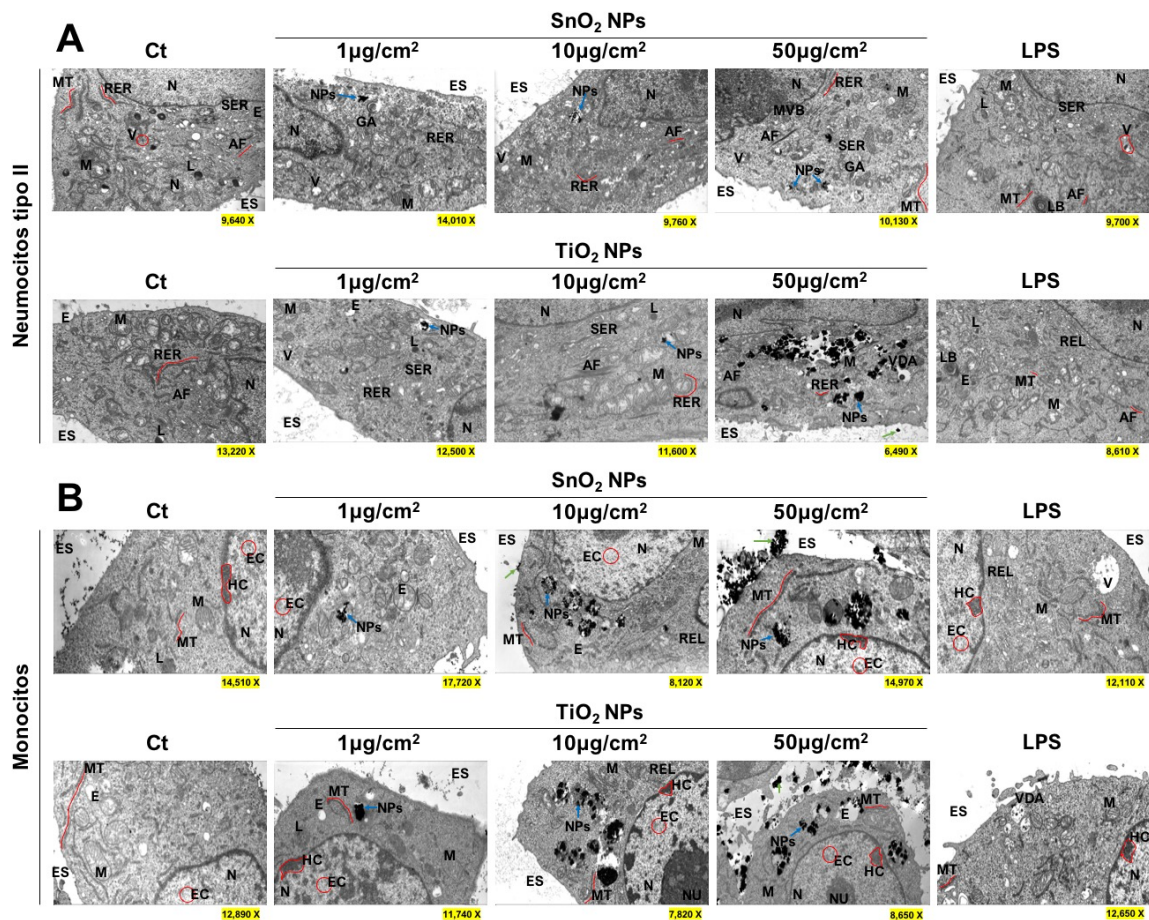


Fig. 3.- Localización de SnO₂ NPs y TiO₂ NPs en neumocitos tipo II y monocitos. Imágenes de microscopía de transmisión de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs, TiO₂ NPs y LPS por 24 h. C=citoplasma, M=mitocondria, ES=espacio extracelular, E=endosoma, LB=cuerpo lamelar, N=núcleo, AF=filamentos de actina, MT=microtúbulos, L=lisosoma, EC=citoplasma vacío, REL: retículo endoplásmico liso, RER: retículo endoplásmico rugoso, EC: eucromatina, HC: heterocromatina, VDA: vesículas derivadas de autofagia. Las flechas verdes señalan a las NPs no internalizadas, las flechas azules señalan a las NPs dentro del citoplasma. Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes.

6.5 Granularidad celular

La granularidad se midió por medio de citometría de flujo donde el eje “X” (FSC-H) representó el tamaño celular mientras que el eje “Y” (SSC-H) indicó la granularidad celular. También se delimitó la granularidad basal con una línea roja y se observó que cuando los neumocitos tipo II fueron tratados con 50 µg/cm² SnO₂ NPs, cierta población celular se desplazó hacia la parte superior indicando que parte de las células incrementaron su granularidad. Para los neumocitos tipo II expuestos a TiO₂ NPs la población se desplazó hacia la parte superior a partir de la concentración de 50 µg/cm² de NPs. En el tratamiento con LPS, la población se comportó de manera similar al grupo control (Fig. 4A)

En monocitos, la población se desplazó hacia la parte superior y fue más evidente en la concentración de 50 µg/cm² de SnO₂ NPs, pero con las TiO₂ NPs la población se desplazó desde la concentración de 1 µg/cm². En los tratamientos con LPS, a diferencia de los neumocitos tipo II, la población de monocitos se desplazó hacia la parte superior (Fig. 4B).

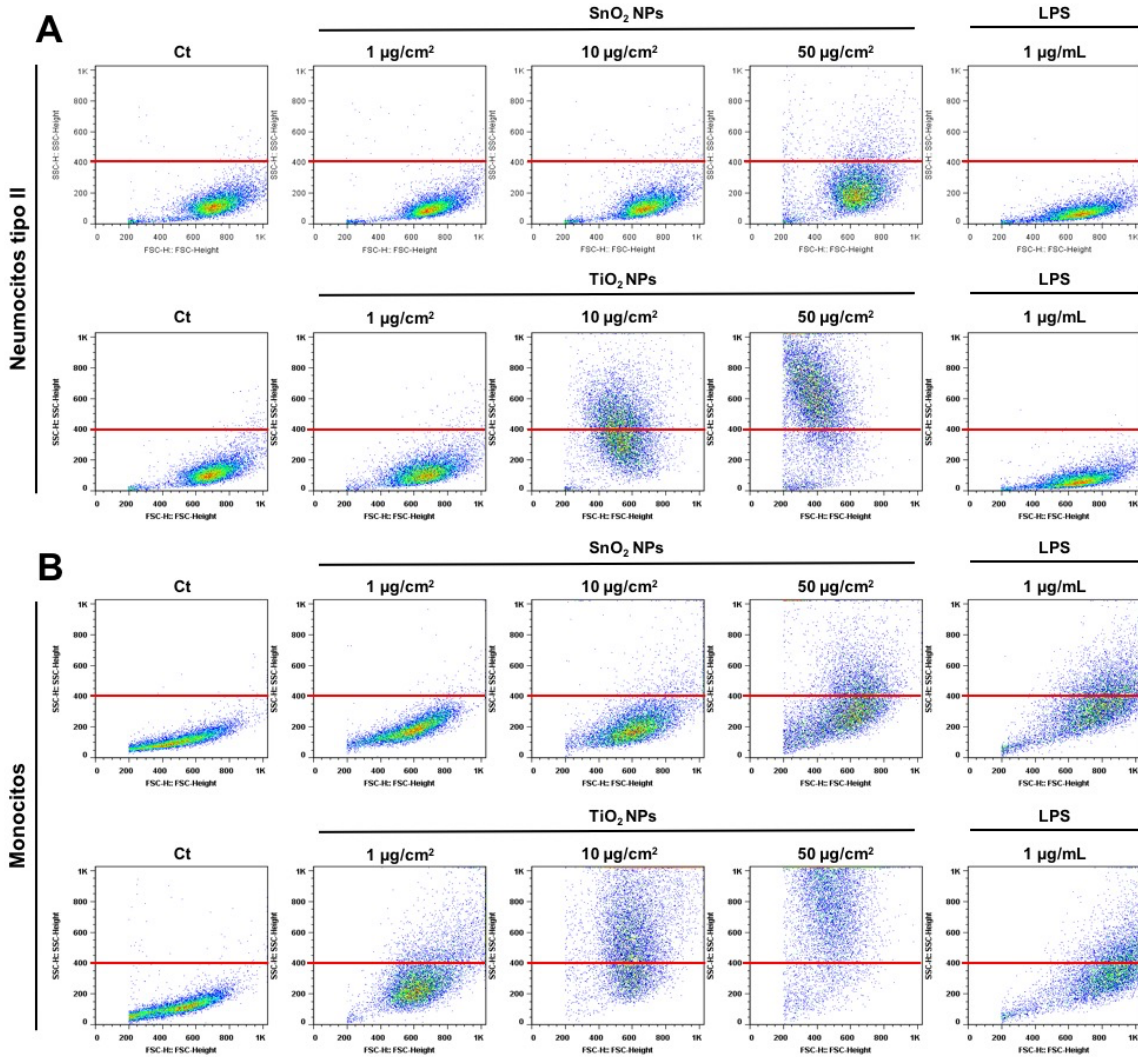


Fig. 4.- Do plots de granularidad de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. El límite de granularidad basal para neumocitos tipo II y monocitos se ubicó en 400 unidades SSC-H (eje de las Y) y se delimitó con una línea roja para su mejor ubicación. Cualquier célula superior a este límite fue considerada como una célula con mayor granularidad que las células control. En cada muestra se realizó la lectura de 10,000 eventos. Se muestran los plots más representativos de tres experimentos independientes.

Posteriormente en el citómetro de flujo se realizó la cuantificación en porcentaje de la población que presentó mayor granularidad que los grupos control. En este trabajo los neumocitos tipo II sin exposición a NPs presentaron una granularidad de 0.27 ± 0.28 la cual incrementó 7.95 ± 1.72 % por la exposición a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de SnO₂ NPs (Fig. 5C). Sin embargo, al exponer este mismo tipo de células a TiO₂ NPs la granularidad incrementó 39.47 ± 1.56 % a partir de la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 5D).

En los monocitos, la granularidad incrementó a 31.37 ± 0.98 % por la exposición a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de SnO_2 NPs (Fig. 5E) y un 67.93 ± 3.23 % por la exposición a TiO_2 NPs a partir de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 5F).

En los “do plots” de la Fig. 4B la población de monocitos tratados con LPS se desplazó hacia la parte superior, lo que causó el aumento en la granularidad de los monocitos (Fig. 5E y 5F).

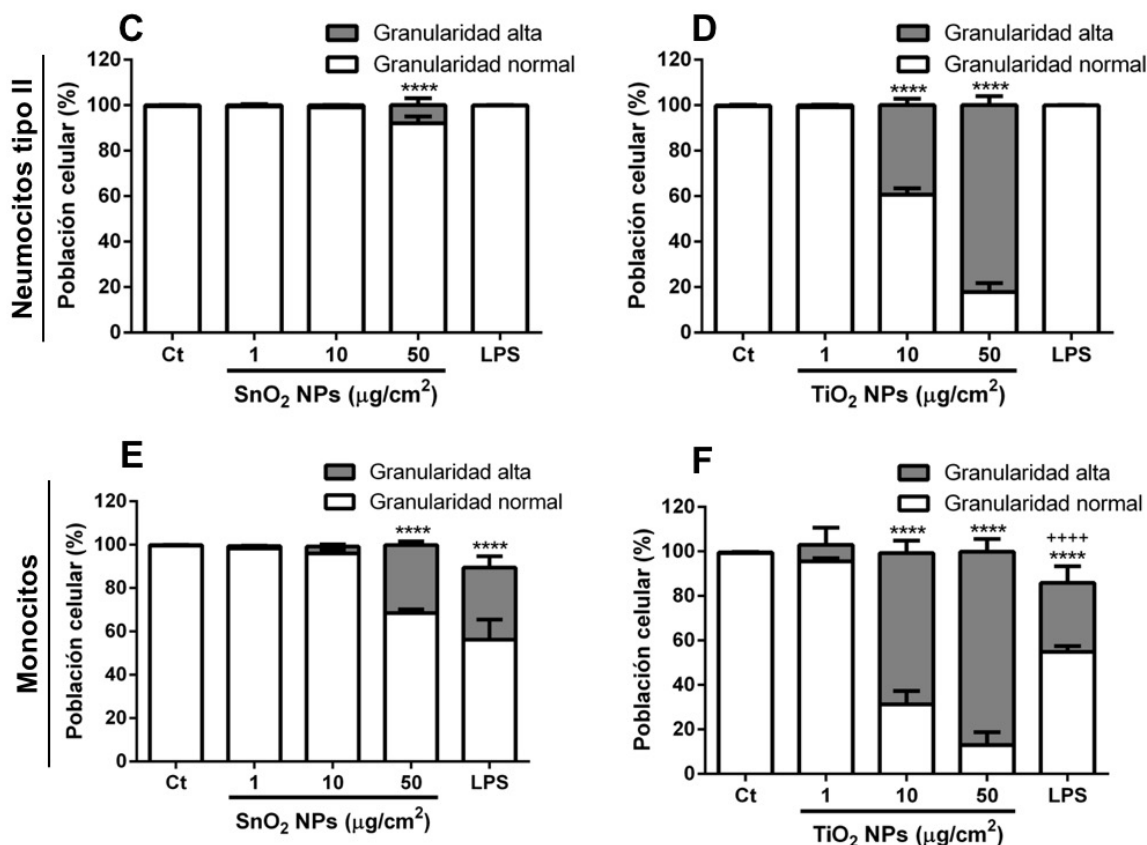


Fig. 5.- Cuantificación de la granularidad de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO_2 NPs y TiO_2 NPs. Los porcentajes obtenidos en las regiones de granularidad normal y alta granularidad de la figura 4 se tomaron para realizar la gráfica de barras de las poblaciones de neumocitos tipo II y monocitos tomando en cuenta que en cada muestra se leyeron 10,000 eventos en el aparato BD FACSCalibur. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes y en porcentaje. **** $p < 0.0001$ vs Ct, +++++ $p < 0.0001$ vs 10 y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs.

6.6 Patrón de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de neumocitos tipo II y monocitos ante la exposición a SnO_2 NPs y TiO_2 NPs

El espectro de absorbancia de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos se realizó en ambos tipos celulares, donde se observó que en neumocitos tipo II y monocitos el área que tuvo una menor absorbancia con respecto al grupo control fue el patrón de ácidos nucleicos, lo cual ocurrió con ambos tipos de NPs (Fig. 6A-6D).

Interesantemente, en monocitos expuestos a TiO_2 NPs, la región de enlaces de hidrógeno, grado en proteínas y cambios conformacionales en proteínas disminuyó con respecto al grupo control y sólo ocurrió en la concentración de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 6D).

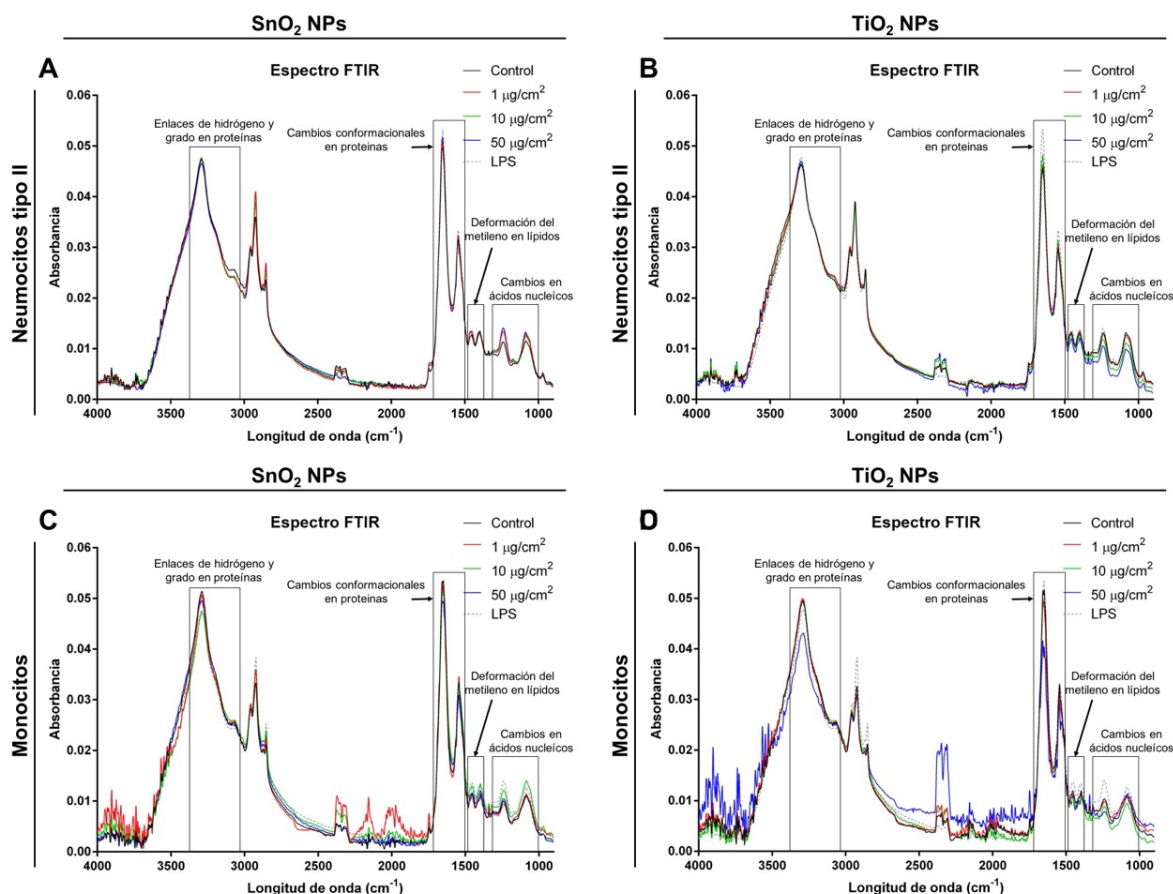


Fig. 6.- Patrón biomolecular de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de neutrocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO_2 NPs y TiO_2 NPs. Las células una vez expuestas a la NPs se realizó el patrón biomolecular de lípidos los cuales fueron analizados de 1451 a 1399 cm^{-1} , uniones de hidrógeno y grado en proteínas de 3067 a 3294 cm^{-1} , cambios conformacionales en proteínas de 1652 a 1545 cm^{-1} y cambios en ácidos nucleicos de 1300 a 1000 cm^{-1} . Los espectros son los representativos de tres experimentos independientes. Control, línea negra, $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs: línea roja, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs: línea verde, $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs: línea azul; LPS (lipopolisacárido): línea gris punteada.

6.7 Arreglo del citoesqueleto

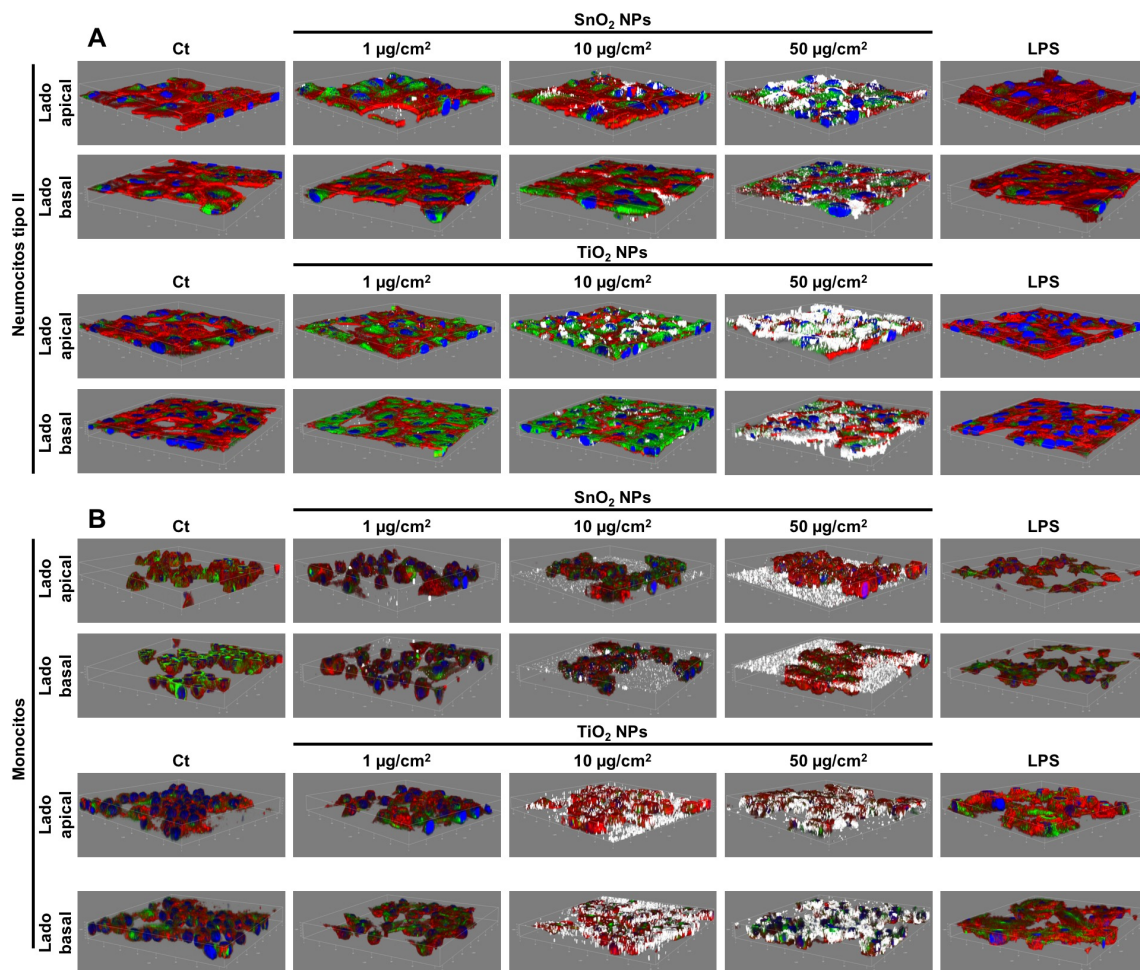
En este trabajo decidimos observar el arreglo del citoesqueleto en la parte apical y basal de ambos tipos celulares, debido a que la zona apical es el primer contacto que existe entre las NPs y célula mientras que el lado basal es donde las células están adheridas a la placa de cultivo. A diferencia de las imágenes de campo claro o de electrónica de transmisión donde las NPs se observaban como puntos negros, en la microscopía confocal las NPs se observaron como puntos blancos. En

neumocitos tipo II, ambas NPs se observaron más en la parte apical sin embargo, algunas NPs fueron observadas en la zona basal (Fig. 7A).

En monocitos, la mayoría de las SnO₂ NPs se observaron sedimentadas en la zona de la placa de cultivo, a diferencia de las TiO₂ NPs, las cuales se localizaron en la parte apical, cerca de las células y muy pocas NPs sedimentadas (Fig. 7B).

Cuando se realizó la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia, ambas NPs no causaron alteraciones en los microtúbulos de neumocitos tipo II (Fig. 7C), pero la intensidad de filamentos de actina se afectó cuando los neumocitos tipo II fueron tratados con TiO₂ NPs (Fig. 7D).

En monocitos los cambios fueron mas evidentes ya que la intensidad de fluorescencia de microtúbulos disminuyó ante la exposición a TiO₂ NPs (Fig. 7E) y en el caso de los filamentos de actina se disminuyó su intensidad de fluorescencia cuando fueron expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs (Fig. 7F).



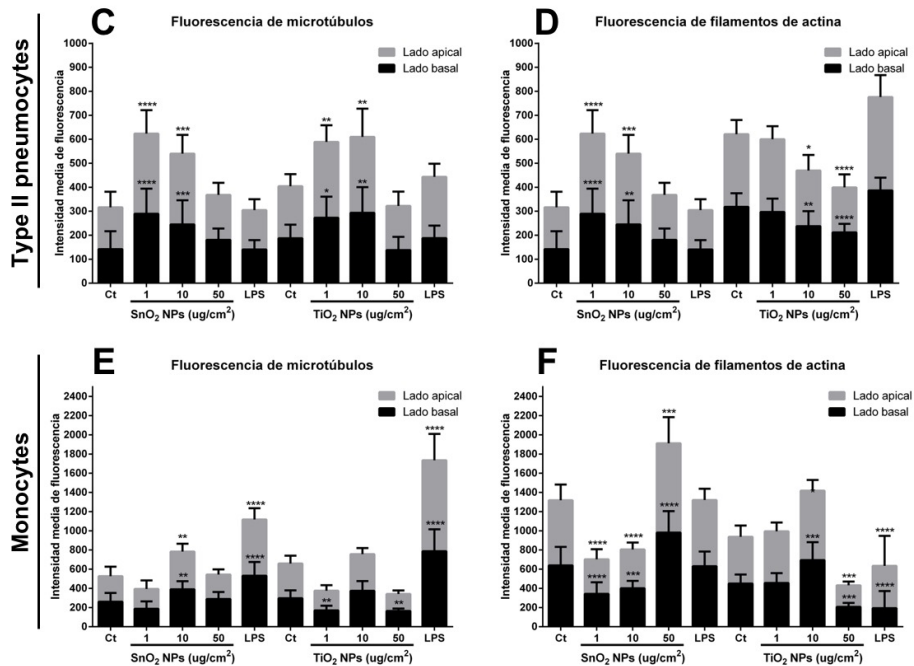


Fig. 7.- Arreglo y cuantificación del citoesqueleto de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Los neumocitos tipo II y los monocitos fueron tratados con las NPs y posteriormente el arreglo del citoesqueleto fue analizado por inmunofluorescencia (núcleo se observa en azul, filamentos de actina en rojo y microtúbulos en verde) usando microscopía confocal, se realizó la toma de imágenes desde la zona apical y basal de las células. El estímulo con LPS (1 µg/mL) por 24 h fue usado como control positivo. En el caso de la cuantificación se realizó con la intensidad media de fluorescencia obtenida en cada imagen, los resultados se muestran con su desviación estándar. En las imágenes de microscopía se muestran las imágenes más representativas de tres experimentos independientes, mientras que en la cuantificación de fluorescencia se tomó en cuenta diez valores por tratamiento. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05 vs Ct.

6.8 Localización de vacuolas

Algo muy interesante que se observó fue la generación de vacuolas en el citoplasma de los monocitos que se generaron en la concentración de 50 µg/cm² con ambos tipos de NPs; estas estructuras ocuparon gran área del citoplasma e incluso el núcleo de los monocitos se vio desplazado a la orilla de las células. Cuando se realizó el contraste de fases o mejor conocido como Nomarski, se observó que las NPs localizaban con el área ausente de fluorescencia, lo cual fue corroborado con el sobrelapamiento de imágenes (MERGE) (Fig. 8).

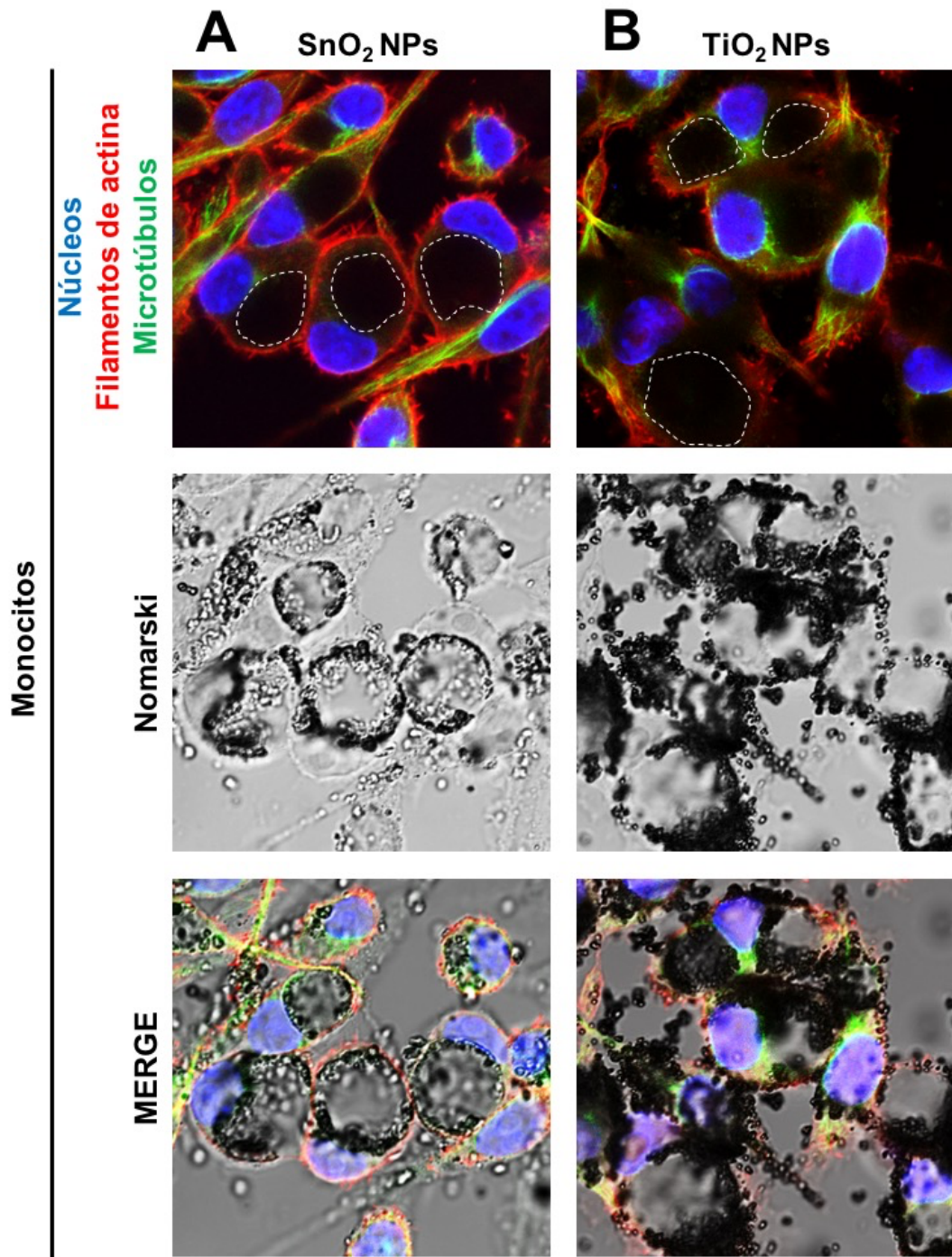


Fig. 8.- Generación de vacuolas en monocitos por la exposición a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Los monocitos fueron expuestos a 50 µg/cm² de SnO₂ NPs, TiO₂ NPs y LPS por 24 h. Posteriormente el arreglo del citoesqueleto fue analizado por inmunofluorescencia (núcleo se observa en azul, filamentos de actina en rojo y microtúbulos en verde) usando microscopía confocal. La imagen original fue tomada a 63X sin embargo, después se le hizo una acercamiento 4X, las imágenes superiores son las imágenes de fluorescencia, en las imágenes de en medio son las células con la técnica de Nomarski para poder observar a las NPs, mientras en la fila inferior se observa el sobrelapamiento de las imágenes. Las líneas punteadas indican el perímetro de las vacuolas generadas en el citoplasma celular. Se muestran las imágenes más representativas. n=3.

6.9 **Activación y citocinas liberadas por monocitos**

La exposición de monocitos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs incrementó ligeramente la sobreexpresión de CD86 en 1.41 ± 0.49 unidades y 5.51 ± 0.42 unidades respectivamente con respecto al grupo control; mientras que expresión de CD80 incrementó solo con las TiO₂ NPs en 4.0 ± 0.87 unidades (Fig. 9A). En las citocinas solo se pudo cuantificar la señal de IL-10 e IL-6 pero no existieron diferencias significativas debido a la desviación estándar de los resultados, pero al parecer existe un tendencia a aumentar la señal de estas dos moléculas cuando los monocitos son expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs (Fig. 9B).

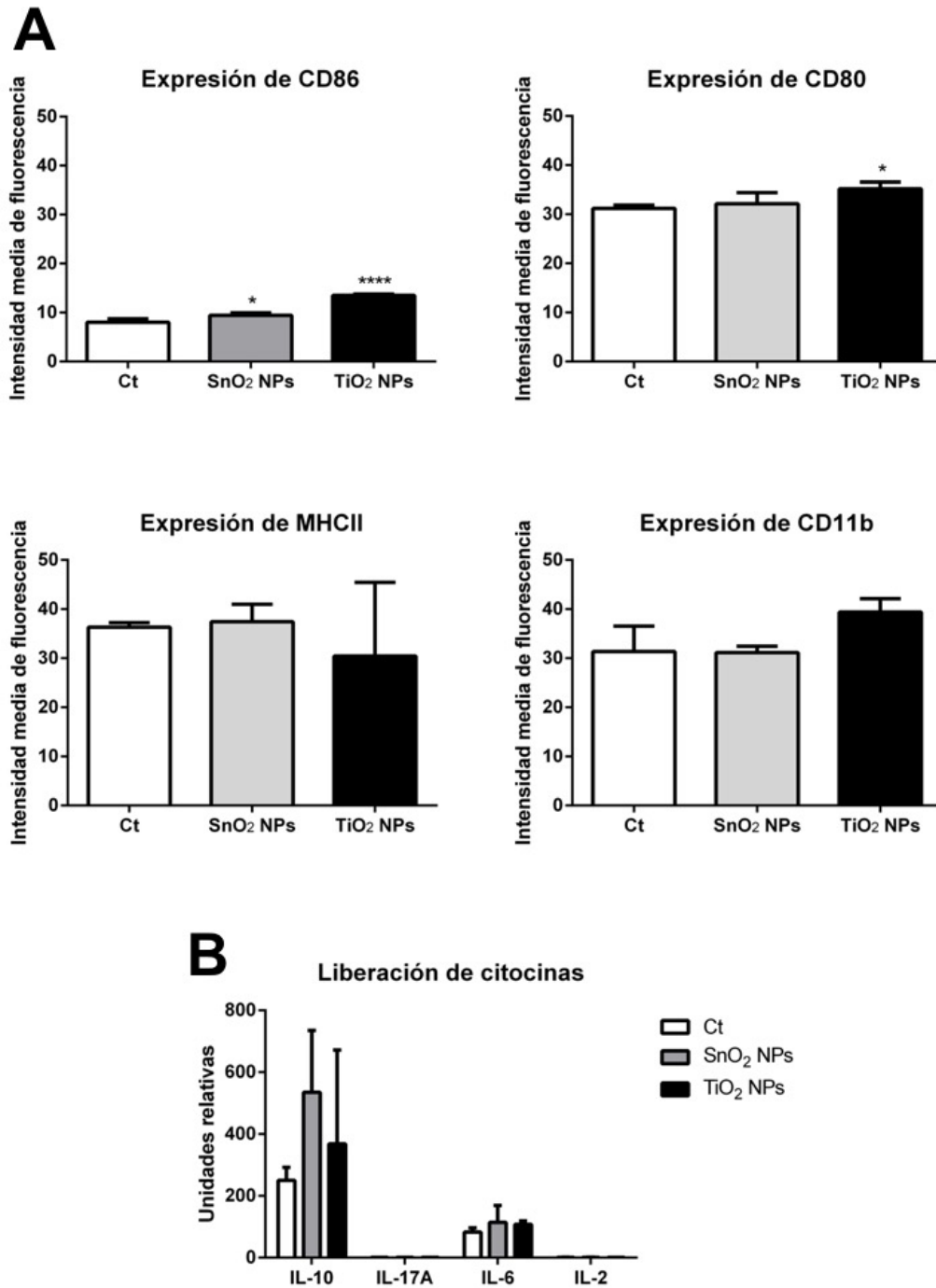


Fig. 9.- Marcadores de superficie en monocitos y liberación de citocinas por la exposición a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Los monocitos fueron expuestos a 50 µg/cm² de SnO₂ NPs o TiO₂ NPs por 24 h donde la expresión de CD86, CD80, MHCII y CD11b fue analizada por citometría de flujo. En cada lectura se realizó la lectura de 10,000 eventos en el aparato BD FACSCalibur. Se muestran los histogramas más representativos y su cuantificación. n=3. IMF= Intensidad media de fluorescencia. Por otro lado, la liberación de citocinas fue analizada en los sobrenadantes de los cultivo celulares previamente expuestos a las NPs. n=3. Los datos son expresados en unidades relativas. *p<0.05 vs grupo control.

7. Discusión

En este trabajo suplementamos los medios de cultivo con suero fetal bovino libre de vesículas debido a que el SFB contiene diferentes tipos de RNA que pueden alterar cascadas de señalización en las células de cultivo (Wei et al. 2016) por lo que nosotros eliminamos los RNA's y vesículas extracelulares a través de la ultracentrifugación a 200,000 x g (42,236 rpm) a 4°C durante 16 h (Xiao et al. 2014) y además se filtro el SFB a través de poros de 20 μm .

Una de las desventajas de cultivar células con 10% de SFB^{SV} es que se puede alterar la morfología y crecimiento de células de glioblastoma humano (U87), células embrionarias de riñón humano (293t), células HeLa, células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y células de neuroblastoma de ratón (N2a) (Eitan et al. 2015) incluso también la migración de neumocitos tipo II puede ser afectada (Shelke et al. 2014). Por lo tanto, nosotros suplementamos los medios de cultivo con el 20% de SFB^{SV} esperando a que el crecimiento de las células fuera óptimo.

Ahora bien, debido a que las NPs son sólidas, insolubles y poseen una carga neta en su superficie, es importante conocer sus propiedades, tales como su forma, tamaño, carga superficial en suspensión y el tamaño de los aglomerados que pueden formar cuando están en contacto con algún tipo de fluido, por lo tanto nosotros por medio de microscopía electrónica de barrido observamos que las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs no presentaron ni una forma ni tamaño homogéneo, es decir las NPs fueron amorfas y de amplio rango de tamaño, pero menores a 100 nm, por lo que se consideraron como NPs ya que en algunas de sus dimensiones estuvieron en el rango de entre 1 y 100 nm. Ahora bien, cuando se realizó el perfil de las NPs por FTIR, en el caso del SnO₂ se observó un pico entre el rango de 800 y 400 cm^{-1} correspondiente a la unión entre las dos moléculas de oxígeno y la molécula de estaño, por lo que descartamos que hubiera contaminación por otros metales. En el caso de TiO₂ se registraron las bandas, una en 500 cm^{-1} que corresponde a la unión entre las dos moléculas de oxígeno y la molécula de titanio y otro aproximadamente en 3300 cm^{-1} que es del grupo OH, por lo que esto refleja que el polvo presentaba humedad y por eso registraron grupos OH. Por la técnica de dispersión de luz

observamos que el tamaño primario de las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs se pierde cuando estas son suspendidas en los medios de cultivo suplementados con el 20% de SFB^{SV}; en los resultados obtenidos, las SnO₂ NPs suspendidas en medio F-12K+SFB^{SV} formaron aglomerados más grandes que en el medio DMEM+SFB^{SV} esto pudo deberse a que los componentes propios del medio F-12K y DMEM son diferentes e influyó en la interacción entre biomoléculas y SnO₂ NPs.

Por otro lado, los aglomerados de las TiO₂ NPs en ambos tipos de medio de cultivo fueron similares, esto nos quiere decir que la diferente composición de biomoléculas de ambos medios de cultivo no influyó en la diferencia de tamaño de los aglomerados de las TiO₂ NPs. Ahora bien, los aglomerados de las SnO₂ NPs en suspensión fueron menores que las de TiO₂ NPs, posiblemente por la poca interacción entre biomoléculas, además el peso molecular (150,71 g/mol) y la densidad (6,95 g/cm³) del compuesto de SnO₂ es más alto que el del TiO₂ (peso molecular 79.866 g/mol y densidad de 4.23 g/cm³) por lo que esto pudo influenciar en que las SnO₂ NPs se precipitan más rápido y no puede existir una gran interacción entre biomoléculas-SnO₂ NPs.

De acuerdo con Gangwall y colaboradores (2011) la exposición de células a 40.6 µg/cm² de NPs por 24 h, simula la exposición de trabajadores que estuvieron expuestos a las NPs durante o menos de 45 años. Nosotros no encontramos disminución de la viabilidad celular salvo la concentración de 50 µg/cm² de TiO₂ NPs donde se redujo la viabilidad de monocitos en un 5%; es importante señalar este resultado debido a que existió integridad celular, sin embargo no se descartó que aún en concentraciones no tóxicas, las células podían sufrir alteraciones. Desafortunadamente, la evidencia sobre la susceptibilidad entre neumocitos tipo II y monocitos a un tipo de NP no es clara, ya que un trabajo reporta que la viabilidad de monocitos y neumocitos tipo II expuestos a partículas derivadas de la combustión disminuye de manera similar a partir de la concentración de 50 µg/mL (Durga et al. 2014) y también cuando se exponen a esferas de SiO₂, Fe₂O₃ y TiO₂ (Panas et al. 2013). En este trabajo la viabilidad de monocitos y neumocitos tipo II no disminuyó, tal vez porque utilizamos bajas concentraciones de NPs y tiempo de exposición a 24 h, incluso con el control positivo que fue tratado con LPS tampoco afectó la

viabilidad celular, resultado que también se ha obtenido en otros trabajos (Liu & Ding, 2019; Chen et al. 2020).

Algo importante es que las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs tienen carga neta de 4⁺ por lo que algunos autores le atribuyen a que no sean tóxicas debido a esta propiedad ya que, por ejemplo, las nanopartículas de óxido de zinc (las cuales tiene una carga de 2⁺) presentan mayor toxicidad en *Escherichia coli*; esto podría indicar que cuanto mayor sea la carga catiónica, menor es la citotoxicidad (Hu et al. 2009).

También se ha comparado la toxicidad de SnO₂ NPs y TiO₂ NPs en *Escherichia coli*, donde las SnO₂ NPs disminuyen la viabilidad celular en un 40%, mientras que las TiO₂ NPs disminuyen el 100% de la población celular, esto nos da un idea de la toxicidad diferencial que existe entre las dos NPs. Además, debido a que ambas NPs no liberan iones, se observó que un posible mecanismo de toxicidad es que las NPs pueden adherir a la membrana celular y generar agujeros en sus membranas, por lo que en este caso la toxicidad está enfocada más a un daño mecánico (Ng et al. 2015). Existe un trabajo donde se evalúa la toxicidad de SnO₂ NPs obtenidas de la planta *Annona squamosa* en células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) y se reportó que estas NPs pueden disminuir la viabilidad desde un 30% al 80% y alterar la morfología celular (Roopan et al. 2015). Una de las hipótesis es que un mecanismo de toxicidad de las SnO₂ NPs es la generación de especies reactivas de oxígeno (Tammina et al. 2017), la cuales pueden inducir la liberación de lactato deshidrogenasa, la disminución del potencial de membrana mitocondrial, inducir lipoperoxidación y alterar el ciclo celular (Ahamed et al. 2018).

Por otro lado, existen diversos trabajos donde se ha encontrado que las TiO₂ NPs pueden generar especies reactivas de oxígeno en monocitos y promover la activación del inflammasoma, así como inducir la liberación de citocinas inflamatorias (Hamilton et al. 2009).

Una de las características de las NPs utilizadas en este trabajo es que son NPs sólidas, insolubles en fluidos biológicos y electrodensas, esta última característica nos permite poderlas observar a través de microscopía de campo claro. Cuando se hizo la toma de imágenes del cultivo de neumocitos tipo II y de

monocitos no tratados, no se observó la presencia de otros organismos como bacterias u hongos, por lo que la manipulación del cultivo celular se hizo de manera correcta. Así mismo, cuando las células fueron expuestas a las NPs, las NPs se observaron como puntos negros en el cultivo celular gracias a la característica antes mencionada donde las NPs no dejan pasar la luz del microscopio y por eso pueden ser fácilmente identificadas. Sólo en el caso de los monocitos expuestos a TiO₂ NPs se observaron NPs sedimentadas, pero alrededor de los monocitos se observó un área de menor densidad, es decir al parecer las NPs que se encontraban alrededor de los monocitos fueron endocitadas por este tipo de células. En el caso del control positivo de LPS, debido a que esta molécula es soluble, no pudo ser observada en el cultivo de ambos tipos de células.

En el campo de la nanotoxicología, se ha investigado sobre qué tipo de células tienen la capacidad de internalizar a diferentes NPs debido a que ha visto que entre mayor sea la tasa de internalización más efectos nocivos tienen las NPs sobre las células. Una de las vías más aceptadas de internalización es por endocitosis (Huerta-García et al. 2015; Njoroge et al. 2018) y algunas NPs como las de quitosano pueden ser internalizadas desde la primera hora de exposición, además los monocitos pueden realizar la exocitosis de las NPs previamente internalizadas y nuevamente volverlas a endocitar a partir de las 8 horas post-exposición (Jiang et al. 2017).

Ahora bien, también se ha reportado que los monocitos tienen mayor capacidad de internalización en comparación con los promielocitos/neutrófilos, y que la internalización de las NPs incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno y decremento los niveles de glutatión (Alsaleh et al. 2019), por lo que es una manera de explicar por qué los monocitos tuvieron una mayor internalización de NPs en comparación con los neumocitos tipo II.

La localización de las TiO₂ NPs y SnO₂ NPs en neumocitos tipo II y monocitos fue en citoplasma, esto se debe a que difícilmente las NPs pueden ser localizadas en núcleo a diferencia de las NPs fibrosas, aunque aún se desconoce el mecanismo o transporte de las NPs fibrosas a núcleo (Medina-Reyes et al. 2020). En nuestro trabajo, ambas nanopartículas fueron localizadas en el citoplasma, cerca de

mitocondrias, lisosomas y retículo endoplásmico rugoso, pero no dentro de alguno de estos u otros organelos, esto también se ha reportado anteriormente por Zhao et al. (2013) y Huerta-García et al. (2015). Así mismo, las NPs se encontraron muy cerca una de otras y formando aglomerados; cabe mencionar que las NPs al ser materiales sólidos no pueden ser degradados por las células y por eso se observaron a las NPs acumuladas en el citoplasma.

Una manera indirecta de cuantificar la internalización de NPs es por medio de granularidad la cual está determinada por los organelos y proteínas presentes en las células, por lo tanto, cuando las NPs son internalizadas, aumenta la granularidad normal de la células (Saitta & Zucker, 2000). Por esta razón nosotros también observamos el incremento en la granularidad de neumocitos tipo II y monocitos, aunque entre estos dos tipos de células el aumento en la granularidad fue diferente, es decir, en los monocitos la granularidad fue mayor que en los neumocitos tipo II debido a que los monocitos tienen mayor capacidad para internalizar las NPs.

Se han realizado diversos estudios para conocer las interacciones entre las NPs con proteínas y biomoléculas (Ahsan et al. 2018; Auría-Soro et al. 2019; Abdelsattar et al. 2021), sin embargo, no se conoce si la exposición a NPs puede alterar el patrón de absorbancia de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Nosotros observamos que ambas NPs modificaron el patrón de absorbancia de ácidos nucleicos y las TiO₂ NPs en monocitos causaron alteraciones en la región de proteínas, a través de posibles cambios conformacionales y alteración en los enlaces de hidrógeno; ambos resultados pueden ser explicados porque las TiO₂ NPs y SnO₂ NPs tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno y estas pueden alterar la estructura del DNA, generar oxidación en algunas de los nucleótidos y realizar alteraciones en las proteínas (McDonagh, 2017; Cai & Yan, 2013).

Otro aspecto que evaluamos fue el arreglo estructural del citoesqueleto, el cual es una red de filamentos que ayudan al soporte celular y se ha demostrado que diversas NPs lo pueden alterar o dañar (Ispanixtlahuatl-Meráz et al. 2018) y además el daño en el citoesqueleto es irreversible (Déciga-Alcaraz et al. 2020), sin embargo

para el caso de las de SnO₂ NPs aún no se conoce si estas NPs tienen efecto sobre el citoesqueleto, principalmente de microtúbulos y filamentos de actina. Nosotros observamos que las SnO₂ NPs y TiO₂ NPs se localizaron en la parte apical de las células, debido a que es la primera zona de contacto entre NPs y células, y sólo algunas NPs fueron observadas en la parte basal debido a la sedimentación de las NPs. Así mismo también se observó que sólo los filamentos de actina de neumocitos tipo II fueron afectados únicamente por las TiO₂ NPs. En el caso de monocitos, la susceptibilidad fue mayor, es decir, no solo los filamentos de actina fueron afectados por las TiO₂ NPs si no también los microtúbulos, y, además, las SnO₂ NPs no afectaron el citoesqueleto en neumocitos tipo II pero si en monocitos, donde los filamentos de actina fueron el blanco principal de este tipo de NPs. Esto nos refleja que la susceptibilidad entre ambos tipos celulares es muy diferente y al parecer los monocitos son más susceptibles en comparación con los neumocitos tipo II.

Con respecto a los marcadores de superficie sólo se encontró un ligero aumento en los marcadores de CD86 y CD80, ambas proporcionan señales coestimuladoras necesarias para la activación y supervivencia de las células T. En el caso de la liberación de moléculas, se evaluaron los niveles de IL-4, IFN- γ , TNF, IL-17A, IL-10, IL-6, IL-2, pero solo se encontraron valores detectables en el caso de IL-10 e IL-6, sin embargo debido a la desviación estándar no hubo diferencias significativas contra el grupo control, esto pudo deberse a que las moléculas evaluadas tienen una vida media muy corta por lo que si uno se tarda en procesar los monocitos esto puede afectar los resultados.

Algo interesante que ocurrió en monocitos fue la generación de grandes vacuolas con la exposición a la mayor concentración de ambas NPs, donde anteriormente se ha reportado que al menos las TiO₂ NPs inducen la sobreexpresión de genes relacionados con autofagia como MAP-LC3 y beclina-1 así como la cantidad de proteína, por lo que la generación de vacuolas indica un proceso de autofagia en monocitos (Dai et al. 2019).

8. Conclusiones

Este trabajo demuestra que la internalización de las SnO₂ NPs es limitada en neumocitos tipo II en comparación con los monocitos debido a que la internalización en monocitos fue dos veces mayor que en los neumocitos tipo II. Así mismo cabe resaltar que las alteraciones en microtúbulos y la generación de vacuolas depende del tipo celular, mientras que las alteraciones en las uniones de hidrógeno, estructura de proteínas y ácidos nucleicos y alteraciones en los filamentos de actina dependen del tipo de NP.

Ahora bien, esto se puede interpretar de la siguiente manera, dependiendo del tipo de NP que uno inhale, ya sea SnO₂ NPs o TiO₂ NPs los daños en el pulmón serán diferentes, pero algo muy importante que debemos mencionar es que ambas barreras (inmóvil y móvil) serán afectadas y por lo tanto la inhalación de NPs nos pueden hacer más susceptibles ante otras enfermedades respiratorias. Por consiguiente, se deben de seguir realizando estudios *in vitro* en otro tipo de células que conformen a estas dos barreras, por ejemplo, fibroblastos, neumocitos tipo I, macrófagos, fibroblastos, etc., con el fin de conocer los efectos de estas dos NPs en estos tipos de células.

Por último, este trabajo abre nuevos caminos para la investigación de las NPs, en especial para las de dióxido de estaño que actualmente se consideran “inertes y seguras” ya que no hay suficientes trabajos que demuestren su toxicidad en pulmón.

9. Perspectivas

Este trabajo es pionero en realizar estudios de toxicidad de las SnO₂ NPs sobre neumocitos tipo II y monocitos, tomando en cuenta concentraciones y tiempos de exposición *in vitro* que nos aproximan a los daños que podrían presentarse en los trabajadores que están expuestos a estas NPs en los ambientes ocupacionales. Sin embargo, es necesario seguir comparando a otros tipos celulares presentes en el pulmón ante estos dos tipos de NPs, además también sería recomendable realizar estudios en modelos *in vivo* donde uno pueda conocer si se afecta la función pulmonar cuando son inhaladas estas NPs, además de comparar los posibles daños causados a través de la observación y descripción de cortes histológicos, realizar pruebas de función respiratoria o conocer si se alteran las poblaciones celulares a través del lavado broncoalveolar.

Muy probablemente los efectos causados por ambas NPs serán diferentes en otros tipos celulares del pulmón, pero esto nos ayudaría a comprender que las NPs no se comportan igual, lo que abre nuevos panoramas para tener en cuenta que las SnO₂ NPs pueden causar alteraciones más discretas en comparación de las TiO₂ NPs, pero que al final de cuentas son efectos que aún no se conocen.

10. Referencias

- Abdelsattar A.S., Dawoud A., Helal M.A. 2021. Interaction of nanoparticles with biological macromolecules: a review of molecular docking studies. *Nanotoxicology*. 15(1):66–95.
- Ahamed M., Akhtar M.J., Majeed Khan M.A., Alhadlaq H.A. 2018. Oxidative stress mediated cytotoxicity of tin (IV) oxide (SnO₂) nanoparticles in human breast cancer (MCF-7) cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 172:152-160.
- Ahsan S.M., Rao C.M., Ahmad M.F. 2018. Nanoparticle-Protein Interaction: The Significance and Role of Protein Corona. *Advances in experimental medicine and biology*. 1048:175–198.
- Alsaleh N.B., Minarchick V.C., Mendoza R.P., Sharma B., Podila R., Brown J.M. 2019. Silver nanoparticle immunomodulatory potential in absence of direct cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages and MPRO 2.1 neutrophils. *J Immunotoxicol*. 16(1):63-73.
- Altorki N.K., Markowitz G.J., Gao D., Port J.L., Saxena A., Stiles B., McGraw T., Mittal V. 2019. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nature reviews. Cancer*. 19(1):9–31.
- Auría-Soro C., Nesma T., Juanes-Velasco P., Landeira-Viñuela A., Fidalgo-Gomez H., Acebes-Fernandez V., Gongora R., Almendral Parra M.J., Manzano-Roman R., Fuentes M. 2019. Interactions of Nanoparticles and Biosystems: Microenvironment of Nanoparticles and Biomolecules in Nanomedicine. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 9(10):1365.
- Bhowmik A., Chahal K., Austin G., Chakravorty I. 2009. Improving mucociliary clearance in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 103:496–502.
- Boon M., Jorissen M., Proesmans M., De Boeck K. 2013. Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease. *Eur J Pediatr*. 172:151–162.
- Boon M., De Boeck K., Jorissen M., Meyts I. 2014. Primary ciliary dyskinesia and humoral immunodeficiency—is there a missing link? *Respir Med*. 108:931–934.
- Brune K., Frank J., Schwingshackl A., Finigan J., & Sidhaye V. K. 2015. Pulmonary epithelial barrier function: some new players and mechanisms. *Lung cellular and molecular physiology*. 308(8):L731–L745.
- Cai Z., Yan L.J. 2013. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *Journal of biochemical and pharmacological research*. 1(1),15–26.
- Carel R.S. 1998. Chapter 3 - Health Aspects of Air Pollution, Editor(s): Eran Sher, Handbook of air pollution from internal combustion engines. *Academic Press*. 42-64, ISBN 9780126398557.
- Chaudhuri N., Sabroe I. 2008. Basic science of the innate immune system and the lung. *Paediatr Respir Rev*. 9:236–242.
- Chen J., Li D.L., Xie L.N., Ma Y.R., Wu P.P., Li C., Liu W.F., Zhang K., Zhou R.P., Xu X.T., Zheng X., Liu X. 2020. Synergistic anti-inflammatory effects of silibinin and thymol combination on LPS-induced RAW264.7 cells by inhibition of NF-κB and MAPK activation. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 78, 153309.

- de Astorza B., Cortés G., Crespí C., Saus C., Rojo J. M., Albertí, S. 2004. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infection and immunity*. 72(3):1767–1774.
- Dai X., Liu R., Li N., Yi J. 2019. Titanium dioxide nanoparticles induce in vitro autophagy. *Hum Exp Toxicol*. 38(1):56-64.
- Déciga-Alcaraz A., Delgado-Buenrostro N.L., Ispanixtlahuatl-Meráz O., Freyre-Fonseca V., Flores-Flores J.O., Ganem-Rondero A., Vaca-Paniagua F., Ramos-Godinez M.D.P., Morales-Barcenas R., Sánchez-Pérez Y., García-Cuéllar C.M., Chirino Y.I. 2020. Irreversible disruption of the cytoskeleton as induced by non-cytotoxic exposure to titanium dioxide nanoparticles in lung epithelial cells. *Chemico-biological interactions*. 323, 109063.
- Denner L., Howe M., Urban R.J. 2010. Chapter 320 - Signaling Pathways Regulating Growth and Differentiation of Adult Stem Cells, Editor(s): Ralph A. Bradshaw, Edward A. Dennis, Handbook of Cell Signaling (Second Edition), *Academic Press*. 2743-2751, ISBN 9780123741455.
- Durga M., Nathiya S., Rajasekar A., Devasena T. 2014. Effects of ultrafine petrol exhaust particles on cytotoxicity, oxidative stress generation, DNA damage and inflammation in human A549 lung cells and murine RAW 264.7 macrophages. *Environmental toxicology and pharmacology*. 38(2):518–530.
- Edelblum K.L., Turner J.R. 2015. Chapter 12 - Epithelial Cells: Structure, Transport, and Barrier Function, Editor(s): Jiri Mestecky, Warren Strober, Michael W. Russell, Brian L. Kelsall, Hilde Cheroutre, Bart N. Lambrecht, Mucosal Immunology (Fourth Edition), *Academic Press*. 187-210, ISBN 9780124158474.
- Eitan E., Zhang S., Witwer K.W., Mattson M.P. 2015. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *Journal of extracellular vesicles*. 4, 26373. doi:10.3402/jev.v4.26373.
- Ellison R.T., Giehl T.J. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of clinical investigation*. 88(4):1080–1091.
- 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. *Environmental health perspectives*, 119(11), 1539–1546.
- Gerard C., Rollins B.J. 2001. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2:108–115.
- Gien J., Kinsella J.P., 2017. Chapter 159 - Pathophysiology of Meconium Aspiration Syndrome, Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition), *Elsevier*. 1619-1624.e1, ISBN 9780323352147.
- Haddad M., Sharma S. 2020. Physiology, Lung. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Hamilton R.F., Wu N., Porter D., Buford M., Wolfarth M., Holian, A. 2009. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Particle and fibre toxicology*, 6,35.
- Heng B.C., Zhao X., Tan E.C., Khamis N., Assodani A., Xiong S., Ruedl C., Ng K.W., Loo J.S. 2011. Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Archives of toxicology*. 85(12):1517–1528.

- Heung L.J. 2020. Monocytes and the Host Response to Fungal Pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 10, 34.
- Hiemstra P.S., McCray P.B., Jr, Bals R. 2015. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J*. 45:1150–1162.
- Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H.M. 2009. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Sci Total Environ*. 407(8):3070-2.
- Huerta-García E., Márquez-Ramírez S.G., Ramos-Godinez M., López-Saavedra A., Herrera L.A., Parra A., Alfaro-Moreno E., Gómez E.O., López-Marure R. 2015. Internalization of titanium dioxide nanoparticles by glial cells is given at short times and is mainly mediated by actin reorganization-dependent endocytosis. *Neurotoxicology*. 51:27–37.
- Ispanixtlahuatl-Meráz O., Schins R.P.F., Chirino Y.I. 2018. Cell type specific cytoskeleton disruption induced by engineered nanoparticles, *Environ. Sci. Nano*. 5:228–245.
- Jansen H.M., Sachs A.P., van Alphen L. 1995. Predisposing conditions to bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 151:2073–2080.
- Jiang L.Q., Wang T.Y., Webster T.J., Duan H.J., Qiu J.Y., Zhao Z.M., Yin X.X., Zheng C.L. 2017. Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *Int J Nanomedicine*. 12:6383-6398.
- Li J.J., Muralikrishnan S., Ng C.T., Yung L.Y., Bay B.H. 2010. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. 235(9), 1025–1033.
- Li Y., Zhao Y., Xu X. 2021. Overexpression of Toll-like receptor 4 contributes to the internalization and elimination of Escherichia coli in sheep by enhancing caveolae-dependent endocytosis. *J Animal Sci Biotechnol*. 12:63.
- Ligtenberg A.J.M., Veerman E.C.I. 2014. Saliva: Secretion and Functions. *Monogr Oral Sci. Basel, Karger*. 24:1-13.
- Livraghi A., Randell S.H. 2007. Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance. *Toxicologic pathology*. 35(1):116–129.
- Liu A., Ding S. 2019. Anti-inflammatory Effects of Dopamine in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 Cells via Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. *Annals of clinical and laboratory science*. 49(3):353–360.
- Lowe J.S., Anderson P.G., 2015. Chapter 10 - Respiratory System, Stevens & Lowe's Human Histology (Fourth Edition) (Fourth Edition), *Mosby*. 166-185, ISBN 9780723435020.
- Malakar A., Kanel S.R., Ray C., Snow D.D., Nadagouda M.N. 2021. Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: A review. *The Science of the total environment*. 759, 143470.
- Marchiori M.D. 2014. Chapter 21 - Introduction to Chest Radiography, Editor(s): Dennis M. Marchiori. *Clinical Imaging (Third Edition)*, *Mosby*. 1153-1165, ISBN 9780323084956.
- McCray P.B., Bentley L. 1997. Human airway epithelia express a beta-defensin. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 16(3):343–349.
- McDonagh B. 2017. Detection of ROS Induced Proteomic Signatures by Mass Spectrometry. *Frontiers in Physiology*. 8. 470.

- Medina-Reyes E.I., Delgado-Buenrostro N.L., Leseman D.L., Déciga-Alcaraz A., He R., Gremmer E.R., Fokkens P., Flores-Flores J.O., Cassee F.R., Chirino Y.I. 2020. Differences in cytotoxicity of lung epithelial cells exposed to titanium dioxide nanofibers and nanoparticles: Comparison of air-liquid interface and submerged cell cultures. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 65, 104798.
- Mehl T., Nunn D., Lory, S. 1991. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infection and immunity*. 59(3):822–828.
- Morgenroth K., Ebsen M. 2008. CHAPTER 8 - Anatomy, *W.B. Saunders*. 69-85, ISBN 9780721601861.
- Narni-Mancinelli E., Soudja S.M., Crozat K., Dalod M., Gounon P., Geissmann F., Lauvau G. 2011. Inflammatory monocytes and neutrophils are licensed to kill during memory responses in vivo. *PLoS pathogens*. 7(12):e1002457.
- Ng A.M., Guo M.Y., Leung Y.H., Chan C.M., Wong S.W., Yung M.M., Ma A.P., Djurišić A.B., Leung F.C., Leung K.M., Chan W.K., Lee H.K. 2015. Metal oxide nanoparticles with low toxicity. *J Photochem Photobiol B*. 151:17-24.
- Njoroge J.M., Yourick J.J., Principato M.A. 2018. A flow cytometric analysis of macrophage- nanoparticle interactions in vitro: induction of altered Toll-like receptor expression. *Int J Nanomedicine*. 13:8365-8378.
- Owen C. 2001. Chemokine receptors in airway disease: which receptors to target? *Pulm Pharmacol Ther*. 14:193–202.
- Panas A., Marquardt C., Nalcaci O., Bockhorn H., Baumann W., Paur H.R., Mülhopt, S., Diabaté S., Weiss, C. 2013. Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology*. 7(3):259–273.
- Panina-Bordignon P., D'Ambrosio D. 2003. Chemokines and their receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 9:104–110.
- Romereim S., Cupp A. 2018. Vascular Cells, Editor(s): Michael K. Skinner, Encyclopedia of Reproduction (Second Edition), *Academic Press*. 47-52, ISBN 9780128151457.
- Roopan S.M., Kumar S.H., Madhumitha G., Suthindhiran K. 2015. Biogenic-production of SnO₂ nanoparticles and its cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). *Appl Biochem Biotechnol*. 175(3):1567-75.
- Sabroe I., Lloyd C.M., Whyte M.K., Dower S.K., Williams T.J., Pease J.E. 2002. Chemokines, innate and adaptive immunity, and respiratory disease. *Eur Respir J*. 19:350–355.
- Saitta L., Zucker JD. 2000. Perception-Based Granularity Levels in Concept Representation. In: Raś Z.W., Ohsuga S. (eds) Foundations of Intelligent Systems. ISMIS 2000. *Lecture Notes in Computer Science*. 1932.
- Saleh T.A. 2020. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*. 20:101067, ISSN 2352-1864.
- Shereck E.B, van de Ven C., Cairo M.S. 2012. Chapter 78 - Neonatal Leukocyte Physiology and Disorders, *Avery's Diseases of the Newborn (Ninth Edition)*, *W.B. Saunders*. 1108-1122, ISBN 9781437701340.

- Shelke G.V., Lässer C., Gho Y.S., Lötval J. 2014. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of extracellular vesicles*. 3.
- Srinivas U.S., Tan B., Vellayappan, B.A., Jeyasekharan, A.D. 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*. 25,101084.
- Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, Appendix 3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
- Tammina S.K., Mandal B.K., Ranjan S., Dasgupta N. 2017. Cytotoxicity study of Piper nigrum seed mediated synthesized SnO₂ nanoparticles towards colorectal (HCT116) and lung cancer (A549) cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 166:158-168.
- Thrall D.E. 2018. Chapter 34 - Canine and Feline Pleural Space, Editor(s): Donald E. Thrall, Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology (Seventh Edition). *W.B. Saunders*. 670-683, ISBN 9780323482479.
- Unión Europea. 2011. [Consultado el 3 de agosto de 2021] https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm
- Xia T., Kovochich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I., Nel A.E. 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano*. 2(10):2121–2134.
- Xiao X., Yu S., Li S., Wu J., Ma R., Cao H., Zhu Y., Feng J. 2014. Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. *PLoS One*. 9(2):e89534.
- Wei Z., Batagov A.O., Carter D.R., Krichevsky A.M. 2016. Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. *Sci Rep*. 6:31175.
- Zhao Y., Howe J.L., Yu Z., Leong D.T., Chu J.J., Loo J.S., Ng K.W. 2013. Exposure to titanium dioxide nanoparticles induces autophagy in primary human keratinocytes. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 9(3):387–392.

11. Índice de esquemas, figuras y tablas

Esquema 1.- Tipos celulares presentes en el pulmón. El pulmón está organizado en la zona proximal y distal, a lo largo de estas dos zonas los tipos celulares presentes van cambiando. En los alveolos podemos encontrar a la barrera móvil e inmóvil y también se señalan a las NPs que es la zona en donde se pueden depositar (Imagen modificada de Altorki et al. 2019).

Esquema 2.- Clasificación de NPs dependiendo de su estudio. Estas son algunos tipos de clasificación de NPs basados en su dimensión, morfología, composición y estado, sin embargo, dependiendo del autor es la clasificación que uno puede encontrar (Imagen modificada de Saleh et al. 2020).

Fig. 1.- Ambas NPs fueron amorfas y menores a 100 nm, sin embargo, las TiO₂ NPs formaron aglomerados más grandes en suspensión. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de A) SnO₂ NPs y B) TiO₂ NPs donde se observa que las NPs son amorfas y menores a 100nm. C) Absorbancia del polvo de SnO₂ y D) TiO₂ en el rango de 400 a 4,000 cm⁻¹. E) Tamaño de aglomerados y potencial zeta de SnO₂ NPs y F) TiO₂ NPs suspendidas y sonicadas a 40 Hz por 30 min en medio F-12K+20% SFB^{SV} y DMEM+20% SFB^{SV}. Se muestran las imágenes representativas. n=3. Barra de escala=100 nm.

Fig. 2.- Imágenes del cultivo de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Imágenes de campo claro de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a 0 (Ct), 1, 10 y 50 µg/cm² SnO₂ NPs y TiO₂ NPs durante 24 h. Como control positivo se utilizó LPS. Ambos tipos de NPs se observan como puntos negros dentro del cultivo celular. Se muestran las imágenes más representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala: 100 µm.

Fig. 3.- Localización de SnO₂ NPs y TiO₂ NPs en neumocitos tipo II y monocitos. Imágenes de microscopía de transmisión de neumocitos tipo II expuestos a SnO₂ NPs, TiO₂ NPs y LPS por 24 h. C=citoplasma, M=mitocondria, ES=espacio extracelular, E=endosoma, LB=cuerpo lamelar, N=núcleo, AF=filamentos de actina, MT=microtúbulos, L=lisosoma, EC=citoplasma vacío, REL: retículo endoplásmico liso, RER: retículo endoplásmico rugoso, EC: eucromatina, HC: heterocromatina, VDA: vesículas derivadas de autofagia. Las flechas verdes señalan a las NPs no internalizadas, las flechas azules señalan a las NPs dentro del citoplasma. Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Fig. 4.- Do plots de granularidad de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. El límite de granularidad basal para neumocitos tipo II y monocitos se ubicó en 400 unidades SSC-H (eje de las Y) y se delimitó con una línea roja para su mejor ubicación. Cualquier célula superior a este límite fue considerada como una célula con mayor granularidad que las células control. En cada muestra se realizó la lectura de 10,000 eventos. Se muestran los plots más representativos de tres experimentos independientes.

Fig. 5.- Cuantificación de la granularidad de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Los porcentajes obtenidos en las regiones de granularidad normal y alta granularidad de la figura 4 se tomaron para realizar la gráfica de barras de las poblaciones de neumocitos tipo II y monocitos tomando en cuenta que en cada muestra se leyeron 10,000 eventos en el aparato BD FACSCalibur. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes y en porcentaje. **** p<0.0001 vs Ct, +++p<0.0001 vs 10 y 50 µg/cm² de TiO₂ NPs.

Fig. 6.- Patrón biomolecular de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Las células una vez expuestas a las NPs se realizó el patrón biomolecular de lípidos los cuales fueron analizados de 1451 a 1399 cm⁻¹, uniones de hidrógeno y grado en proteínas de 3067 a 3294 cm⁻¹, cambios conformacionales en proteínas de 1652 a 1545 cm⁻¹ y cambios en ácidos nucleicos de 1300 a 1000 cm⁻¹. Los espectros son los representativos de tres experimentos independientes. Control, línea negra, 1 µg/cm² de NPs: línea roja, 10 µg/cm² de NPs: línea verde, 50 µg/cm² de NPs: línea azul; LPS (lipopolisacárido): línea gris punteada.

Fig. 7.- Arreglo y cuantificación del citoesqueleto de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Los neumocitos tipo II y los monocitos fueron tratados con las NPs y posteriormente el arreglo del citoesqueleto fue analizado por inmunofluorescencia (núcleo se observa en azul, filamentos de actina en rojo y microtúbulos en verde) usando microscopía confocal, se realizó la toma de imágenes desde la zona apical y basal de las células. El estímulo con LPS (1 µg/mL) por 24 h fue usado como control positivo. En el caso de la cuantificación se realizó con la intensidad media de fluorescencia obtenida en cada imagen, los resultados se muestran con su desviación estándar. En las imágenes de microscopía se muestran las imágenes más representativas de tres experimentos independientes, mientras que en la cuantificación de fluorescencia se tomó en cuenta diez valores por tratamiento. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05 vs Ct.

Fig. 8.- Generación de vacuolas en monocitos por la exposición a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Los monocitos fueron expuestos a 50 µg/cm² de SnO₂ NPs, TiO₂ NPs y LPS por 24 h. Posteriormente el arreglo del citoesqueleto fue analizado por inmunofluorescencia (núcleo se observa en azul, filamentos de actina en rojo y microtúbulos en verde) usando microscopía confocal. La imagen original fue tomada a 63X sin embargo, después se le hizo una acercamiento 4X, las imágenes superiores son las imágenes de fluorescencia, en las imágenes de en medio son las células con la técnica de Nomarsky para poder observar a las NPs, mientras en la fila inferior se observa el solapamiento de las imágenes. Las líneas punteadas indican el perímetro de las vacuolas generadas en el citoplasma celular. Se muestran las imágenes más representativas. n=3. Barra de escala=10µm.

Fig. 9.- Marcadores de superficie en monocitos y liberación de citocinas por la exposición a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. Los monocitos fueron expuestos a 50 µg/cm² de SnO₂ NPs o TiO₂ NPs por 24 h donde la expresión de CD86, CD80, MHCII y CD11b fue analizada por citometría de flujo. En cada lectura se realizó la lectura de 10,000 eventos en el aparato BD FACSCalibur. Se muestran los histogramas más representativos y su cuantificación. n=3. IMF= Intensidad media de fluorescencia. Por otro lado, la liberación de citocinas fue analizada en los sobrenadantes de los cultivo celulares previamente expuestos a las NPs. n=3. Los datos son expresados en unidades relativas. *p<0.05 vs grupo control.

Tabla 1.- Algunos tipos celulares que conforman el pulmón. Se calcula que aproximadamente en el pulmón hay mas de 40 tipos celulares diferentes que participan en la respiración pulmonar, cada una de ellas con sus funciones específicas.

Tabla 2.- Tabla comparativa de las propiedades físicas y químicas del dióxido de estaño y dióxido de titanio. Aunque el SnO₂ y TiO₂ son extraídos de diferente mineral y su composición química es diferente, tienen propiedades químicas muy similares.

Tabla 3.- Viabilidad celular de neumocitos tipo II y monocitos expuestos a SnO₂ NPs y TiO₂ NPs. La viabilidad se evaluó por el método de reducción de MTT y exclusión de azul de tripano, para el caso del primero método los datos fueron normalizados con respecto grupo control. Sólo se encontraron diferencias significativas en el caso de monocitos expuestos a 50 µg/cm² de TiO₂ NPs. Como control positivo se utilizó LPS, sin embargo este estímulo tampoco redujo la viabilidad celular. Se muestran los resultados en porcentaje junto con la desviación estándar. n=3.*p<0.05 vs Ct.

12. Artículos derivados de esta tesis



Cite this: DOI: 10.1039/c7en00704c

Cell type specific cytoskeleton disruption induced by engineered nanoparticles

Octavio Ispanixtlahuatl-Meráz,^{ab} Roel P. F. Schins^{ID}^c and Yolanda I. Chirino^{ID}^{*ac}

One of the main concerns regarding nanomaterials is the cytotoxicity caused by engineered nanoparticles (NPs) after inhalation, oral or dermal routes of exposure, intravenous application, and delivery as debris from implants. Some of their effects are attributed to cellular uptake and others to NP interactions with the cell membrane in the absence of internalization, which can activate receptors and subsequent cell signaling. NP internalization is influenced by their chemical and physical nature. After cellular uptake, increased apoptosis, reactive oxygen species generation, cytokine release, cell cycle alterations, and cytoskeleton disruptions are among the most cytotoxic effects. Because the cytoskeleton has a central role in the cell architecture, the effects of NPs on the cytoskeleton network have been described frequently only as a cell shape parameter. However, the effects of NP exposure on the main cytoskeletal components, which have been less investigated, could be more relevant in terms of cell physiology. In this review, we discuss the effects of NPs, which can be categorized into metal oxides/metalloids/metals, carbon-based NPs, and organic-based NPs, on the cytoskeleton network according to the cell type of internalization. After exposure, NPs can be located in primary tissues and later translocated to secondary sites. Collectively, NPs can be internalized by epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, immune cells, brain cells, stem cells, bone marrow cells, and adipocytes. In all cases, it appears that NPs disrupt the cytoskeleton at various levels, but less attention has been focused on the physiological consequences linked to such disruptions. Therefore, we suggest that the effects beyond shape modifications induced by NP uptake could be related to alterations in the physiology of each cell type.

Received 2nd August 2017,
Accepted 27th November 2017

DOI: 10.1039/c7en00704c

rsc.li/es-nano

Environmental significance

Inhalation, oral ingestion, skin contact and intravenous administration are the main exposure routes to engineered nanoparticles in humans which lead to internalization in different tissues. We have analyzed the cytoskeleton effects after nanoparticle exposure, and a clear cytoskeleton disruption induced by metal oxides/metals and carbon- and organic-based nanoparticles can be generalized. We have identified that cytoskeleton disruption might have a different impact depending on the cell type of uptake. For instance, cytoskeleton disturbances in endothelial cells have a different consequence from cytoskeleton alterations in stem cells. This manuscript contributes to the knowledge of how alterations that used to be linked mainly to cell shape could influence the physiology of cells exposed to nanoparticles.

1. Introduction

The cytoskeleton is a relatively novel discovery in biology compared with other cellular structures. Robert Hooke first described the cell structure in 1665. Subsequently, Wilhelm Kühne described the myosin protein in 1884. After 54 years,

Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolyt revealed cooperation between actin and myosin to contract muscle. Since then, cytoskeleton components, structural roles, and physiology have been under investigation and we now know that actin filaments, microtubules, and intermediate filaments compose the cytoskeleton network. Structure and cell shape maintenance, movement, and cell division, among other features, are some of the cytoskeleton functions. Tables 1 and 2 summarize its components and related proteins.

The cytoskeleton is responsible for intracellular trafficking of endogenous molecules produced by both metabolism and exogenous sources. Exogenous molecules, such as those derived from inhalation or oral ingestion, undergo internalization in respiratory or gastrointestinal tracts, respectively. In

^a 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, Tlalnepantla CP 54059, Estado de México, Mexico. E-mail: irasemachirino@gmail.com; Tel: +52 55 56231333 Ext. 39817

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

^c IUF-Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf, Germany

physiologically achievable under actual exposure to NPs. This aspect is one of the main challenges, because studies providing real measurements of NP deposition after inhalation or oral exposure among other routes of exposure in humans are not clear enough. Estimations of concentrations reached in tissues can be overestimated and effects observed under experimental conditions may be attributed to an overdose. However, in this review, we found evidence that subtoxic exposure induces alterations in experimental models, which could affect cell physiology. In addition, under realistic conditions, in which adults have pre-existing diseases, undiagnosed illnesses, genetic predispositions to diseases, environment-related health threats such as living in highly polluted cities, or inappropriate lifestyles, such as smoking, sedentarism, or hypercaloric diets, exposure to NPs at even low levels of exposure may have a larger effect than that estimated by nanotoxicology.

4. Future directions

It seems that most NPs can induce alterations in the cytoskeleton after internalization, which also implies that internalization is completely dependent on the cell type. While actin disruption in endothelial cells could promote vascular permeability, cytoskeleton remodeling in epithelial cells might be related to EMT. In this regard, EMT is a complex process that involves cell signaling such as activation of EGFR by TGF- β 1 and its downstream AKT and ERK pathways.⁹⁶ Nevertheless, some other cell signaling pathways and epigenetic changes should be investigated especially if NP exposure induces the earlier EMT characteristics. For instance, for cell signaling, Akt/NF- κ B downregulation⁹⁷ and p38 MAPK/Rac upregulation are involved in EMT.⁹⁸ On the level of epigenetic modifications, overexpression of MEG3 long noncoding RNA (lncRNA) that regulates the recruitment of JARID2-EZH2 and histone H3 methylation and ectopic expression of KDM6A histone demethylase play a role in EMT.^{99,100}

Cytoskeleton alterations are linked to changes in cell morphology during evident cellular stress responses; however, under sub-toxic conditions, including during exposure to NPs in which cell viability is unmodified or marginally decreased, cell signaling mediated by cytoskeletal components can also be affected leading to alteration in cell physiology without changes in cell morphology. In this regard, alterations on cytoskeletal components should be investigated as predictors not only of cell shape modifications but also of cell physiology in exposed cells to NPs.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Yolanda I. Chirino acknowledges support from the Programa de Apoyos para la Superación del Persona Académico de la UNAM (comunicado no. 105/2016) and the Programa de

Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT IN218015). Octavio Ispanixtlahuatl-Meráz is doctoral student at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 599447 from CONACyT.

References

- 1 L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes and J. Plastino, *Physiol. Rev.*, 2014, **94**, 235–263.
- 2 H. Yamaguchi and J. Condeelis, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, 2007, **1773**, 642–652.
- 3 G. J. Brouhard and L. M. Rice, *J. Cell Biol.*, 2014, **207**, 323–334.
- 4 A. Desai and T. J. Mitchison, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1997, **13**, 83–117.
- 5 H. Herrmann and U. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, **73**, 749–789.
- 6 J. Lowery, E. R. Kuczmarski, H. Herrmann and R. D. Goldman, *J. Biol. Chem.*, 2015, **290**, 17145–17153.
- 7 M. Bezanilla, A. S. Gladfelter, D. R. Kovar and W. L. Lee, *J. Cell Biol.*, 2015, **209**, 329–337.
- 8 G. Drewes, A. Ebnet and E. M. Mandelkow, *Trends Biochem. Sci.*, 1998, **23**, 307–311.
- 9 A. Akhmanova and M. O. Steinmetz, *J. Cell Sci.*, 2010, **123**, 3415–3419.
- 10 K. J. Green, M. Bohringer, T. Gocken and J. C. Jones, *Adv. Protein Chem.*, 2005, **70**, 143–202.
- 11 P.-Y. Berclaz, Z. Zsengeller, Y. Shibata, K. Otake, S. Strasbaugh, J. A. Whitsett and B. C. Trapnell, *J. Immunol.*, 2002, **169**, 6332–6342.
- 12 C. Clement, V. Tiwari, P. M. Scanlan, T. Valyi-Nagy, B. Y. J. T. Yue and D. Shukla, *J. Cell Biol.*, 2006, **174**, 1009–1021.
- 13 A. Dumas, G. Le-Bury, F. Marie-Anais, F. Herit, J. Mazzolini, T. Guilbert, P. Bourdoncle, D. G. Russell, S. Benichou, A. Zahraoui and F. Niedergang, *J. Cell Biol.*, 2015, **211**, 359–372.
- 14 Y. I. Chirino, C. M. García-Cuellar, C. García-García, E. Soto-Reyes, Á. R. Osornio-Vargas, L. A. Herrera, A. López-Saavedra, J. Miranda, R. Quintana-Belmares, I. R. Pérez and Y. Sánchez-Pérez, *Toxicol. Lett.*, 2017, **272**, 29–37.
- 15 B. M. Jockusch, D. F. Brown and H. P. Rusch, *J. Bacteriol.*, 1971, **108**, 705–714.
- 16 P. Hu, S. Wu and N. Hernandez, *Genes Dev.*, 2004, **18**, 3010–3015.
- 17 H. Oda, N. Shirai, N. Ura, K. Ohsumi and M. Iwabuchi, *Genes Cells*, 2017, **22**, 376–391.
- 18 S. Yamazaki, K. Yamamoto, P. de Lanerolle and M. Harata, *Histochem. Cell Biol.*, 2016, **145**, 389–399.
- 19 Z. Chen, X. Wang, Y. Shao, D. Shi, T. Chen, D. Cui and X. Jiang, *Mol. Cell. Biochem.*, 2011, **358**, 221–227.
- 20 A. Strzelecka-Kiliszek, S. Mebarek, M. Roszkowska, R. Buchet, D. Magne and S. Pikula, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2017, **1861**, 1009–1023.



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; Loret 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.

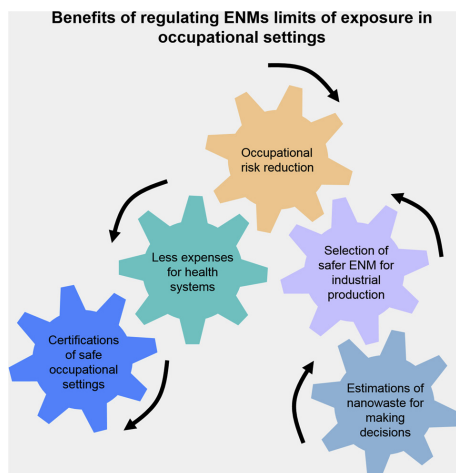


Fig. 4. Benefits of regulating exposure to ENMs. Regulations concerning to ENMs exposure in occupational settings would reduce the health risk of personnel exposed to ENMs providing at the same time, safer workplaces. In addition, it would help for selecting safer ENMs for production and for making nanowaste 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). CRI, 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>.
- Dudefoi, 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://europa.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/gesp.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-tasca/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., Hochepeid, J.F., Trouvé, 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-Balderas, L.G., Urrutia-Ortega, I.M., Medina-Reyes, E.I., 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/S1470-2045\(14\)71109-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71109-X).



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,*,**}

^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, Mexico

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

^c División 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, Mexico

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

^e 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, Mexico

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

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

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 metalloproteinase 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, Mexico.

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). Déciga-Alcaraz 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, I.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. Warheit, 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. Tharabot, 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. Timmerman, 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 modeling-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-Córdoba, 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. Rihl, N. 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. Breittling, 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. Kavlock, 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. Rödelersperger, Primary particles and their agglomerate formation as modifying risk factors of nonfibrous nanosized dust, *J. Toxicol. Environ. Health* 76 (2) (2013) 131–141.
- Z. Magdolenova, D. Bilaničová, G. Pojana, L.M. Fjellsbø, A. Hudecova, K. Hasplova, A. Marcomini, M. Dusinska, 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. Bijukumar, 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. Križaj, 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. Musarrat, Differential surface contact killing of pristine and low EPS *Pseudomonas aeruginosa* with Aloe vera capped hematite (α -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,



Differential response of immobile (pneumocytes) and mobile (monocytes) barriers against 2 types of metal oxide nanoparticles

Octavio Ispanixtlahuatl-Meráz^{a,b}, Norma L. Delgado-Buenrostro^a, Alejandro Déciga-Alcaraz^{a,b}, María del Pilar Ramos-Godínez^c, Diego Oliva-Rico^c, Edgar O. López-Villegas^d, Gustavo J. Vázquez-Zapién^e, Mónica M. Mata-Miranda^e, Damaris Ilhuicatzí-Alvarado^a, Leticia Moreno-Fierros^a, 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, Tlalnepantla de Baz, CP, 54090, Estado de México, Mexico

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

^c Unidad de Microscopía Avanzada, Instituto Nacional de Cancerología, RAI, UNAM, Mexico

^d Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, CP, 11340, Ciudad de México, Mexico

^e 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, CP, 11200, Ciudad de México, Mexico

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Type II pneumocytes
Monocytes
FTIR spectra
Cytoskeleton
Tin dioxide
Titanium dioxide

ABSTRACT

Background: Inhaled nanoparticles (NPs) challenges mobile and immobile barriers in the respiratory tract, which can be represented by type II pneumocytes (immobile) and monocytes (mobile) but what is more important for biological effects, the cell lineage, or the type of nanoparticle? Here, we addressed these questions and we demonstrated that the type of NPs exerts a higher influence on biological effects, but cell lineages also respond differently against similar type of NPs. **Design:** Type II pneumocytes and monocytes were exposed to tin dioxide (SnO₂) NPs and titanium dioxide (TiO₂) NPs (1, 10 and 50 µg/cm²) for 24 h and cell viability, ultrastructure, cell granularity, molecular spectra of lipids, proteins and nucleic acids and cytoskeleton architecture were evaluated. **Results:** SnO₂ NPs and TiO₂ NPs are metal oxides with similar physicochemical properties. However, in the absence of cytotoxicity, SnO₂ NPs uptake was low in monocytes and higher in type II pneumocytes, while TiO₂ NPs were highly internalized by both types of cells. Monocytes exposed to both types of NPs displayed higher number of alterations in the molecular patterns of proteins and nucleic acids analyzed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) than type II pneumocytes. In addition, cells exposed to TiO₂ NPs showed more displacements in FTIR spectra of biomolecules than cells exposed to SnO₂ NPs. Regarding cell architecture, microtubules were stable in type II pneumocytes exposed to both types of NPs but actin filaments displayed a higher number of alterations in type II pneumocytes and monocytes exposed to SnO₂ NPs and TiO₂ NPs. NPs exposure induced the formation of large vacuoles only in monocytes, which were not seen in type II pneumocytes. **Conclusions:** Most of the cellular effects are influenced by the NPs exposure rather than by the cell type. However, mobile, and immobile barriers in the respiratory tract displayed differential response against SnO₂ NPs and TiO₂ NPs in absence of cytotoxicity, in which monocytes were more susceptible than type II pneumocytes to NPs exposure.

* Corresponding author. 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, Tlalnepantla de Baz, CP, 54090, Estado de México, Mexico.
E-mail address: chirino@unam.mx (Y.I. Chirino).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109596>

Received 3 June 2021; Received in revised form 17 July 2021; Accepted 21 July 2021

Available online 28 July 2021

0009-2797/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

suggest, that decreases in the absorbance from 1451 to 1399 cm^{-1} and from 1300 to 1000 cm^{-1} could be related to degradation of lipids and DNA [64,65]. The decrease in the absorbance of FTIR spectra is related to apoptosis activation [66], however, since the cell viability was not affected in all treatments tested in this study, we suspect that the decrease in nuclei acids FTIR spectra might be a hint of DNA damage that was not enough for apoptosis activation. We detected that the highest concentration of both types of NPs (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for 24 h) in the type II pneumocytes and monocytes induced a decrease in all biomolecules with exception the type II pneumocytes exposed to SnO_2 NPs. Some of the displacements in the FTIR spectra could be attributed to direct contact between NPs and cellular components such as proteins. Indeed, interaction among protein and NPs are well-known as protein corona. However, alterations in nuclei acids cannot be attributed to direct contact, since NPs are not located into the nucleus suggesting that alterations are related to secondary interactions.

We suspect that both types of NPs at the highest concentration used in this study might induce alterations with further impact after 24 h and if those alterations can be repaired is still an open question.

On the other hand, no activation of monocytes was found in our study, which is opposite to the study of Heng et al. in which exposure to zinc oxide NPs induced CD80 and CD86 expression and release of pro-inflammatory cytokines in monocytes [67]. In addition, according to the previous literature, some efforts have been performed to predict the toxicity of NPs in different types of cells, and until now, there is no gold standard of physicochemical properties which can predict the biological effects of NPs exposure. In addition, the effect of mobile and immobile barriers has been addressed and differential responses have been found, for instance, zinc oxide NPs are internalized by caveolae in bronchial cells while lysosomes are the mechanisms of uptake in monocytes [68]. However, cerium oxide NPs, which are also a metal oxide, showed a protective effect against ROS formation [68]. The study of Chen et al. showed that type II pneumocytes and monocytes displayed similar toxicity after exposure to multiwalled carbon nanotubes [69]. These results suggested that similar chemical nature of NPs might have differential biological effects in the same cell lineage [68] while other cell lineages have similar responses [69]. Those studies together with the results presented here, highlight that prediction of NPs toxicity still needs deeper development. However, mobile, and immobile barriers in the respiratory tract have differential responses and it could be possible that mobile cells, which are predominantly immune cells specialized in phagocytosis, can display higher susceptibility to have an impairment in cell physiology.

Based on the literature, together with our results, we suggest that common mechanisms of NPs alterations firstly, are related to the NPs cell uptake and accumulation. Once NPs are internalized, cells lack mechanism of NPs degradation and probably, the rate of exocytosis is low. Some NPs can be retained into vesicles, however, there are some free NPs and agglomerates that interact with cytoskeleton leading to disruption of actin architecture and other biomolecules. Those interactions might be partially responsible for cellular alterations, nevertheless the displacements in DNA spectra found in this study cannot be attributed to direct interactions since NPs have not been detected into the nucleus. Then, we suspect that ROS generation could be involved indirectly in the DNA alterations as has been previously reported in MCF7 human breast cancer cells exposed to SnO_2 NPs [70] and ROS generation detected in type II pneumocytes exposed to TiO_2 NPs [71]. Finally, we would like to emphasize that in toxicology field, the decrease in cell viability is a gold standard to search for toxicity mechanisms of xenobiotics, however, here we demonstrated that alterations in exposed cells to these 2 types of NPs can be detected in absence of cytotoxicity warning about further impairment in cell physiology.

5. Conclusions

The exposure to SnO_2 NPs and TiO_2 NPs in type II pneumocytes and

monocytes had no influence on the cell viability under the tested concentrations (1–50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for 24 h). The TiO_2 NPs uptake in immobile (type II pneumocytes) and mobile (monocytes) barrier was higher compared to SnO_2 NPs and TiO_2 NPs uptake was associated with higher cell granularity levels. However, the cell granularity in monocytes was higher compared with type II pneumocytes, which was expected since monocytes are specialized in cell uptake. The FTIR spectra, which analyzed the molecular patterns of protein, lipids and nucleic acids, showed that monocytes displayed higher susceptibility than type II pneumocytes but also, cells exposed to TiO_2 NPs induced higher number of alterations than SnO_2 NPs. Microtubules were stable in type II pneumocytes exposed to both types of NPs and only TiO_2 NPs induced a decrease of actin filaments fluorescence. Monocytes exposed to SnO_2 NPs showed stable microtubules and a decrease in actin filaments fluorescence. However, TiO_2 NPs exposure in monocytes affected both, microtubules, and actin filaments. Large vacuoles were detected only in monocytes after exposure to both types of NPs, however, these vacuoles were not associated with an increase in cytokine release and only a modest increase in the expression of CD86 y CD80 surface receptors was detected.

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). We thank to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the support (CONACyT A1-S-28619 and 268769). Octavio Ispanixtlahuatl-Meráz is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 599447 from CONACyT. Déciga-Alcaraz Alejandro received fellowship (CAT2021-0183) from Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología. We thank to Unidad de Microscopía Avanzada del Instituto Nacional de Cancerología, Red de Apoyo a la Investigación, UNAM.

Abbreviations

ANOVA	one-way analysis of variance
ATR	Attenuated Total Reflection
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
F-12 K	Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium
fetal bovine serum	FBS
FSC	forward light scatter
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
LPS	lipopolysaccharide
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
mV	millivolts
nm	nanometers
NPs	nanoparticles
PBS	phosphate buffered saline
ROS	reactive oxygen species
SD	standard deviation
SnO_2 NPs	Tin dioxide nanoparticles
SSC	forward scatter
TiO_2 NPs	titanium dioxide nanoparticles