



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA

**“LAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO PROMUEVEN
LA INVASIÓN Y LA PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PULMÓN”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A

ALEJANDRO DÉCIGA ALCARAZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (166727).

Agradezco a mi *alma mater* la **Universidad Nacional Autónoma de México** por el respaldo académico y por abrirme las puertas para poder formar parte de ella.

También quiero reiterar mi gratitud a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por todo el apoyo que me brindo a lo largo de la realización de la tesis ya que sin la beca no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo de investigación.

Agradezco profundamente a mi directora de tesis la Dra. Yolanda Irasema Chirino López por aceptarme en su equipo de trabajo y por brindarme su confianza para poder realizar esta investigación, por su paciencia, dedicación y conocimientos otorgados.

Además, agradezco también a la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro por su ayuda en la realización de las diferentes técnicas celulares y por compartir su conocimiento.

DEDICATORJA

Dedico esta tesis con todo mi cariño y amor mi madre Araceli por hacer todo para que yo pudiera concluir esta etapa en mi vida, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba. Gracias por darme el mayor ejemplo de la vida de seguir siempre adelante y nunca retroceder. Te agradezco demasiado por estar siempre a mi lado, por confiar y creer en que lo lograría y por todo tu apoyo incondicional ya que sin ti no hubiera podido lograr esto. Te amo mamá, eres el motor de mi vida.

A mis hermanas Tania y Laura, por estar siempre conmigo y por darme los mejores consejos. Aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla, hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos. Gracias por no solo ayudarme a concluir el desarrollo de esta tesis, sino por todos los hermosos momentos que pasamos en el proceso. Las quiero mucho, gracias por estar siempre a mi lado.

A mis sobrinos Abi, Santi y Sebastián por llegar a llenar de luz mi vida y hacer que mis días sean menos difíciles con sus besos y abrazos. Los amo mucho enanos.

A mis mejores amigos Belem y Edgar por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles de mi vida. Por brindarme su amistad y por compartir momentos tan increíbles conmigo. Los quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio Ingrid, Memo e Isma por hacer los días en el laboratorio tan divertidos y por aprender de ustedes muchas cosas.

A la Dra. Yolanda Irasema que influyó demasiado en mi vida con sus lecciones y experiencias y por hacerme una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida. Gracias por todo su apoyo porque cuando parecía que todo se terminaba siempre estuvo usted para iluminar y guiarme de nuevo en mi camino. La quiero mucho Dra. Yolanda. *“Cuando el oído es capaz de oír, entonces vienen los labios que han de llenarlos con sabiduría”*

A la Dra. Norma Laura por estar siempre al pendiente de mí y por hacer del laboratorio un lugar divertido y agradable. Gracias por todo su cariño y por tenernos tan consentidos. La quiero mucho Dra. Normita.

A todos ustedes les dedico todas y cada una de las páginas de esta tesis.

El verdadero viaje de descubrimiento no consiste en buscar nuevos paisajes sino tener nuevos ojos.

Marcel Proust

Abreviaturas

CAM: chorioallantoic membrane	TGF- β : transforming growth factor beta
CK8: citoqueratina 8	TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases
CO ₂ : dióxido de titanio	TiO ₂ : dióxido de titanio
EGF: epidermal growth factor	TNF- α : tumor necrosis factor alpha
EMT: epithelial-mesenchymal transition	UV: radiation ultravioleta
EPA: Environmental Protection Agency	VEGF: vascular endothelial growth factor
F12K: medio de cultivo	
FeTiO ₃ : ilmenita	
H&E: hemotoxilina y eosina	
H ₂ O ₂ : peróxido de hidrogeno	
IHC: immunohistochemistry	
IL-8: interleukin 8	
ISO: International Organization for Standardization	
MMP: Matrix metalloproteinases	
NB: nanobelts	
NiO: óxido de níquel	
NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health	
NPs: nanopartículas	
NS: nanoesferas	
NSCLC: Non-Small Cell Lung Carcinoma	
O ₂ ⁻ : anión superóxido	
PBS: phosphate buffered saline	
ROS. Reactive Oxygen Species	
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	
SCLC: Small Cell Lung Cancer	
SEM: scanning electron microscope	
SFB: suero fetal bovino	

Índice de figuras

Figura 1. Formas cristalinas de TiO₂

Figura 2. Formas de exposición a los diferentes tipos de NPs

Figura 3. Acumulación de las TiO₂ NPs en el sistema respiratorio

Figura 4. Potencial zeta de las TiO₂ NPs

Figura 5. Proceso metastásico de células cancerosas

Figura 6. Selección de imágenes

Figura 7. Selección del área

Figura 8. Duplicación

Figura 9. Binarizar la imagen

Figura 10. Ajuste de escala

Figura 11. Análisis del área

Figura 12. Modelo de la membrana corioalantoide (CAM)

Figura 13. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Figura 14. Tinción H&E de células A549 expuestas 7 días a TiO₂ NPs

Figura 15. Ensayo de migración

Figura 16. Porcentaje de migración de células A549

Figura 17. Capacidad invasiva de células A549 en la CAM teñidas con H&E

Figura 18. Inmunolocalización de células A549 usando CK8 como marcador de células humanas

Figura 19. Cuantificación de CK8

Figura 20. Proliferación de las células A549 dentro de la CAM utilizando Gli1

Figura 21. Proliferación de las células A549 dentro de la CAM utilizando Ki-67

Figura 22. Cuantificación de Gli1

Figura 23. Cuantificación de Ki-67

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Propiedades químicas y físicas del TiO ₂	2
1.2 Usos del TiO ₂	3
1.3 Formas de exposición a las TiO ₂ NPs	4
1.4 Toxicidad de las TiO ₂ NPs	7
1.5 Proceso invasivo de células cancerosas	10
2. ANTECEDENTES	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVO GENERAL	15
5.1 Objetivos particulares	16
6. MATERIALES Y MÉTODO	17
6.1 Caracterización de TiO ₂ NPs	17
6.2 Cultivo celular	18
6.3 Exposición de células A549 a TiO ₂ NPs	18
6.4 Tinción hematoxilina y eosina (H&E) de células A549	19
6.5 Ensayo de migración	19
6.6 Tinción con sulforodamida B	20
6.7 Cuantificación de migración	20
6.8 Ensayo de la membrana corioalantoide (CAM)	25
6.9 Inmunohistoquímica (IHC)	26
7. RESULTADOS	27
7.1 Análisis de las TiO ₂ NPs	27
7.2 Análisis morfológico de células A549 expuestas a TiO ₂ NPs	28
7.3 Migración de células A549	29
7.4 Cuantificación del proceso de migración de células A549	31
7.5 Análisis de la capacidad invasiva de células A549 dentro de la CAM	32
7.6 Inmunolocalización de las células A549 dentro de la CAM	33
7.7 Cuantificación de la inmunolocalización anti CK8 de las células A549	34
7.8 Capacidad proliferativa de las células A549 dentro de la CAM	35
7.9 Cuantificación del marcador de proliferación Gli1	37
7.10 Cuantificación del marcador de proliferación Ki67	38

8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	47
10. LITERATURA CITADA	48

RESUMEN

La nanotecnología ha ido en incremento en la última década siendo las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂ NPs) las más producidas en el mundo. Las TiO₂ NPs son utilizadas en pinturas, bloqueadores solares, pastas de dientes, tintas, cosméticos y como aditivos en alimentos. Además, las TiO₂ NPs han sido clasificadas por la IARC en el grupo 2B como posiblemente carcinogénico para humanos, sin embargo, otras características asociadas al proceso carcinogénico, como la habilidad de invasión de células, ha sido poco investigada.

La hipótesis de este trabajo es que las células tumorales de humano adquieren un fenotipo de mayor invasión y proliferación cuando son expuestas a TiO₂ NPs. Para probar esto, se utilizaron células de adenocarcinoma de pulmón de la línea A549 las cuales fueron expuestas a TiO₂ NPs de diferentes formas geométricas tales como nanoesferas (NS) y nanocintas (usadas en este texto como NB por su nombre en inglés, nanobelts). Se utilizaron concentraciones de 1, 5 y 10 µg/cm² para las forma de NS y de 10 µg/cm² para la forma de NB. Las células A549 se mezclaron en colágeno de tipo I y se depositaron sobre la membrana corioalantoide (CAM) incubándolas durante 5 días. Inmediatamente, se extrajo la CAM donde fueron depositadas las células A549 y se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) e inmunohistoquímicas (IHC) anti CK8, Gli1 y Ki-67.

Se observó que las NS y los NB formaron aglomerados con un tamaño de 588 y 454 nm respectivamente en medio de cultivo F12K+10% de suero fetal bovino (SFB). La tinción H&E y la IHC demostraron que las células A549 expuestas a concentraciones de 5 y 10 µg/cm² de TiO₂ NS y 10 µg/cm² de TiO₂ NB tienen una mayor capacidad de invasión y proliferación dentro de la CAM. En conclusión las células A549 expuestas a TiO₂ NPs en forma de NS y NB, fueron más invasivas y tuvieron una alta capacidad de proliferar dentro de la CAM. Esto sugiere que las células expuestas a NS y NB adquieren un fenotipo de invasividad y una mayor capacidad para proliferar dentro de la CAM.

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas (NPs), dióxido de titanio (TiO₂), nanotoxicología, invasión, proliferación, células A549, ensayo de la membrana corioalantoide (CAM).

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha ido en incremento en la última década, la cual ya está evolucionando para convertirse en una tecnología de uso general para el año 2020 (Roco, 2011) elaborando diversos nanomateriales. Estos han sido clasificados por la Organización Internacional de Normalización (ISO) como materiales con cualquier dimensión superficial, externa o interna que se encuentren dentro de la nanoescala (1-100 nm) (Ponce, 2013). Además, los nanomateriales tienen diferentes y mejores propiedades, debido a estas mejoras en sus características es la razón por la que mantienen la promesa de un incremento en la economía (NIOSH, 2013). El nanomaterial mas producido alrededor del mundo es el TiO_2 , con una producción de más de 10 000 toneladas por año (Piccinno *et al.*, 2012). El TiO_2 es utilizado en diferentes fracciones de tamaño incluyendo partículas finas y ultrafinas, partículas con un tamaño <100 nm son definidas como nanopartículas (NPs) (NIOSH, 2011). Las TiO_2 NPs es un nanomaterial que se utiliza en diferentes productos de consumo humano como pinturas, bloqueadores solares, aditivo para alimentos, cosméticos, tintas, papel, plásticos entre otros. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a las TiO_2 NPs como un agente posiblemente cancerígeno para los humanos, en el grupo 2B (IARC, 2010). La categoría 2B es utilizada para los agentes en los cuales existe evidencia limitada de carcinogénesis en humanos y evidencia suficiente de carcinogénesis en animales de experimentación. Debido a la evidencia limitada acerca de la carcinogénesis que pueden producir las TiO_2 NPs es de gran interés el estudio de las diferentes respuestas biológicas que se puedan tener al estar expuesto de manera ocupacional a este tipo de nanomaterial.

1.1 Propiedades químicas y físicas del TiO_2

El componente básico del TiO_2 es el elemento titanio (Ti), uno de los diez metales más comunes en la corteza terrestre. La concentración media de Ti en la corteza terrestre es de 4400 mg/kg (Shi *et al.*, 2013). El Ti no existe en estado metálico de manera natural, debido a su gran afinidad por el oxígeno y otros elementos. En la naturaleza el TiO_2 existe en tres estructuras cristalinas diferentes: rutilo, anatasa y brookita, siendo las más comunes anatasa y rutilo (Fig. 1). El TiO_2 es un polvo blanco inflamable, inodoro y

crystalino además es insoluble en agua, ácido clorhídrico, ácido nítrico o alcohol, y es soluble en ácido sulfúrico concentrado caliente o fluoruro de hidrógeno (NIOSH, 2011).

De manera industrial el TiO_2 puede ser producido a partir de un mineral de Ti que es la ilmenita (FeTiO_3). Existen diferentes procesos para producir el TiO_2 , como el proceso de sulfato y el proceso de cloruro. Dependiendo del tipo de proceso las NPs obtenidas presentaran diferentes características fisicoquímicas como tamaño, la forma, las características superficiales, la estabilidad, características internas entre otras.

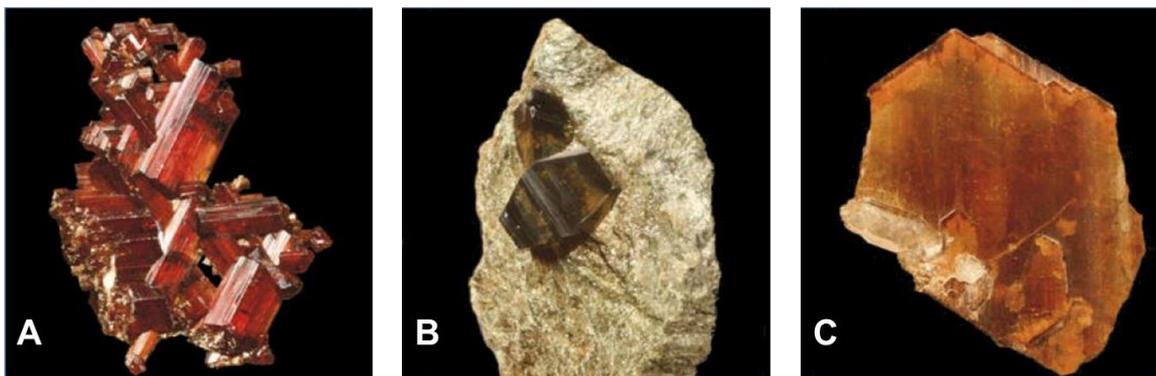


Fig. 1. Formas cristalinas de TiO_2 . Tres diferentes formas cristalinas del TiO_2 encontradas de manera natural en la corteza terrestre. A) rutilo, B) anatasa y C) brookita (Simkó *et al.*, 2010).

1.2 Usos del TiO_2

El pequeño tamaño de los nanomateriales les da propiedades fisicoquímicas específicas, en comparación con los mismos materiales en la macroescala. Es por esto que se ha generado un gran interés por su potencial de desarrollo para diferentes usos y productos. Muchos términos se han utilizado para describir las tecnologías y los materiales empleados en la nanoescala tales como “nanociencia”, “nanotecnología”, “nanomateriales” y las “nanopartículas”.

Debido a que los nanomateriales utilizados se emplean en una extensa gama de sectores, el número de posibles rutas en que los nanomateriales pueden llegar y entrar en los organismos o acumularse en el ambiente es cada vez mayor. El TiO_2 producido en tamaños <100 nm son denominadas NPs. Las TiO_2 NPs son producidas con diferentes formas como esferas, fibras, tubos, anillos entre otras varias formas (Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014). Existe una gran variedad de aplicaciones de las TiO_2 NPs que han sido identificadas en diferentes productos de uso común.

Una de las principales características por las cuales son utilizadas las TiO₂ NPs, es por su actividad fotocatalítica en productos para la filtración de luz UV (EPA, 2010). Se ha estudiado que las TiO₂ NPs pueden dispersar la luz visible o la luz UV dependiendo de su tamaño. Las TiO₂ NPs con un tamaño promedio de 230 nm pueden dispersar la luz visible, mientras que con un tamaño promedio de 60 nm dispersan la luz UV (Skocaj *et al.*, 2011).

Debido a esta característica que tienen las TiO₂ NPs son utilizadas para la filtración de los rayos UV, como recientemente lo ha investigado la industria textil fabricando telas de algodón recubiertas con TiO₂ NPs para mejorar la resistencia a los rayos UV (Paul *et al.*, 2010; Sasipriya *et al.*, 2014). Además, las TiO₂ NPs son utilizadas en la odontología como bactericidas debido a que inhiben el crecimiento de bacterias como *Streptococcus mutants* y *Porphyromonas gingivalis* (Liu *et al.*, 2014). También esta actividad bactericida por la fotocatalisis de las TiO₂ NPs es utilizada como una estrategia de desinfección ya que se ha investigado el efecto que las TiO₂ NPs tienen sobre *E. coli* (Carré *et al.*, 2014).

Las TiO₂ NPs también son utilizadas en diferentes productos de uso común debido a su capacidad para conferir blancura y opacidad (NIOSH, 2011). Debido a esto las formas a las cuales se puede estar expuesto a las TiO₂ NPs es múltiple.

1.3 Formas de exposición a las TiO₂ NPs

Debido a la gran cantidad de productos en los cuales son utilizadas las TiO₂ NPs, la forma a la cual podemos estar expuestos es diversa. Las formas de exposición a cualquier tipo de NPs pueden ser de manera directa e indirecta. Las principales personas expuestas de manera directa a las NPs son los trabajadores. La exposición de manera ocupacional a las NPs se puede producir en el laboratorio donde se sintetizan y son manipuladas las NPs, además de los lugares en donde se fabrican o se procesan los nanomateriales o los nanoproducidos (Ponce, 2013).

La NIOSH ha recomendado límites de exposición de 2.4 mg/m³ para partículas finas o respirables (partículas entre 0.1 y 3 µm aproximadamente) de TiO₂, en un promedio de tiempo de hasta 10 horas por día durante una semana laboral de 40 horas. Se ha determinado que las partículas ultrafinas también definidas como NPs (<100 nm) de TiO₂ son un carcinógeno ocupacional potencial, pero no hay datos suficientes para clasificar a las TiO₂ NPs como un carcinógeno ocupacional (NIOSH, 2011).

Los nanomateriales pueden encontrarse en el ecosistema por la difusión de los mismos, siendo descargados directamente en ríos o en la atmosfera por la industria o ser difundidos de forma indirecta por productos que son utilizados o desechados en el ecosistema (RCEP, 2008).

Las pinturas, producto en donde se utilizan las TiO₂ NPs son las responsables de causar una acumulación en los ecosistemas. Estudios han revelado que las TiO₂ NPs son distribuidas homogéneamente en las pinturas al momento de ser aplicadas estando débilmente unidas a la superficie. Esto hace que las TiO₂ NPs sean susceptibles a la lixiviación durante los eventos de lluvia contaminando principalmente ambientes acuáticos (Kaegi *et al.*, 2008).

Otra forma de acumulación en el ecosistema y exposición de manera indirecta a las TiO₂ NPs, es por medio de la industria textil. Recientemente este sector ha utilizado las TiO₂ NPs, las cuales recubren las fibras sintéticas por sus propiedades de absorber la luz UV y como pigmento. Sin embargo, las TiO₂ NPs pueden ser liberadas al ambiente al momento de realizar un ciclo de lavado a los textiles que contienen dichas nanopartículas (Windler *et al.*, 2012). Estos son claros ejemplos de las diferentes maneras de exposición a las TiO₂ NPs ya sea de forma directa o indirecta según sea el caso (Fig. 2).

Las NPs pueden entrar al cuerpo de forma inhalatoria, dérmica o vía oral. La principal ruta de exposición a las NPs de manera ocupacional es por la vía inhalatoria depositándose en los compartimentos nasofaríngeos, regiones traqueobronquiales y regiones alveolares (Ponce, 2013).

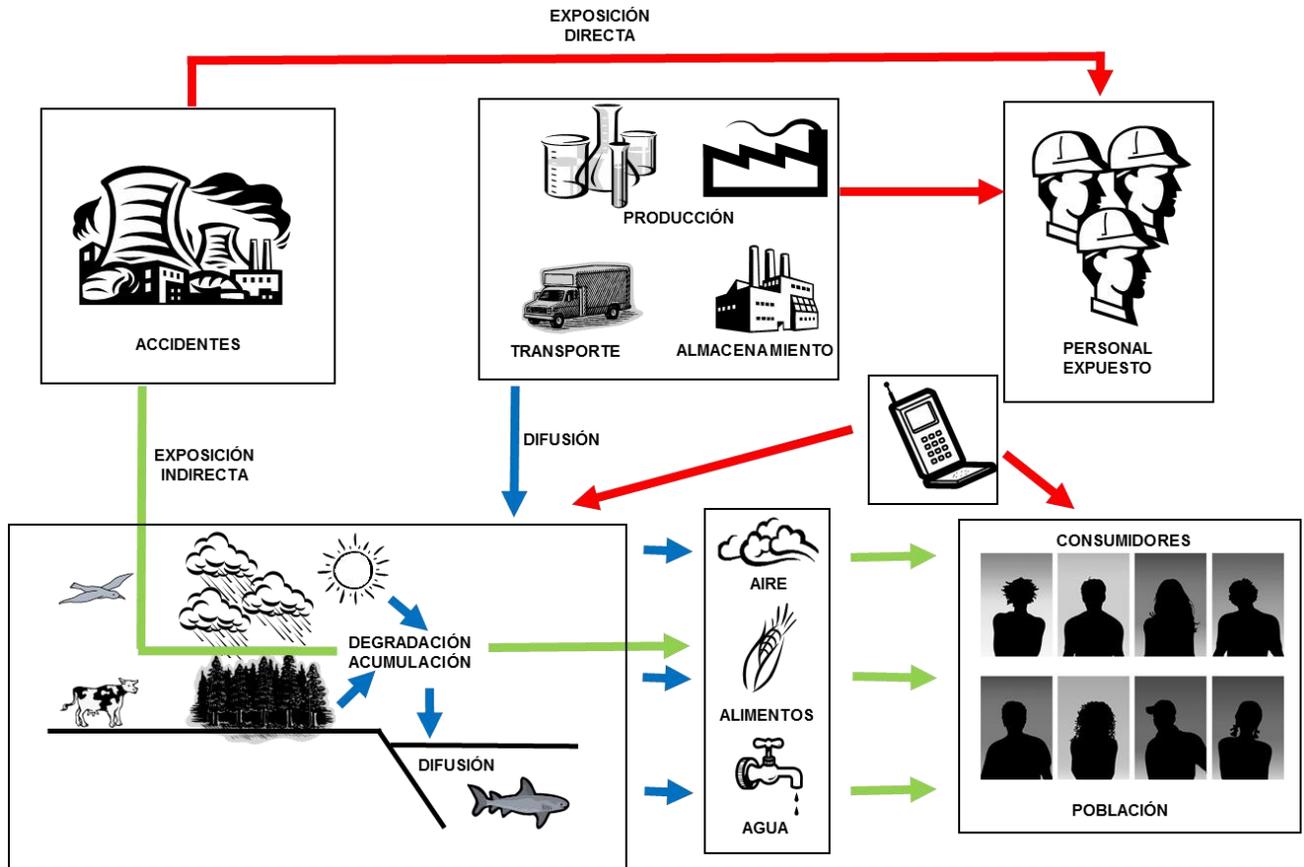


Fig. 2. Formas de exposición a los diferentes tipos de NPs. Principalmente los trabajadores son los que se encuentran expuestos de manera directa y constante a las NPs. La población en general es a la que están destinados los diversos nanoproductos teniendo así una exposición de forma directa por medio de los mismos o indirecta por la acumulación de estos en el ambiente.

En la vía inhalatoria las NPs pueden alcanzar diferentes regiones. Estudios realizados en modelos animales demuestran que la distribución de las TiO_2 NPs en el tracto respiratorio depende de su tamaño. La principal región de acumulación de TiO_2 NPs es la región nasofaríngea, acumulando un 90% de NPs con un tamaño de 1 nm seguida de la región traqueobronquial con un 10% de las TiO_2 NPs con un tamaño de 1 nm. Finalmente, en la región alveolar se han registrado TiO_2 NPs de 20 nm con un 50% (Fig. 3) (Simkó *et al.*, 2010).

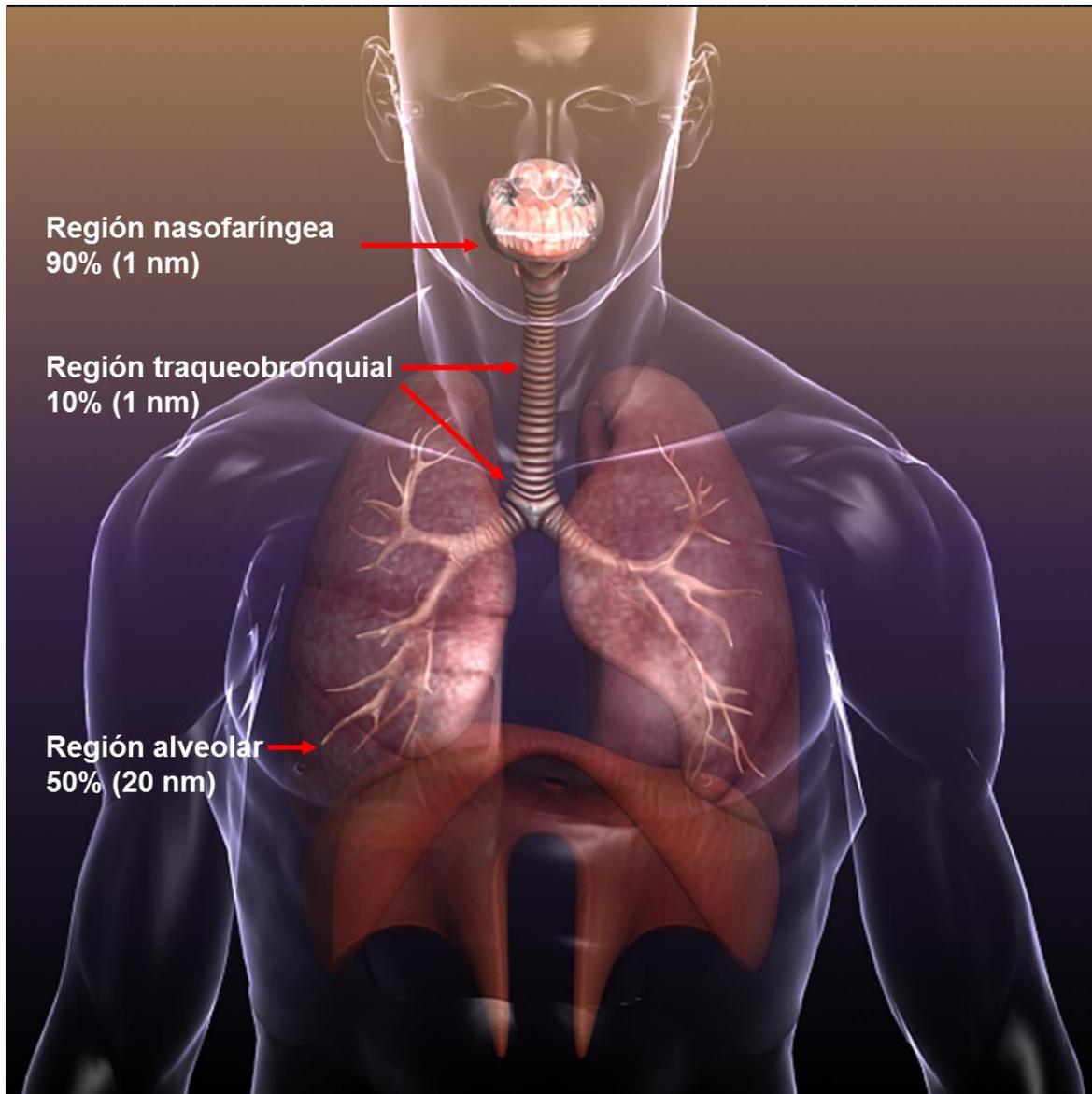


Fig. 3. Acumulación de las TiO₂ NPs en el sistema respiratorio. Las TiO₂ NPs pueden depositarse en diferentes regiones del sistema respiratorio dependiendo de su tamaño.

1.4 Toxicidad de las TiO₂ NPs

El estudio de los efectos tóxicos de las NPs se ha denominado nanotoxicología, la cual tiene como objetivo establecer la relación entre las propiedades fisicoquímicas de las NPs (ej. tamaño, propiedades superficiales y la fase cristalina) y su potencial toxicológico.

En estudios toxicológicos las características más importantes de las NPs son su tamaño, área superficial, superficie química y carga, cristalinidad, solubilidad, el estado de

aglomeración y la forma (Skocaj *et al.*, 2011). Esta última característica de las NPs es muy importante, ya que hoy en día se fabrican NPs con diferentes formas lo que les confiere nuevas propiedades. En la actualidad la producción de las diferentes formas de las NPs ha ido en aumento, conociéndose diferentes NPs en forma de esferas, fibras, cintas, tubos entre otras. Las NPs en forma de cintas han generado gran interés por sus diferentes usos como las cintas de trisulfuro de circonio que son excelentes semiconductores y candidatos a ser utilizados en dispositivos optoelectrónicos (Tao *et al.*, 2014). También las cintas de sulfuro de cadmio son utilizadas para mejorar la luz emitida por los LED's (Wang *et al.*, 2014). Debido a esto las NPs en forma de cintas se siguen produciendo sin conocer los efectos que se puedan tener sobre la salud humana.

Otra característica muy particular de las NPs es la de formar agregados unidos por enlaces químicos fuertes, o aglomerados por uniones débiles generadas por fuerzas de van der Waals. Los agregados o aglomerados pueden o no, ser disgregados dependiendo de su potencial zeta. El potencial zeta es un parámetro fisicoquímico importante en la descripción de la adsorción de iones y las interacciones electrostáticas entre la carga de las partículas (Bouhaik *et al.*, 2013).

El potencial zeta y en consecuencia el tamaño hidrodinámico de las TiO₂ NPs pueden ser alterados por cambios en el pH de la solución en que se encuentren. Las TiO₂ NPs tienen un potencial zeta positivo cuando el pH es menor a 6, por lo tanto el potencial zeta será negativo cuando el pH sea mayor a 6 (Jiang *et al.*, 2009), dependiendo en el medio en el que se encuentren (Fig. 4).

El potencial zeta y el tamaño hidrodinámico de las NPs son solo unas de las varias características importantes en la interacción con los organismos. Dependiendo de las características de las NPs se darán diferentes respuestas toxicológicas dentro de los organismos (Tedja *et al.*, 2011).

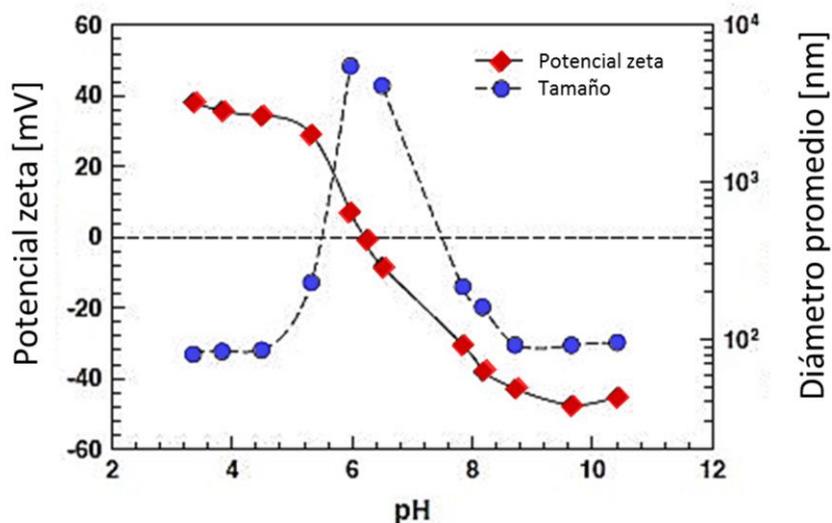


Fig. 4. Potencial Zeta de las TiO₂ NPs. Influencia del pH sobre el potencial Zeta y el tamaño hidrodinámico de las TiO₂ NPs (Jiang *et al.*, 2009).

Debido a que las TiO₂ NPs pueden depositarse en el sistema respiratorio, logran producir diferentes respuestas toxicológicas. Cuando las TiO₂ NPs alcanzan la zona alveolar de los pulmones, estas son internalizadas por las células epiteliales de pulmón a través de endocitosis. Estudios han demostrado que la viabilidad de las células epiteliales de pulmón (de la línea A549), no se ve afectada por la exposición de TiO₂ NPs, a concentraciones menores de 50 µg/ml (Moschini *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013).

Li *et al.* en el 2013 realizaron un estudio *in vivo* en donde muestra que la exposición a TiO₂ NPs produce cambios en la expresión de genes. Los genes que presentaron cambios después de la exposición a TiO₂ NPs fueron los genes involucrados con el citoesqueleto, seguido de señales de transducción, procesos metabólicos, proliferación celular, respuestas inmunes, apoptosis, respuestas a estrés, estrés oxidante, ciclo celular, transporte de iones, respuestas inflamatorias y diferenciación celular.

Se ha demostrado también que la exposición a TiO₂ NPs induce la producción de especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés (ROS) tales como anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en tejido de pulmón de ratón (Li *et al.*, 2013). Además, también se ha observado de manera *in vitro* la formación de ROS en células epiteliales de pulmón de la línea A549 cuando son expuestas a TiO₂ NPs (Müller *et al.*, 2010).

Las ROS también participan como moduladores importantes de señalización. Por lo tanto la exposición de las células a TiO₂ NPs puede, a través de la producción elevada de ROS afectar las cascadas de señalización celular que controlan los procesos tales como la inflamación, muerte celular y la proliferación celular (Skocaj *et al.*, 2011). La producción de ROS principalmente H₂O₂, está relacionado con la patogénesis del desarrollo del cáncer. Se ha demostrado que altos niveles de ROS (H₂O₂) han sido encontrados en células epiteliales de pulmón altamente invasivas (Tsai *et al.*, 2014).

Hoy en día existen suficientes investigaciones en donde se prueban los efectos que pueden tener las TiO₂ NPs en forma de NS. Debido a que nuevas formas de NPs se siguen sintetizando siendo los NB una de ellas, poco se sabe de los efectos que pueden producir. Sin embargo, se sabe que la forma de las NPs influye en las respuestas biológicas que se puede tener cuando se está expuesto a esta forma de NPs (Sanchez *et al.*, 2009).

Poco se ha estudiado si las respuestas biológicas generadas por las TiO₂ NPs está directamente relacionada con el proceso invasivo de células cancerosas. Sin embargo, se han realizado estudios en donde las TiO₂ NPs generan respuestas biológicas que pueden estar relacionadas con el proceso de invasión. Se ha demostrado que las TiO₂ NPs pueden alterar la expresión de genes relacionados con el citoesqueleto (Li *et al.*, 2013) lo cual sugiere que exista una remodelación del mismo para presentar una mayor invasividad. Además, se ha demostrado en células madre que las TiO₂ NPs tienen un fuerte impacto sobre la migración celular (Hou *et al.*, 2013). Estos son solo algunos de los procesos que se han estudiado por la exposición a TiO₂ NPs, los cuales están relacionados con el proceso de invasión y metástasis.

1.5 Proceso invasivo de células cancerosas

Tras el crecimiento de un tumor primario, la continua proliferación tumoral, la angiogénesis, las transformaciones genéticas acumuladas y la activación de complejas vías de señalización desencadenan la cascada metastásica.

La cascada metastásica implica una serie de eventos celulares que están involucrados tanto temporal como espacialmente. Solo un pequeño porcentaje de las células malignas poseen las características requeridas del establecimiento de la metástasis.

La metástasis comienza por un cambio en las interacciones adhesivas entre células que permite la disociación de las células tumorales desde el tumor primario y es seguido por una invasión local y la migración en la matriz intersticial (Fig. 5).

La invasión es uno de los principales pasos para el proceso metastásico de cualquier célula cancerígena. Para que las células cancerosas puedan realizar una invasión se necesitan diferentes procesos. Uno de los principales procesos es la pérdida de las proteínas E-caderina y citoqueratinas que provocan cambios dramáticos en las propiedades físicas y químicas de la célula, reduciendo específicamente la adhesión intracelular y produciendo cambios morfológicos. Una consecuencia de estos cambios es el desprendimiento del tumor primario y la adquisición de un fenotipo de motilidad. Además, las células expresan diferentes moléculas como metaloproteasas (MMP) en su superficie las cuales son encargadas de degradar la laminina y el colágeno de tipo IV que se encuentra en la matriz extracelular (Wirtz *et al.*, 2011).

Recientemente se han desarrollado diversos modelos *in vitro* para el estudio de la invasión. Sin embargo, un modelo muy bien aceptado es el modelo *in vivo* de la CAM, el cual se ha utilizado para el estudio de la angiogénesis (Rosas *et al.*, 2014), invasión (Bailey *et al.*, 2014) y metástasis (Chakravarthi *et al.*, 2014). Este modelo ha sido muy utilizado ya que la CAM está compuesta por un epitelio superior, que es de origen endodérmico, un estroma, de origen mesodérmico, y un epitelio bajo, de origen endodérmico, en donde se han probado gran cantidad de células tumorales humana para estudiar la progresión del cáncer (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014).

El modelo de la CAM se ha empleado para el estudio de la invasión ya que presenta diversas ventajas (Lokman *et al.*, 2012). Además, la CAM ha sido el mejor modelo para el estudio de la invasión ya que simula la membrana basal de humano debido a que esta principalmente compuesta por colágeno de tipo IV, además de tener tejido conectivo el cual contiene colágeno de tipo I, III y vasos sanguíneos (Liu *et al.*, 2013).

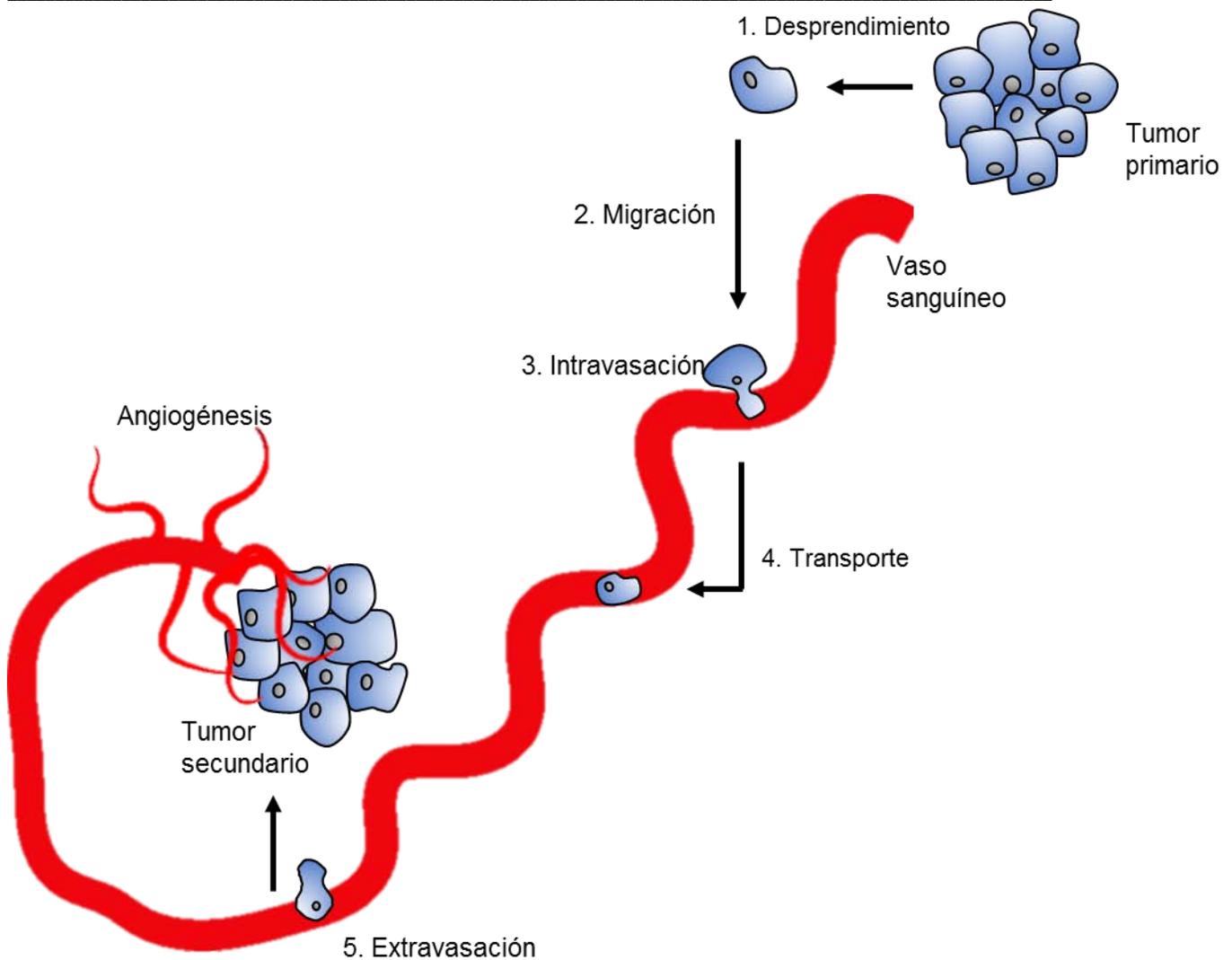


Fig. 5. Proceso metastásico de células cancerosas. En este proceso complejo, 1) las células cancerosas se desprenden de un tumor primario, 2) posteriormente penetrarán el tejido circundante, 3) para entrar en los vasos sanguíneos más cercanos y 4) circular en el sistema vascular. Algunas de estas células que se intravasaron 4) se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos y son capaces de extravasarse y migrar en el tejido local, donde formarán un tumor secundario seguido de la angiogénesis para poder obtener los nutrientes necesarios y finalmente proliferar.

2. ANTECEDENTES

Fukunaga *et al.*, en el 2002 estudiaron la expresión de la proteína citoqueratina 8 (CK8) en carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y en células pequeñas de cáncer de pulmón (SCLC). Este estudio fue realizado con el objetivo de relacionar si los altos niveles de CK8 están involucrados con la progresión y la metástasis. Los autores demostraron que los niveles de CK8 en suero de pacientes con NSCLC fueron significativamente altos en comparación con pacientes con SCLC. Además, encontraron también que los pacientes que presentaron metástasis distante tenían altos niveles de CK8 en comparación con pacientes que presentaron una metástasis no distante. Por lo tanto, concluyeron que los altos niveles de CK8 fueron significativamente asociados con la progresión de tumores y disminución de sobrevivencia en pacientes con NSCLC.

Shen *et al.*, en el 2008 probaron si la hipoxia tenía algún efecto sobre el proceso de invasión y migración de células A549, evaluando directamente el efecto de la hipoxia sobre la organización de la proteína actina y la actividad transcripcional de HIF-1 en células A549. Los autores demostraron que las células incubadas bajo condiciones de hipoxia tuvieron mayor capacidad de migración y de invasión en comparación con las células que fueron cultivadas bajo condiciones normales. También demostraron que las uniones intercelulares disminuían y que existía una desorganización de la proteína actina, proteína del citoesqueleto, bajo condiciones de hipoxia. Los autores concluyeron que la inducción de la migración, invasión y la adhesión celular puede ser modulada por la expresión del gen HIF-1, el cual indujo también un reorganización del citoesqueleto de actina.

Morimoto *et al.*, en el 2011 investigaron la expresión de los genes de metaloproteasas (MMP) y el tejido inhibidor de metaloproteasas (TIMP), está regulada por la exposición a NPs de óxido de níquel (NiO) y TiO₂ NPs en ratas Wistar. Los autores demostraron que la expresión de MMP2 en el pulmón de las ratas Wistar no aumento en presencia de NiO y TiO₂ NPs. También demostraron que la expresión de TIMP no se vio afectada por la presencia de ambos tipos de NPs. Por lo tanto los autores concluyeron que la exposición a los dos diferentes tipos de nanopartículas no aumenta la expresión de MMP-2 y TIMP-2 en comparación al grupo control. Lo cual discuten que pudo deberse al corto tiempo de exposición y a la baja concentración del tratamiento que fue de solo 4 semanas.

Oyanagi *et al.*, en el 2012 estudiaron la transición epitelio-mesenquimal (EMT) el cual se piensa que es un evento crucial para la progresión del cáncer. EMT es generalmente caracterizado por la pérdida de marcadores epiteliales como E-caderina, y la sobreexpresión de marcadores mesenquimales como N-caderina y vimentina. Para inducir la EMT probaron tres citosinas como, TGF- β , TNF- α y EGF. Ellos demostraron que solo TGF- β fue requerido para inducir EMT, así como en la reducción de la expresión de E-caderina y la inducción de vimentina. Además, demostraron que TGF- β estimula la expresión de dos marcadores de invasión tumoral tales como MT1-MMP y laminina γ 2. Los autores concluyeron que EMT inducido en células cancerosas adquieren un fenotipo mesenquimal e invaden dentro de la matriz de colágeno. Además TGF- β induce la EMT disminuyendo la adhesión celular.

Recientemente Desai *et al.*, 2013 utilizaron células A549 para estudiar los cambios morfológicos y la relación que tienen con la motilidad e invasión de las mismas al expresar diferentes moléculas. Utilizando el medio de cultivo condicionado por las mismas células y medio de cultivo no condicionado, encontraron que las células A549 en el medio condicionado cambian su morfología. Además, las células A549 expresan moléculas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e interleucina (IL)-8, lo cual sugiere que la expresión de estas moléculas podría inducir la motilidad y la invasión.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la vía inhalatoria es la principal vía de exposición a TiO₂ NPs en ambientes ocupacionales y a su clasificación de las mismas en el grupo 2B como posibles cancerígenos para humano ha aumentado la preocupación sobre los efectos que se pueda tener sobre la salud humana. Además, la inhalación de estas partículas podría incrementar el riesgo para el desarrollo del cáncer de pulmón, la cual es la principal causa de muerte en todo el mundo.

Por lo anterior es de gran importancia estudiar el efecto que podrían tener las TiO₂ NPs sobre procesos carcinogénicos. Un proceso carcinogénico puede derivar en la formación de un tumor, dicho tumor puede adquirir características más agresivas mediante la migración, invasión a otro tejido y proliferación de células en el tejido invadido. Los procesos anteriormente mencionados han sido poco estudiados en células de pulmón expuestas a TiO₂ NPs.

Por lo anterior en esta tesis se utilizó el modelo de la membrana corioalantoide para estudiar la capacidad invasiva y proliferativa de células epiteliales de pulmón expuestas a TiO₂ NPs. Además, se utilizaron dos formas de NPs, nanoesferas y nanobelts para comparar el efecto de la forma geométrica en los procesos anteriormente mencionados, debido a que la forma es una característica que influye en los efectos celulares.

4. HIPÓTESIS

La exposición de diferentes formas geométricas de TiO₂ en forma de NS y NB en células epiteliales de pulmón genera respuestas biológicas que promueven el proceso de migración, invasión y proliferación en la membrana corioalantoide.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar en la CAM la capacidad de invasión y proliferación de las células A549 que fueron expuestas *in vitro* a NS y NB durante 7 días.

5.1 Objetivos particulares

5.1.1 Caracterizar las NS y NB.

5.1.2 Determinar la morfología de los cultivos celulares expuestos a NS y NB.

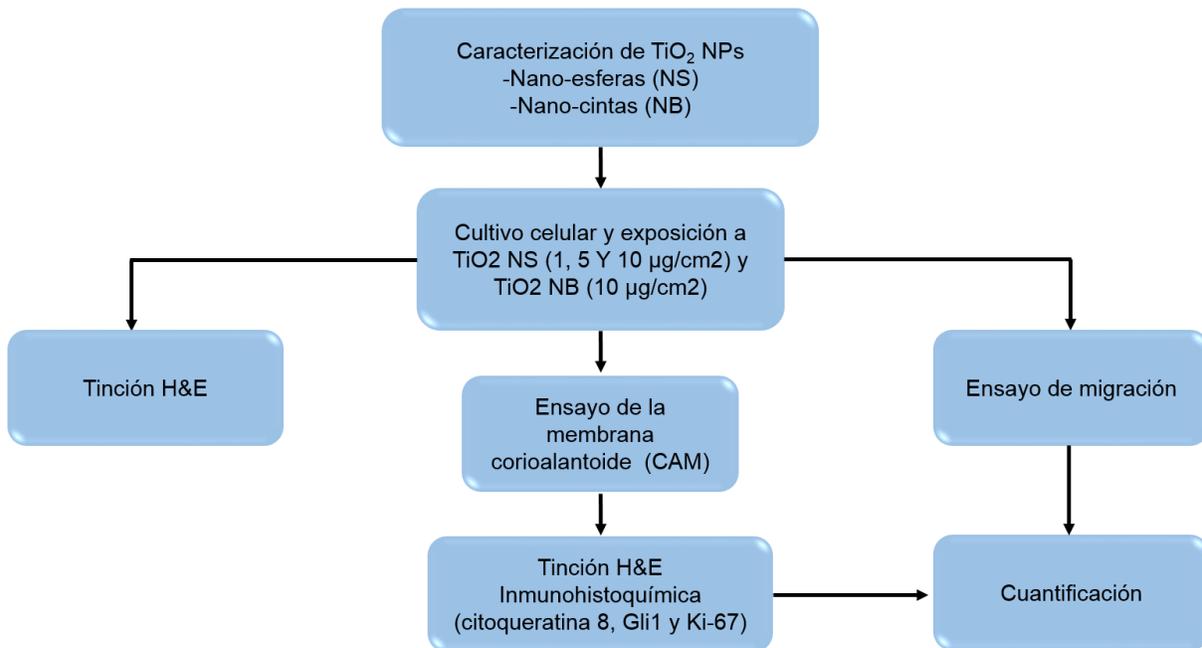
5.1.3 Evaluar *in vitro* la capacidad de migración de las células A549 expuestas NS y NB.

5.1.4 Evaluar por medio de marcadores específicos la invasión de las células A549 expuestas a las NS y NB dentro de la CAM. Además de cuantificar el área de la CAM invadida por las células A549.

5.1.5 Evaluar mediante marcadores específicos la proliferación de las células A549 expuestas a NS y NB y cuantificar el área de proliferación dentro de la CAM.

6. MATERIALES Y MÉTODO

Diagrama metodológico



6.1 Caracterización de TiO₂ NPs

Las TiO₂ NPs en sus diferentes formas geométricas NS y NB fueron observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Se obtuvieron imágenes a 5000x con 15 kV con ayuda de un microscopio electrónico de barrido (JEOL 5800-LV, Japan). Para estudiar el tamaño y forma de los aglomerados formados con las TiO₂ NPs primarias se realizó un análisis por dispersión dinámica de luz (DLS) y una microscopía electrónica de transmisión (TEM-JEOL-JEM 1010, JEOL, Japan) a 75 000x con 60kV de aceleración, respectivamente. Para este análisis se utilizaron 10 mg de TiO₂ NPs en sus diferentes formas, las cuales fueron suspendidas en 1 ml de agua desionizada. Enseguida, fueron sonicadas durante 30 min a 40 Hz. Posteriormente, se tomaron 2.4 µl, los cuales fueron suspendidos en medio F12K+SFB quedando a una concentración de 3.43×10^{-3} mg/ml.

Finalmente, el Potencial Zeta de los diferentes tipos de TiO₂ NPs se midió con el analizador de Potencial Zeta (Zeta Plus Brookenhaven USA).

6.2 Cultivo celular

Dado que la principal vía de exposición en ambientes ocupacionales a las TiO₂ NPs es la vía inhalatoria se utilizaron células de la línea A549 (neumocitos tipo II) las cuales se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células A549 fueron cultivadas con medio F12K (In Vitro S.A., #cat. ME-038 D.F. México) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Bio West, #cat. US1520 Kansas City, MO) a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂ hasta obtener un 80% de confluencia. Posteriormente se les retiró el medio a las células A549 y fueron regresadas a incubación con 5 ml de solución tripsina- EDTA-4Na (tripsina al 0.05%; EDTA-4Na al 0.02%) (In Vitro S.A, #cat. EN-008 D.F. México) durante 5 minutos. Finalmente, las células A549 fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos y les fue retirado el sobrenadante para sembrar las células nuevamente en cajas de 75 cm² para su crecimiento (Stearns *et al*, 2001).

6.3 Exposición de células A549 a TiO₂ NPs

Para exponer las células A549 a las diferentes formas y concentraciones de TiO₂ NPs, se utilizó Oxido de titanio (IV), anatasa, <25nm, 99.7% base de metal, en forma de Nanoesferas (NS) las cuales se obtuvieron de Sigma Aldrich (Aldrich, #cat 637254-50G, St. Louis, MO). Además se utilizaron nanocintas por sus siglas en inglés (NB), otra forma de TiO₂ NPs, las cuales fueron sintetizadas a partir de las TiO₂ NS por un proceso hidrotérmico como lo describe (Porter, 2012). Para cada experimento se pesó 1 mg de TiO₂ NPs de las diferentes formas NS y NB por separado, las cuales fueron resuspendidas de manera estéril en 1 ml de medio F12K+SFB. Una vez obtenido el stock de las diferentes formas de TiO₂ NPs (1 µg TiO₂ NPs/1 µl F12K+SFB) fueron sonicados durante 30 minutos a 60 Hz. Posteriormente, las TiO₂ NPs fueron diluidas con F12K+SFB para obtener concentraciones finales de 1, 5 y 10 µg de TiO₂ NPs. Para exponer las células A549 a TiO₂ NPs se utilizaron cajas Petri de 24 cm, en donde fueron sembradas a una densidad de 150 000 células/cm². Finalmente, las células A549 fueron expuestas a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂ NS y a 10 µg/cm² de TiO₂ NB durante 7 días. Se utilizó la concentración más alta, 10 µg/cm², para las TiO₂ NPs en forma de NB, ya que se observó si la forma también influye en el proceso de invasión y proliferación de las células A549.

6.4 Tinción hematoxilina y eosina (H&E) de células A549

Para observar la morfología de las células A549 expuestas a TiO₂ NPs se realizó una tinción de hematoxilina y eosina (H&E). Inicialmente, las células A549 fueron sembradas sobre un cubreobjetos dentro de una caja Petri expuestas a las diferentes formas de TiO₂ NPs (1, 5 y 10 µg/cm² NS y 10 µg/cm² NB). Una vez transcurridos los 7 días de exposición a TiO₂ NPs las células A549 fueron fijadas con formaldehído 3% (MP Biomedicals, Inc #cat. 104047, Solon, Ohio) a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente las células A549 fueron sumergidas en etanol 70% por 2 minutos y lavadas con agua destilada 4 minutos. Durante 25 minutos las células A549 fueron teñidas con hematoxilina, seguida por 15 minutos de tinción con eosina a temperatura ambiente. Finalmente las células fueron lavadas dos veces con agua destilada durante 3 minutos. Una vez teñidas las células, fueron montadas en un portaobjetos añadiendo entellan (Merck KGaA, #cat. 107960, Darmstadt, Germany) para su conservación. Finalmente, las células A549 fueron fotografiadas con un microscopio óptico Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) a un aumento de 40x para su análisis morfológico.

6.5 Ensayo de migración

Para observar la migración de las células A549 expuestas a TiO₂ NPs se realizó el ensayo de migración. Utilizando placas de 12 pozos, se sembraron 150,000 células por pozo las cuales se mantuvieron bajo condiciones estériles a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂ hasta obtener un 80% de confluencia. Posteriormente, con una punta de pipeta azul estéril se realizó una herida en el fondo del pozo. Inmediatamente los diferentes pozos fueron enjuagados 3 veces con PBS para desechar las células A549 que fueron despegadas por la punta de la pipeta.

Finalmente, las células A549 fueron expuestas a TiO₂ NPs en forma de NS a concentraciones de 1, 5 y 10 µg/cm². Además, las células A549 fueron expuestas también a TiO₂ NPs en forma de NB utilizando solo la concentración más alta (10 µg/cm²). Con la finalidad de observar la migración de las células A549 con las diferentes concentraciones, fueron monitoreadas a diferentes tiempos (0, 24, 48 h y 7 días).

6.6 Tinción con sulforodamida B

Para poder observar claramente la migración de las células A549 expuestas a TiO_2 NPs, se realizó una tinción con sulforodamida B (Voigt, 2005). Brevemente, las células fueron fijadas con ácido tricloroacético frío al 10% (200 μl /pozo) y se dejaron incubar a 4°C durante 1 h. Enseguida, se retiró el ácido tricloroacético y cada pozo fue lavado 4 veces con agua corriente, la placa de 12 pozos se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 μl de sulforodamida B a cada pozo dejando la placa a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se enjuagaron los pozos de cada tratamiento 4 veces con ácido acético al 1% dejándolos secar a temperatura ambiente para su posterior análisis y cuantificación con ayuda del programa Image J. V. 1.47 (NIH, USA).

6.7 Cuantificación de migración

Para poder realizar la cuantificación de las células que migraron dentro del área de la herida, se utilizó el programa Image J. Una vez obtenidas las imágenes del ensayo de migración estas fueron abiertas con el programa Image J (Fig. 6).

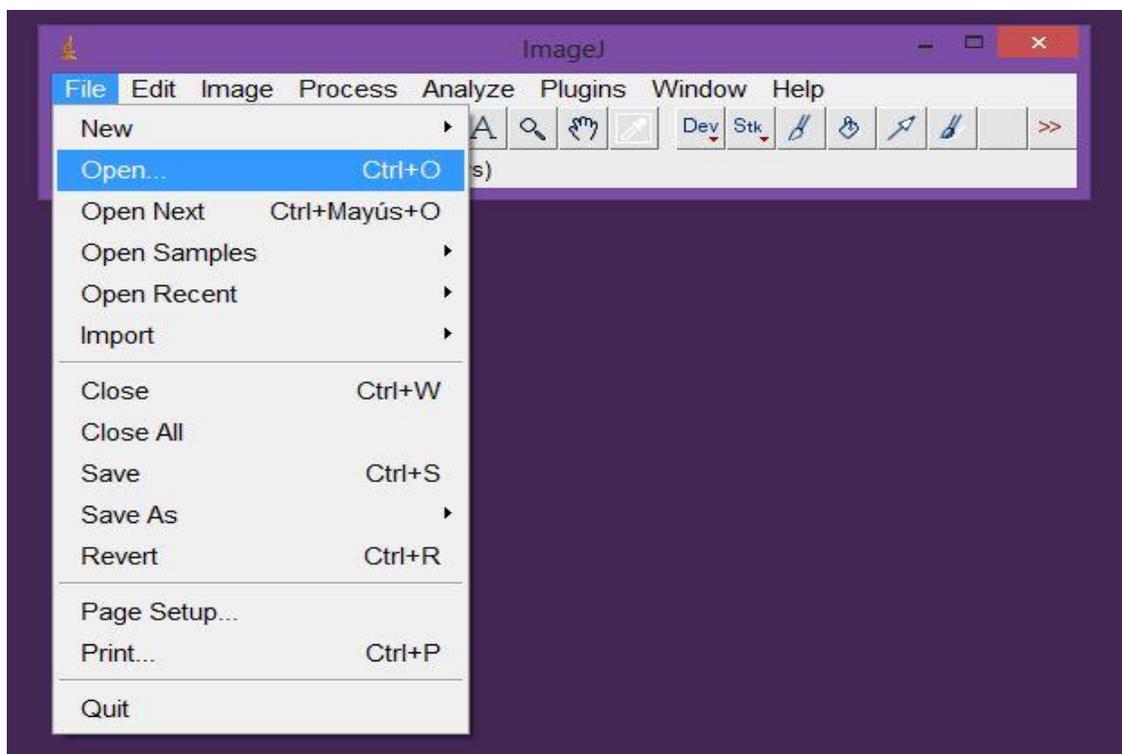


Fig. 6. Selección de imágenes. Las imágenes obtenidas del ensayo de migración fueron abiertas con el programa ImageJ para su análisis.

Una vez abierta la imagen en el programa con la opción *Rectangular*, se selecciona el área de la imagen que se desea analizar. En este caso el área en donde se realizó la herida con la punta de la pipeta estéril (Fig. 7).

Seleccionada el área para analizar, se presiona click derecho para seleccionar la opción *Duplicate*. Esta opción duplicará el área seleccionada, de este modo se obtendrá solo el área de la herida (Fig. 8).

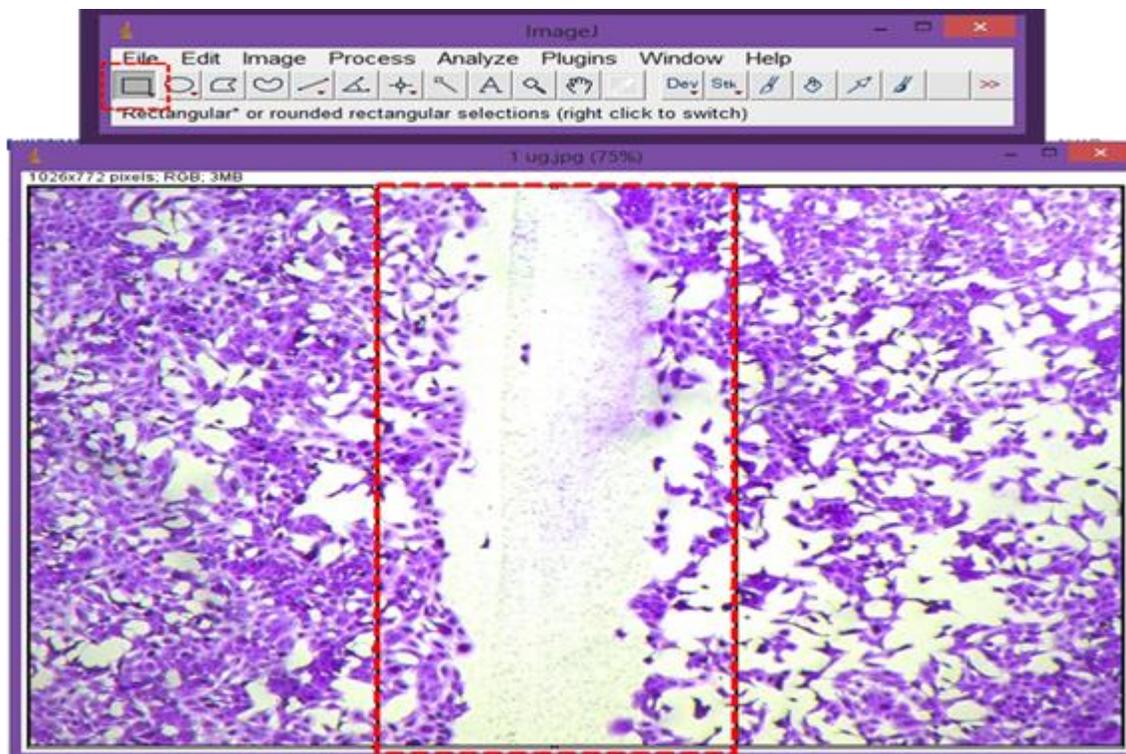


Fig. 7. Selección del área. La línea punteada indica el área de la herida que fue seleccionada para el análisis.

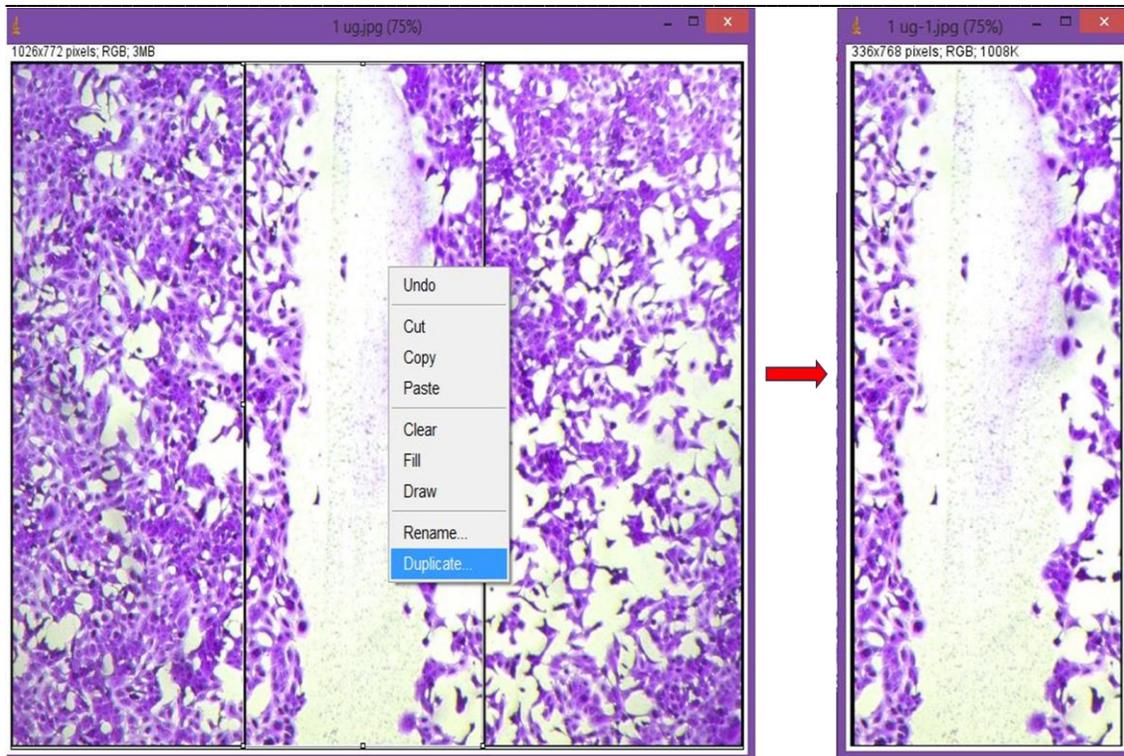


Fig. 8. Duplicación. Con la opción *Duplicate* se obtendrá solo el área que se desea analizar. Automáticamente aparecerá un nuevo recuadro solo con el área seleccionada. La flecha indica el recuadro de la selección.

Teniendo solo el área que se desea analizar se selecciona la opción *Process*, enseguida se desplegará un menú en donde se seleccionará la opción *Binary*. Posteriormente se abrirá un submenú en donde se seleccionará la opción *Make binary*. Esta opción hará binaria la imagen del área duplicada para poder cuantificar el área (Fig. 9).

Para la cuantificación del área se tiene que ajustar la escala. Para esto se utiliza la opción *Analyze* >> *Set scale*, en donde se desplegará un recuadro para ajustar la escala. La escala se ajustará de acuerdo a la barra de escala dependiendo del objetivo utilizado en el microscopio (Fig. 10).

Finalmente se seleccionará la opción *Analyze* >> *Analyze particles* y nos dará una tabla con la sumatoria de diferentes valores entre ellos el % de área, el cual fue el que se utilizó para cuantificar la migración. De esta tabla se extraerán los datos de cada una de las imágenes analizadas para posteriormente ser graficados (Fig. 11).

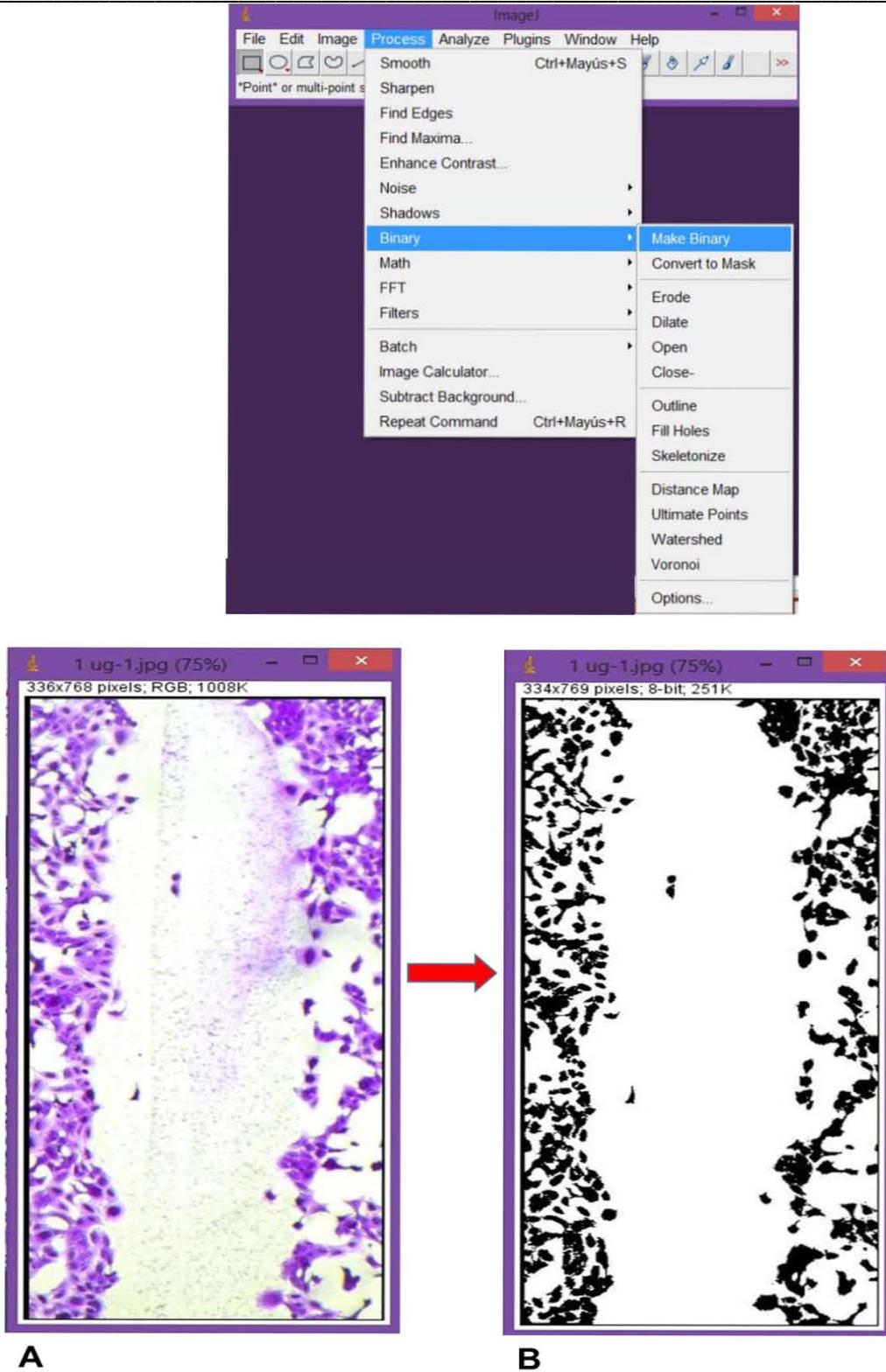


Fig. 9. Binarizar la imagen. Para realizar el análisis se utiliza la opción binarizar. A) imagen original. B) imagen binarizada.

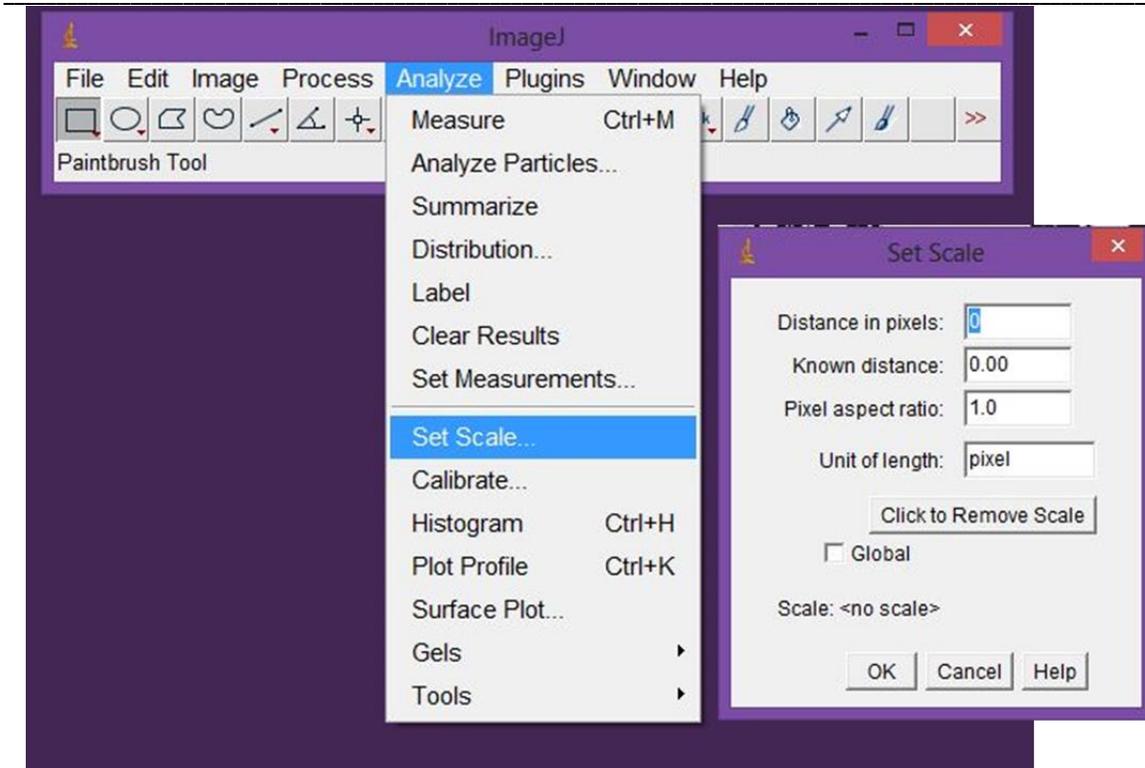


Fig. 10. Ajuste de escala. Para realizar la medición del área invadida se debe de ajustar la escala con la barra de escala de la imagen original.

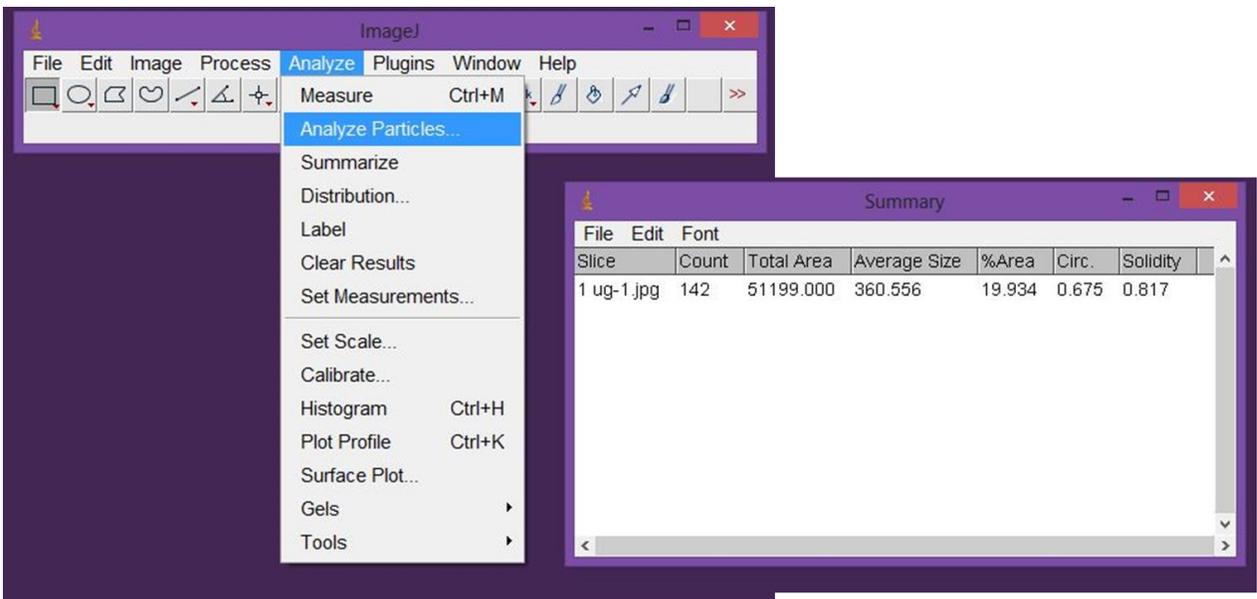


Fig. 11. Análisis del área. Al momento de analizar la imagen binarizada se desplegará un recuadro en donde da diferentes datos para poder graficar la migración.

6.8 Ensayo de la membrana corioalantoide (CAM)

Para observar la invasión de las células A549 se usó el modelo de la CAM. Para realizar este ensayo se utilizaron huevos de gallina de la línea Leghorn fértiles obtenidos de Aves Libres de Patógenos Específicos (ALPES S.A. de C.V., Tehuacán, Puebla) los cuales fueron incubados a 37°C y 80% de humedad relativa durante 11 días. Enseguida, en condiciones estériles, se abrió una pequeña ventana en el cascarón con un tamaño aproximadamente de 1.5 x 1.5 cm del lado de la cámara de aire, localizada en el polo ancho del huevo. Posteriormente se preparó una mezcla con 40 µl de colágeno tipo I (Santa Cruz Biotechnology, #cat. sc-136157 Inc. Dallas, Texas) y 30,000 células A549/10 µl de F12K+SFB expuestas a diferentes formas y concentraciones de TiO₂ NPs por separado (Lokman *et al.*, 2012). La mezcla de colágeno-células se colocó sobre la CAM, los huevos fueron cerrados y devueltos a la incubadora por 5 días más. Posteriormente, la CAM fue extraída junto con la mezcla de colágeno-células (Fig. 12). Finalmente, las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 3% durante 48 horas las cuales fueron embebidas posteriormente en parafina.

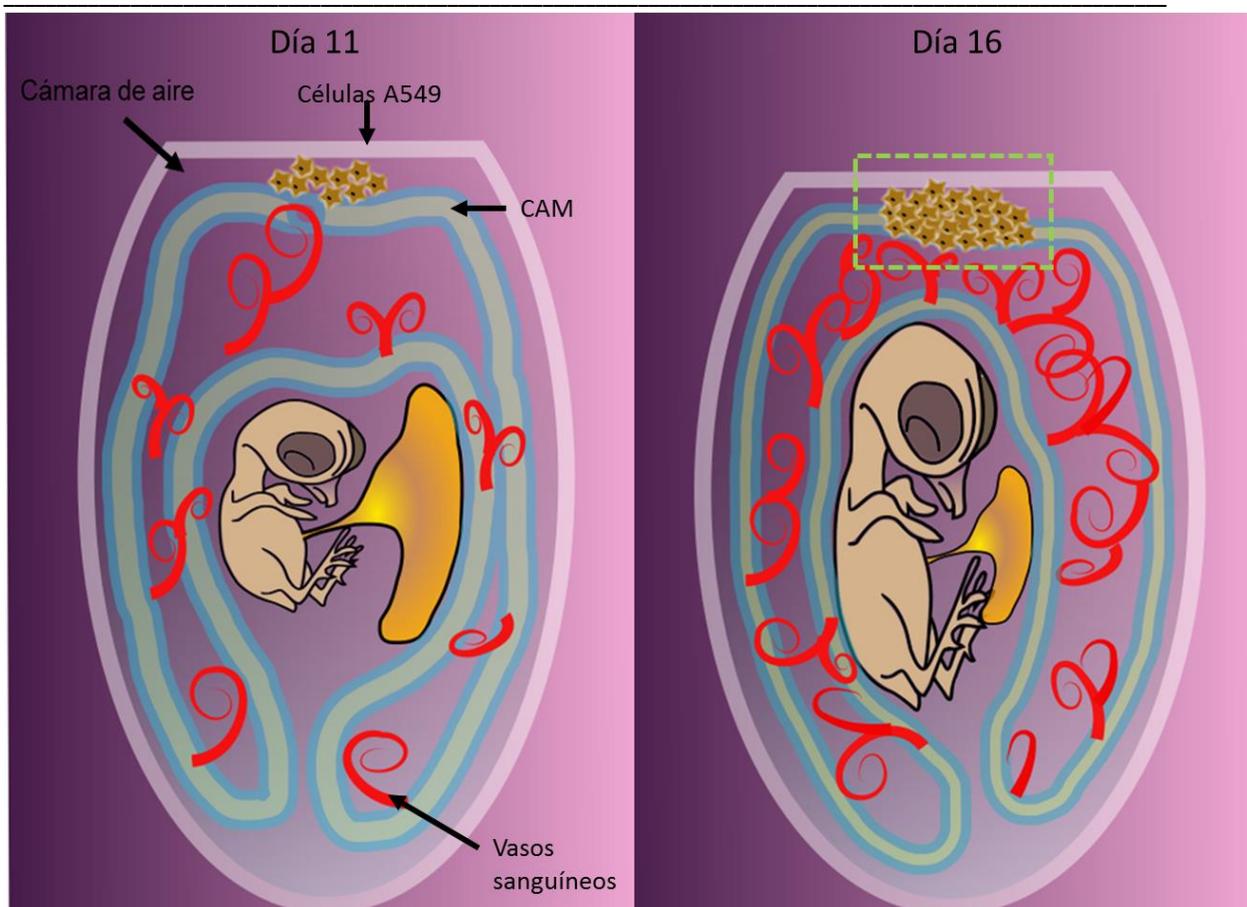


Fig. 12. Modelo de membrana corioalantoide (CAM). Las células A549 una vez expuestas a TiO₂ NPs en forma de NS y NB a diferentes concentraciones (1,5 y 10 µg/cm²) fueron depositadas junto con el colágeno de tipo I sobre la CAM al día once de incubación. Al día dieciséis las células A549 fueron cosechadas junto con la CAM para su posterior análisis. La línea punteada muestra la parte de la CAM que fue cosechada para analizar. Se realizaron tres experimentos independientes. CAM, membrana corioalantoide; TiO₂, dióxido de titanio; NS, nanoesferas; NB, nanocintas.

6.9 Inmunohistoquímica (IHC)

Se realizaron cortes histológicos a las muestras de la CAM con un grosor de 6 µm las cuales fueron teñidas con H&E para observar la invasión de las células A549 dentro de la CAM. Para evidenciar la capacidad de invasión de las células A549 expuestas a diferentes formas y concentraciones de TiO₂ NPs en la CAM, se realizó IHC contra CK8 (Santa Cruz Biotechnology, #cat. sc-101459 Inc. Dallas, Texas) para detectar las células A549 dentro de la CAM, además se utilizaron marcadores de proliferación como Gli1 (Santa Cruz Biotechnology, #cat. sc-20687 Inc. Dallas, Texas) y Ki-67 (BioLegend, #cat. 652402 San Diego, CA) para saber si las células A549 expuestas a TiO₂ NPs tienen una mayor capacidad proliferativa comparadas con las células no expuestas. Para realizar la IHC con los diferentes anticuerpos las muestras fueron sometidas a una recuperación

antigénica incubándolas durante 15 min a 120°C con agua destilada. Enseguida las muestras fueron bloqueadas con una solución de H₂O₂ 0.3% y metanol absoluto durante 30 min. Posteriormente, se usó el kit Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP/DAB Detection System (Bio SB, #cat. BSB 0003 Santa Barbara, CA, USA) para la incubación de los anticuerpos.

La incubación de las muestras con los anticuerpos primarios se realizó con el reactivo Protein Blocker/Antibody diluent (del kit antes mencionado), añadiendo CK8 (1:100), Gli1 (1:500) y Ki-67 (1:500) las cuales fueron incubadas a 4°C durante toda la noche. Enseguida, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS 1x para posteriormente ser incubadas con el segundo anticuerpo utilizando el reactivo del kit Mouse/Rabbit Immunodetector Biotin Link durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron lavadas con PBS 1x durante 5 min y posteriormente fueron contrateñidas con hematoxilina durante 10 min. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas y montadas con Entellan para ser microfotografiadas con un microscopio Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) para su posterior análisis. Se cuantifico el área de tinción positiva en tres fotografías por cada muestra seleccionando por el programa ImageJ el área teñida con coloración café. Los resultados se hicieron por triplicado y se reportaron por μm^2 para cada marcador.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de las TiO₂ NPs

Basado en las imágenes del SEM se puede corroborar que las TiO₂ NPs con las que se trabajó fueron efectivamente NS y NB (Fig. 13 A y B). Las TiO₂ NPs en forma de esferas tuvieron un tamaño hidrodinámico mayor en comparación con el tamaño de las NPs en forma de cintas (Tabla 1). El potencial zeta fue determinado y se observó que en el medio que se utilizó el cual fue F12K complementado con 10% de SFB de ambos tipos de NP, fueron semi-estables, considerando que una suspensión es estable cuando su potencial zeta es cercano a +30 o -30 mV.

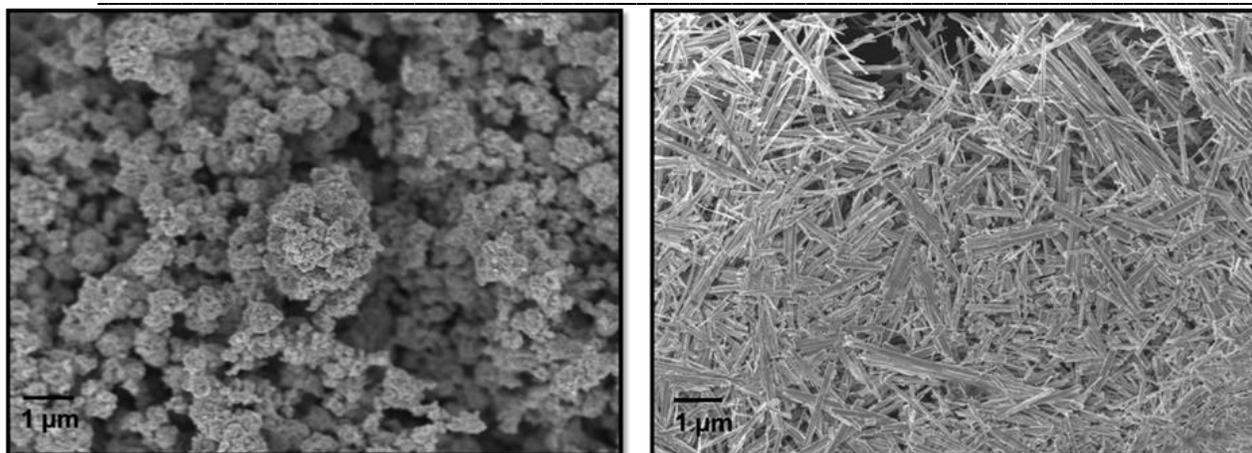


Fig. 13. Microscopía electrónica de barrido (SEM). Imágenes representativas del SEM de diferentes formas de TiO₂ NPs A) TiO₂ NPs en forma de esferas. B) TiO₂ NPs en forma de cintas.

Tamaño y estabilidad de lasTiO₂ NPs en suspensión

	Esferas (NS)	Cintas (NB)
Diámetro hidrodinámico (nm)	588	454
Potencial Z (mV)	-20.9	-27.4

Tabla 1. Mediante el análisis de DLS se obtuvo un mayor diámetro hidrodinámico en las TiO₂ NPs en forma de esferas en comparación con las cintas. Los valores del Potencial Zeta demuestran que los aglomerados de ambas formas de NPs son estables en el medio en el cual fueron suspendidos.

7.2 Análisis morfológico de células A549 expuestas a TiO₂ NPs

Las células A549 expuestas a TiO₂ NPs y teñidas con H&E muestra la morfología de las mismas y la localización de las TiO₂ NPs. Se observó que la morfología de las células expuestas a las TiO₂ NPs no tiene cambios aparentes en comparación a las células no expuestas a TiO₂ NPs. Además, se observaron depósitos de TiO₂ NPs dentro de la célula, esto debido a la capacidad que tienen las células A549 para internalizar TiO₂ NPs lo cual ya se ha reportado (Stearns *et al.*, 2001; Janer *et al.*, 2014) (Fig. 14).

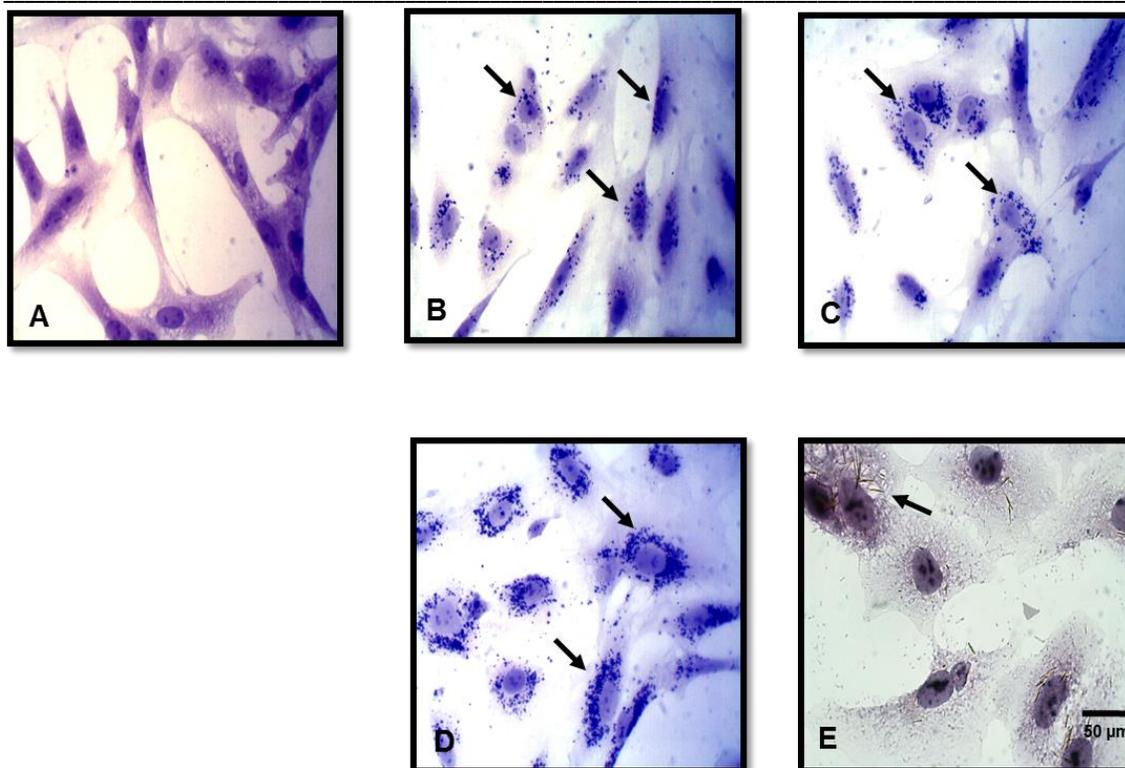


Fig. 14. Tinción H&E de células A549 expuestas 7 días a TiO₂ NPs. A) células A549 sin tratamiento. B) células con 1 µg/cm² de TiO₂ NS. C) células expuestas con 5 µg/cm² de TiO₂ NS. D) células expuestas con 10 µg/cm² de TiO₂ NS, E) células expuestas a 10 µg/cm² de TiO₂ NB. Las flechas indican la localización de TiO₂ NPs alrededor del núcleo. Microscopía óptica 40x. Se realizaron tres experimentos independientes. H&E, hematoxilina y eosina; TiO₂ NPs, nanopartículas de dióxido de titanio; TiO₂ NS, nanoesferas de dióxido de titanio; TiO₂ NB, nanocintas de dióxido de titanio.

7.3 Migración de células A549

Las células A549 fueron expuestas a diferentes concentraciones y a las diferentes formas de TiO₂ NPs. Inmediatamente después de la exposición a las TiO₂ NPs, se realizó el ensayo de migración lo cual se consideró como el tiempo 0. Las células A549 a este tiempo no mostraron migración alguna.

Las células A549 que fueron expuestas a 1 y 5 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NS durante 24, 48 h y 7 días presentaron mayor migración en comparación con las células no expuestas a NPs. Por lo contrario las células A549 que fueron expuestas a 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NS y NB presentaron una menor migración en comparación con las células A549 expuestas a 1 y 5 µg/cm² (Fig. 15).

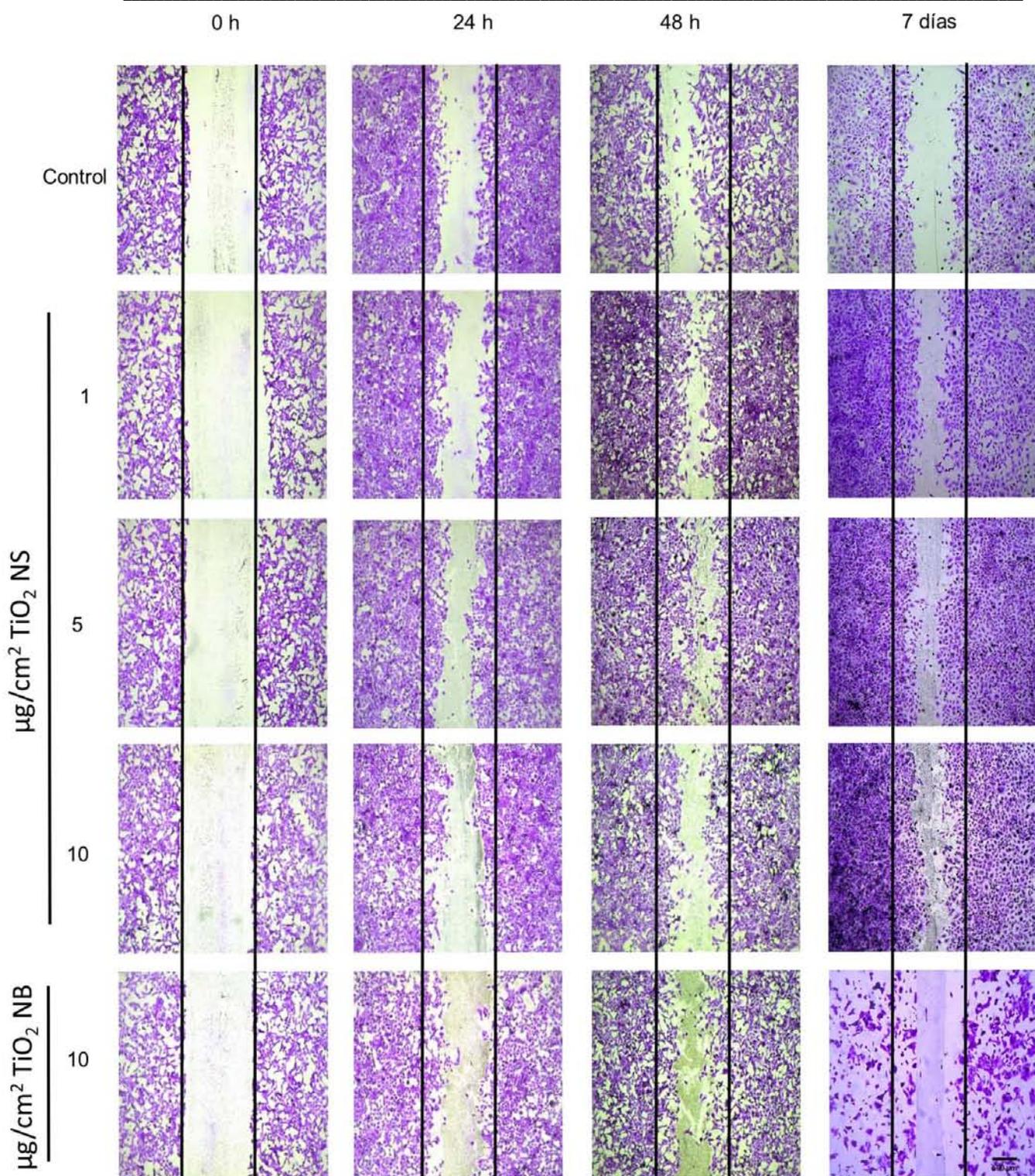


Fig. 15. Ensayo de migración. Células A549 expuestas a TiO₂ NPs en forma de NS (1,5 y 10 µg/cm²) y NB (10 µg/cm²). Se observa que las células A549 no expuestas a TiO₂ NPs no presentan una alta capacidad de migración a 24 h. Sin embargo, las células A549 expuestas durante 48h a TiO₂ NPs en forma de NS a concentraciones de 1 y 5 µg/cm² se observa una mayor migración en comparación con las células A549 expuestas a 10 µg/cm² de NS y NB. Las células que fueron expuestas durante 7 días a TiO₂ NPs en forma de

NS presentaron una mayor migración, sin embargo, las células expuestas NB disminuyeron su número, por lo tanto presentaron menor migración. Se realizaron tres experimentos independientes. TiO₂ NPs, nanopartículas de dióxido de titanio; NS, nanoesferas; NB, nanocintas.

7.4 Cuantificación del proceso de migración de células A549

La cuantificación de la migración de las células A549 expuestas durante 24 h a 1 y 5 µg/cm² TiO₂ NPs en forma de NS demostró que la migración tuvo una tendencia a incrementar. Además, cuando las células A549 fueron expuestas a 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NS y NB se observó una disminución en la migración (Fig. 16A). Cuando las células A549 fueron expuestas durante 48 a TiO₂ NPs en forma de NS y NB no se observó un aumento o una disminución de la migración (Fig. 16B). Sin embargo, cuando las células A549 fueron expuestas durante 7 días a 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NS se observó un incremento en la migración, siendo la concentración más alta la que promovió mayor migración en las células A549. Además, se observó que cuando las células A549 fueron expuestas durante 7 días a 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NB la migración disminuyó significativamente en comparación con las concentraciones de TiO₂ NPs en forma de NS (Fig. 16C).

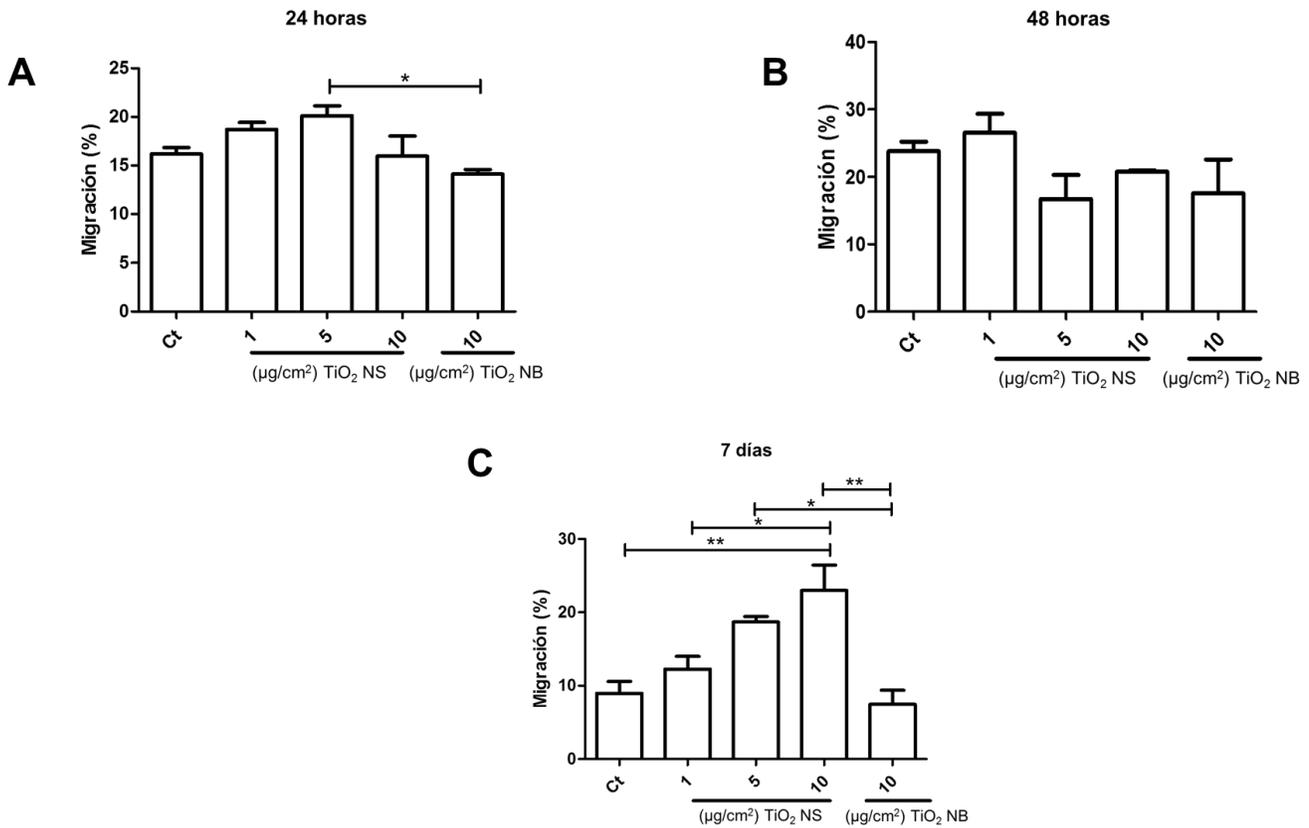


Fig. 16. Porcentaje de migración de células A549. Se realizó la cuantificación de la migración de las células A549 en el ensayo de la herida con ayuda del programa Image J. A y B) Las gráficas muestran que las células A549 que fueron expuestas durante 24 y 48 h tienen una tendencia a incrementar la migración y disminuirla a concentraciones de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NS y NB. C) Las células A549 que fueron expuestas durante 7 días a TiO_2 NPs en forma de NS tuvieron un incremento en la migración. Sin embargo, las células A549 expuestas a NB disminuyeron significativamente la migración en comparación con las células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NS. NS, nanoesferas; NB, nanobelts. * $p < 0.5$ (Media Error Estándar)

7.5 Análisis de la capacidad invasiva de células A549 dentro de la CAM

Con la tinción H&E muestra la estructura normal de la CAM formada por el ectodermo (ET) capa exterior, mesodermo (M) capa media y el endodermo (ED) capa interna (Fig. 17A). En la muestra con células A549 no expuestas a TiO_2 NPs se pudo observar a las células A549 en el ET (Fig. 17B). Las muestras en donde las células A549 fueron expuestas a 1, 5, y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NS, se observaron cúmulos de células en el M, lo cual sugiere que son las células A549 invadiendo el M (Fig. 17C, D y E). En la muestra con células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NB se observó el M con una mayor densidad de células en comparación con la muestra control y con las muestras en donde las células A549 fueron expuestas a diferentes concentraciones de TiO_2 NS (Fig. 17F).

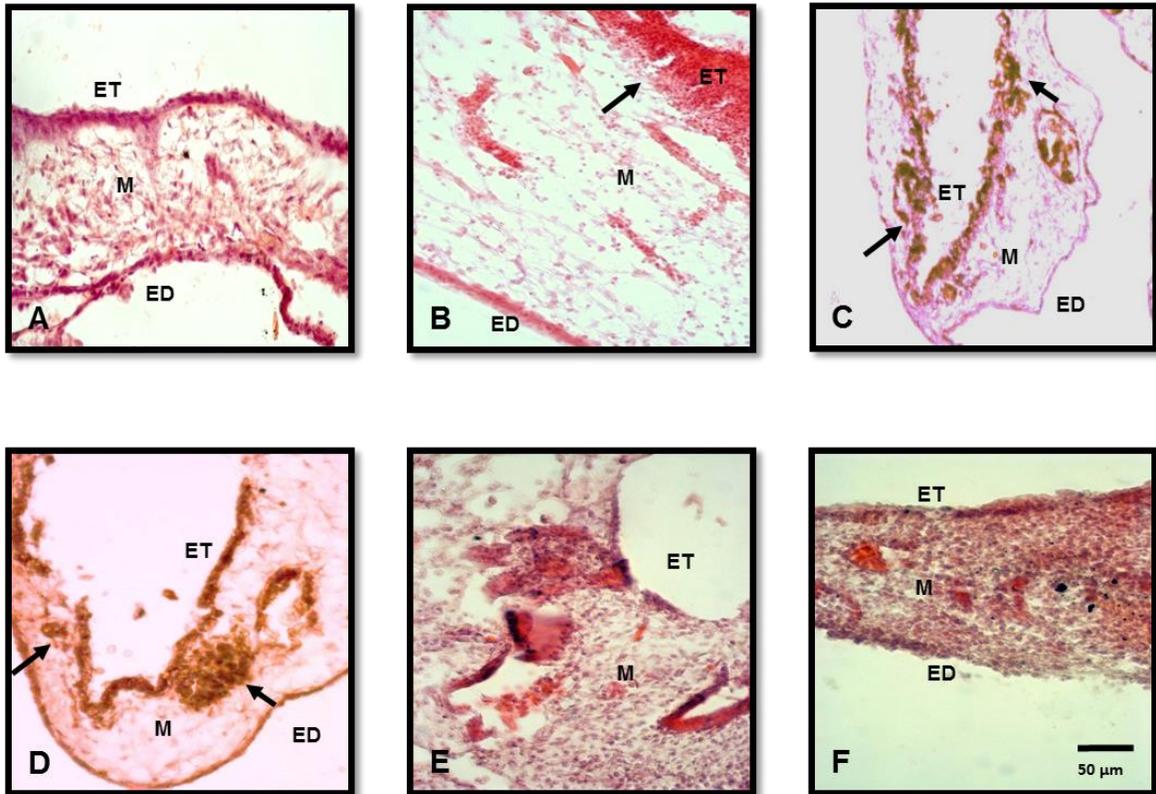


Fig. 17. Capacidad invasiva de células A549 en la CAM teñidas con H&E. A) CAM control en donde se observa la estructura normal formada por ET, M y ED. B) la flecha indica las células A549 no expuestas a TiO_2 NPs sembradas sobre la CAM. C) células expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO_2 NPs, la flecha señala la formación de

pequeños cúmulos por debajo del ET. D) células expuestas a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO_2 NPs, la flecha señala dentro del M la formación de un cúmulo. E y F) células expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO_2 NPs de diferentes formas NS y NB, se observa un gran cantidad de células dentro del M. Microscopía óptica 40x. Se realizaron tres experimentos independientes. ET, ectodermo; M, mesodermo; ED, endodermo; TiO_2 NPs, nanopartículas de dióxido de titanio.

7.6 Inmunolocalización de las células A549 dentro de la CAM

Para poder localizar a las células A549 dentro de la CAM se realizó una IHC contra CK8. En la muestra control se observó la estructura normal de la CAM formada por las tres diferentes capas (Fig. 18A). En la muestra donde las células A549 no fueron expuestas a TiO_2 NPs la señalización positiva se observó por encima del ET (Fig. 18B). Las células A549 que fueron expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NS se localizaron por debajo del ET comenzando a invadir el M (Fig. 18C). Las células A549 expuestas a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs tuvieron la capacidad de atravesar el ET y formar pequeños cúmulos de células dentro del M los cuales dieron una señalización positiva (Fig. 18D). La exposición de células A549 con la mayor concentración de TiO_2 NPs en forma de NS dio una señalización positiva abarcando gran parte del M (Fig. 18E). Las muestras con células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NB revelaron una señalización positiva mucho más diseminada dentro del M en comparación con las células control y con las diferentes concentraciones de TiO_2 NPs en forma de NS (Fig. 18F).

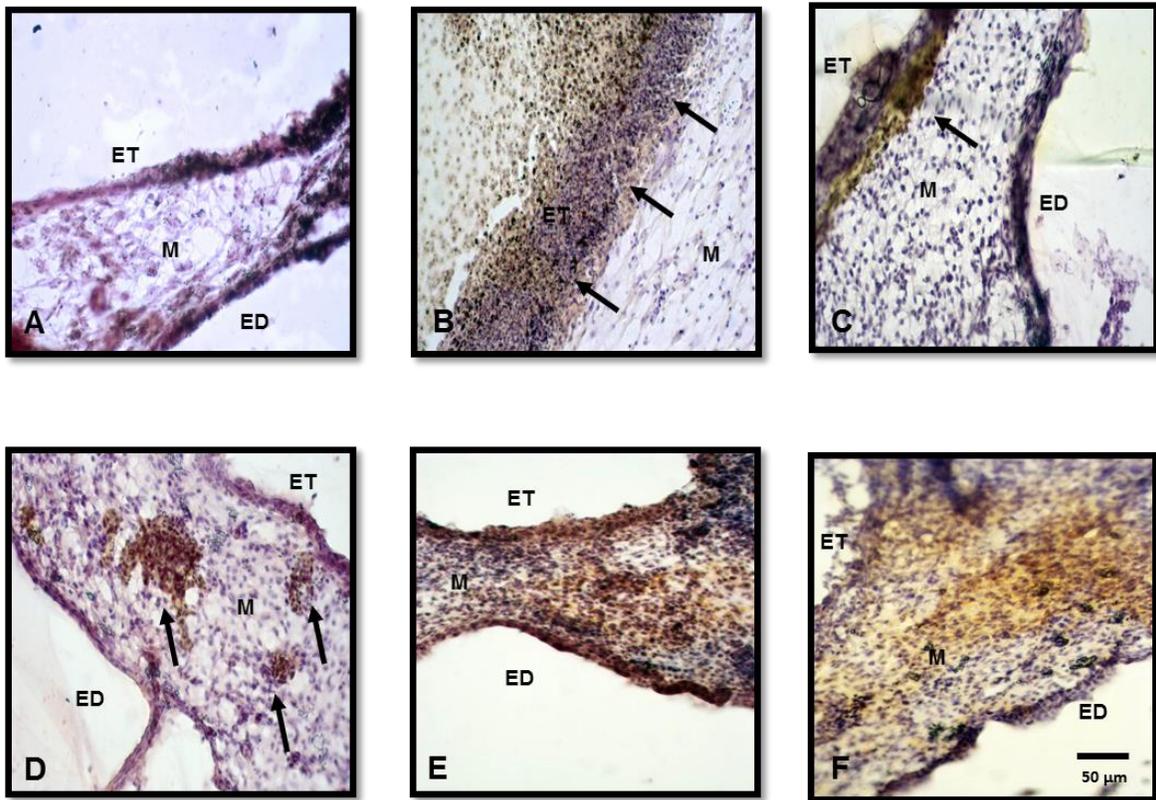


Fig. 18. Inmunolocalización de células A549 usando CK8 como marcador de células humanas. A) Muestra control en donde solo se observa tinción con hematoxilina. B) células no expuestas a TiO_2 NPs se observa tinción positiva por encima del ET, las flechas señalan a las células A549 atravesando ligeramente el ET. C) células A549 expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO_2 NPs, se puede observar la inmunolocalización por debajo del ET invadiendo el M señalado por la flecha, D) células A549 expuestas a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO_2 NPs, las flechas señalan pequeños cúmulos con señalización positiva formados dentro del M. E) células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO_2 NPs son inmunolocalizadas dentro del M abarcando una gran área del mismo. F) La inmunolocalización de las células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en forma de NB da una señalización positiva dentro del M. Se realizaron tres experimentos independientes. ET, ectodermo; M, mesodermo; ED, endodermo; TiO_2 NPs, nanopartículas de dióxido de titanio; NB, nanocintas.

7.7 Cuantificación de la inmunolocalización anti CK8 de las células A549

La cuantificación de la inmunolocalización de las células A549 anti CK8 se realizó de la misma forma que el análisis del ensayo de migración utilizando el programa Image J. Los resultados demostraron un incremento el área de la CAM teñida positivamente conforme aumentaba la concentración de las TiO_2 NPs en forma de NS y NB. Las concentraciones de 1 , 5 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 en forma de NS no tuvieron diferencia significativa lo cual indica que las células A549 expuestas a esta forma de NP tuvieron una tendencia a incrementar la invasión dentro de la CAM. Sin embargo, las células que fueron expuestas a TiO_2 en forma de NB tuvieron un incremento significativo en comparación con las diferentes concentraciones de TiO_2 NPs en forma de NS (Fig. 19).

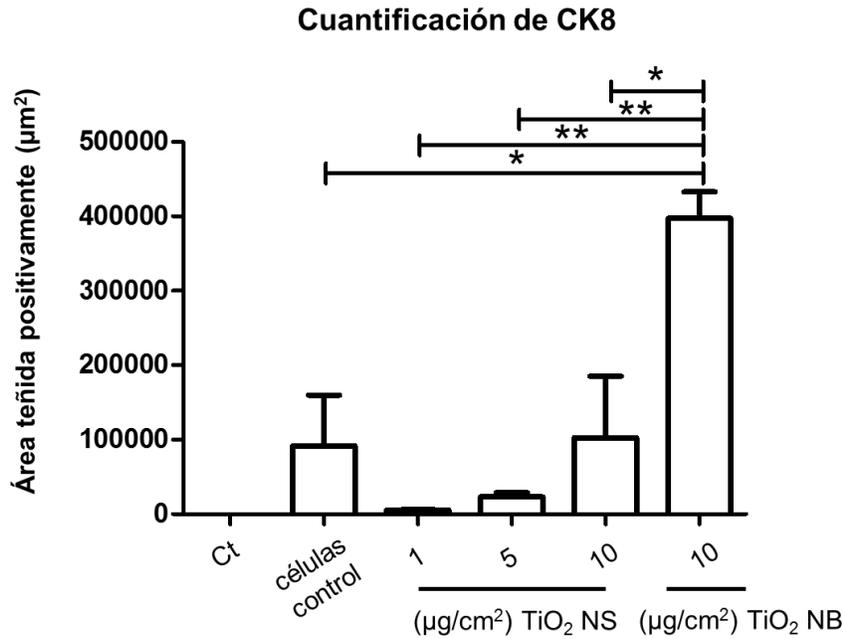


Fig. 19. Cuantificación de CK8. La cuantificación de la inmunolocalización con CK8 mostró una tendencia a incrementar el área invadida de la CAM cuando las células A549 fueron expuestas a concentraciones de 1, 5 y 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NS. Las células A549 que fueron expuestas a 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NB demostraron una mayor área invadida de la CAM teniendo un incremento significativo en comparación con las diferentes concentraciones de TiO₂ NPs en forma de NS. Se analizaron las imágenes de tres experimentos independientes. CK8, citoqueratina 8; CAM, membrana corioalantoide; TiO₂ NPs, nanopartículas de dióxido de titanio; NS, nanoesferas; NB, nanocintas. *p<0.5 (Media Error Estándar).

7.8 Capacidad proliferativa de las células A549 dentro de la CAM

Se realizaron IHC con diferentes marcadores de proliferación tales como Gli1 y Ki-67 para saber si las células A549 tienen la capacidad de proliferar dentro de la CAM. El primer marcador de proliferación utilizado en este ensayo fue Gli1, en donde la muestra control mostró la estructura normal de la CAM sin ninguna señalización positiva (Fig. 20A). Las células A549 que no fueron expuestas a TiO₂ NPs dieron una señalización positiva en el ET (Fig. 20B). Mientras que la muestra con células A549 expuestas a 1 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NS dio una señalización positiva por debajo del ET y en el M (Fig. 20C). Las muestras con células A549 expuestas a 5 µg/cm² (Fig. 20D) y 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NS (Fig. 20E) presentaron una señalización positiva dentro del M. Sin embargo, la concentración más alta de TiO₂ NPs en forma de NS la señalización positiva se presentó en una mayor extensión dentro del M casi alcanzando el ED. Las células A549 expuestas a 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NB dieron una señalización

positiva dentro del M abarcando gran parte del mismo, incluso alcanzando el ED (Fig. 20F).

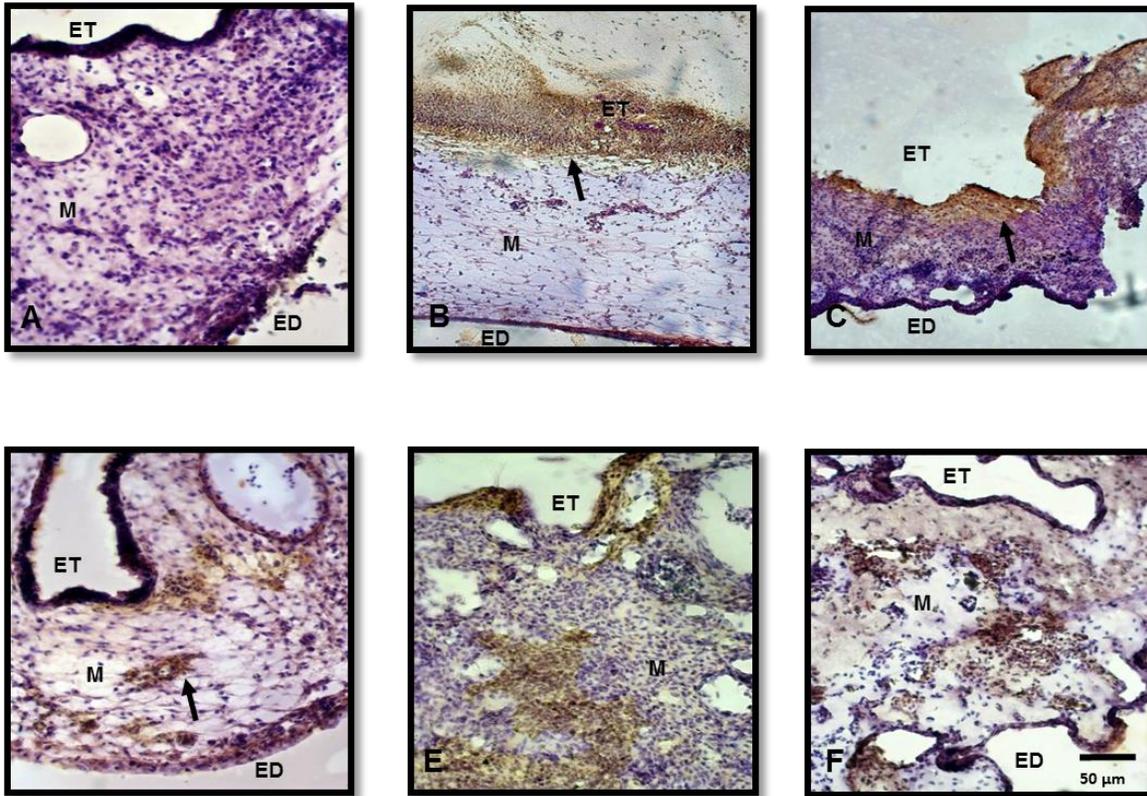


Fig. 20. Proliferación de las células A549 dentro de la CAM utilizando Gli1. A) Estructura normal de la CAM. B) células A549 no expuestas a TiO_2 NPs. La flecha señala a las células A549 en el ET. C) células expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs proliferando por debajo del ET, la flecha indica la ubicación de las células. D) células A549 expuestas a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ proliferando dentro del M formando pequeños cúmulos de células señalado por la flecha. E) señalización positiva de células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs proliferando dentro del M. F) células expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en donde se observa señalización positiva dentro del M hasta el ED. Fig. A, B, C y D células expuestas a TiO_2 NPs en forma de NS. Fig. F células expuestas a TiO_2 NPs en forma de NB.

El segundo marcador de proliferación utilizado fue Ki-67 en donde se observó de manera normal el ET, M y ED que forman la CAM (Fig. 21A). Las células A549 que no fueron expuestas a TiO_2 NPs dieron poca señalización positiva en el ET (Fig. 21B). Muestras con células A549 que fueron expuestas a 1 Y $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs tuvieron la capacidad de atravesar el ET y proliferar dentro del M ya que la señalización positiva se observó en esta segunda capa (Fig. 21C y D). Las muestras con células A549 que fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NS, dieron una señalización positiva de proliferación dentro del M abarcando gran parte del mismo en comparación con las concentraciones anteriores. La proliferación de las células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en

forma de NB se observó más diseminada dentro del M, incluso llegando al ED en comparación con la misma concentración de TiO_2 NPs en forma de NS (Fig. 21F).

Estos resultados con los diferentes tipos de marcadores de proliferación revelan que la concentración y la forma de las TiO_2 NPs influye en el proceso proliferativo de las células A549.

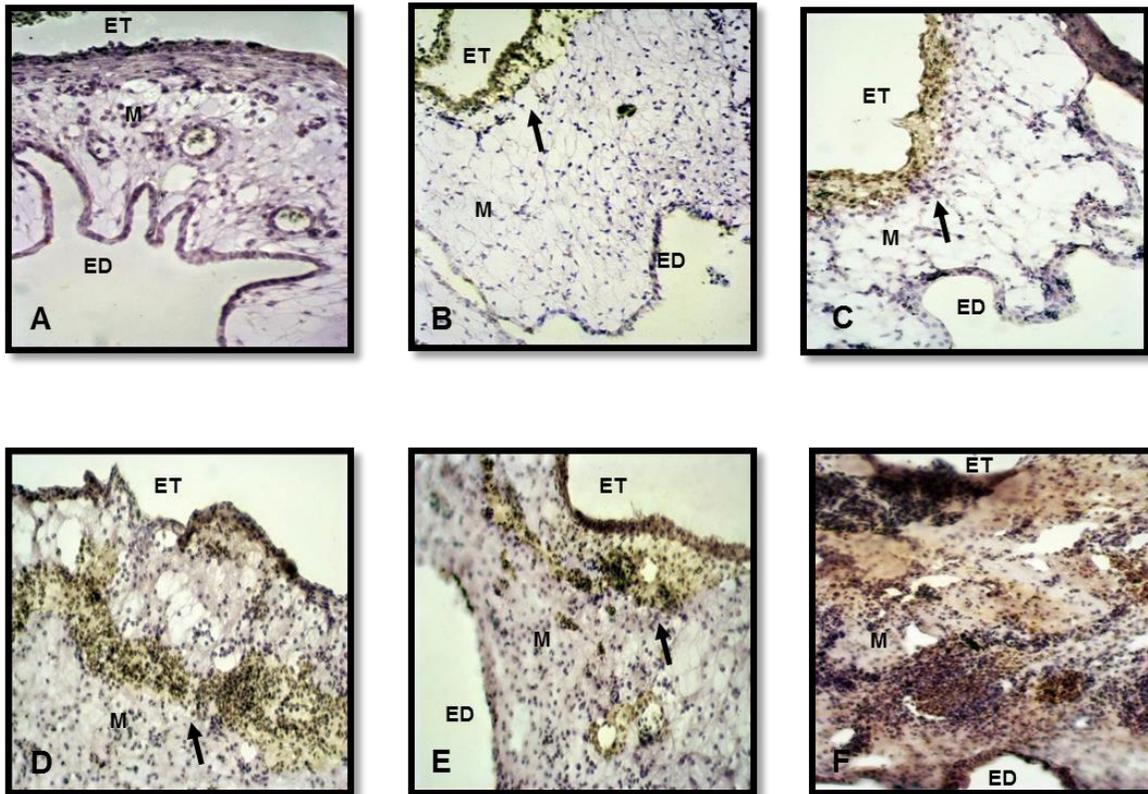


Fig. 21. Proliferación de las células A549 dentro de la CAM utilizando Ki-67. A) Estructura normal de la CAM. B) células A549 no expuestas a TiO_2 NPs, la flecha señala la proliferación por debajo del ET. C) células A549 expuestas a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NS, la flecha señala la proliferación dentro del M. D) células A549 expuestas a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NS, la flecha señala la proliferación de las células A549 a lo largo del M. E) células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NS, la flecha señala la proliferación de las células A549 dentro del M. F) células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NB, se observa tinción positiva en gran parte del M. Se realizaron tres experimentos independientes. CAM, membrana corioalantoide; TiO_2 NPs, nanopartículas de dióxido de titanio; ET, ectodermo; M, mesodermo; ED, endodermo; NS nanoesferas; NB nanocintas.

7.9 Cuantificación del marcador de proliferación Gli1

La cuantificación del área teñida positivamente con el marcador de proliferación Gli1 demostró que existe una tendencia de incrementar la proliferación de las células A549 expuestas a TiO_2 NPs. Los resultados demostraron que conforme las concentraciones de TiO_2 NPs en forma de NS aumentan, la proliferación de las células A549 es mayor dentro

de la CAM. Sin embargo, en la cuantificación del área teñida positivamente dentro de la CAM se observó que la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NB tuvo una tendencia a disminuir pero no presenta diferencias significativas (Fig. 22).

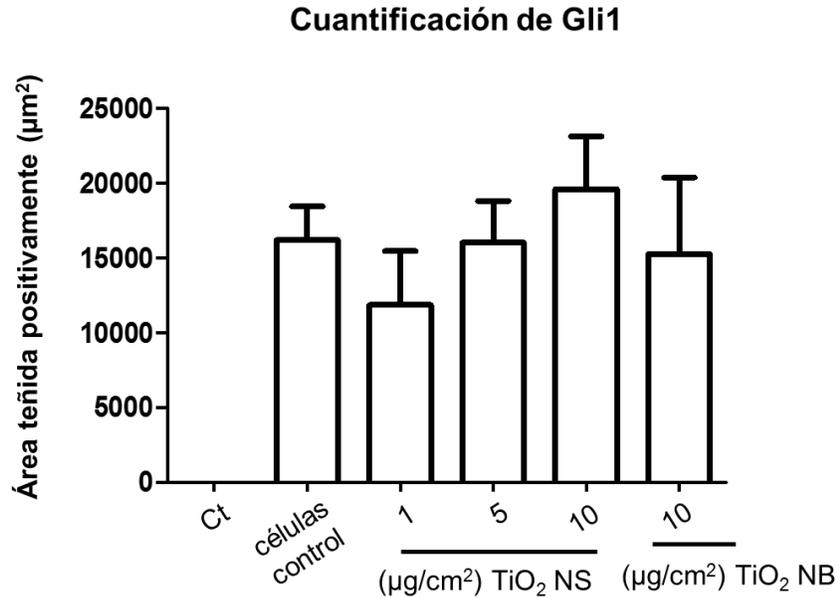


Fig. 22. Cuantificación de Gli1. La grafica demuestra la cuantificación de la proliferación de las células A549 dentro de la CAM una vez expuestas a diferentes concentraciones de TiO_2 NPs en forma de NS y NB. Se puede observar una tendencia a incrementar la proliferación cuando las células son expuestas a 1,5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NS. Además, se observa que hay una disminución de la proliferación cuando las células A549 son expuestas a TiO_2 NPs en forma de NB. * $p < 0.5$ (Media Error Estándar).

7.10 Cuantificación del marcador de proliferación Ki67

Los resultados de la cuantificación del área teñida positivamente con Ki67 demostraron que hay un incremento en la proliferación de las células A549 dentro de la CAM. Las diferentes concentraciones con las cuales fueron expuestas las células A549 tuvieron una tendencia a incrementar la proliferación de las células A549. Sin embargo, las concentraciones de 5 y $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NS y de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de TiO_2 NPs en forma de NB tuvieron diferencias significativas (Fig. 23).

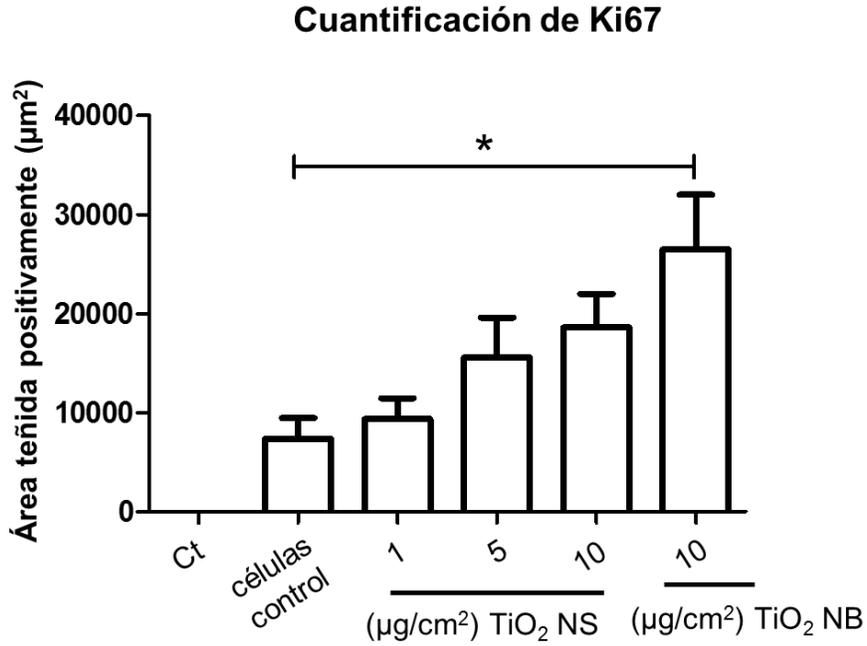


Fig. 23. Cuantificación de Ki-67. Los resultados demostraron que las diferentes concentraciones de TiO₂ NPs en forma de NS tuvieron una tendencia a incrementar la proliferación de las células A549. La concentración de 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NB fue diferentemente significativa en comparación con las células no expuestas a TiO₂ NPs.*p<0.5 (Media Error Estándar).

8. DISCUSIÓN

La nanotecnología sigue creciendo a un ritmo constante y rápido. En la última década se han identificado más de 1,300 productos comerciales habilitados por la nanotecnología disponibles a nivel mundial. Además, se ha estimado que estos productos aumentarán hasta 3,400 para el año 2020 (Olson *et al.*, 2012).

Los nanomateriales que están siendo utilizados en diferentes productos son producidos a un ritmo que supera la investigación y la regulación de los mismos. Estos dos últimos rubros son de gran importancia para poder prevenir posibles daños a la salud humana y al ambiente.

Se ha estimado un importante incremento en el número de trabajadores involucrados en la producción de los nanomateriales a 6 millones para el 2020. Este número creciente de trabajadores están potencialmente expuestos a los nanomateriales en laboratorios de investigación, empresas de creación, instalaciones de producción y operaciones en donde se procesan los nanomateriales (NIOSH, 2013).

Sin embargo, las propiedades de las NPs (por ejemplo el tamaño, área superficial, reactividad) que producen muchas mejoras en los productos pueden ser grandes amenazas para la salud.

Más del 50% de los productos de la nanotecnología incluyen NPs de plata, seguido de carbono (incluyendo fulerenos), de titanio (incluyendo TiO₂), de sílice, de zinc, (incluyendo ZnO) y oro (Olson *et al.*, 2012).

Las investigaciones acerca de las respuestas biológicas que ocasionan las TiO₂ NPs demuestran los efectos toxicológicos. Sin embargo, poco se ha estudiado si existe una relación entre las TiO₂ NPs y el proceso de invasión migración y proliferación de células de adenocarcinoma de pulmón, aunado a que la principal vía de exposición a las NPs es la vía inhalatoria, el cáncer de pulmón sigue siendo la principal causa de muerte en muchos países (GLOBOCAN, 2012). Por esta razón es de nuestro interés estudiar la relación entre las TiO₂ NPs y las respuestas que se puedan generar al estar expuestos a las TiO₂ NPs de manera ocupacional principalmente. Una de las formas en las cuales se pueden estudiar los efectos asociados a la exposición inhalatoria, es por medio de sistemas *in vitro*.

Para este estudio se utilizaron células de adenocarcinoma de pulmón de la línea A549 (neumocitos de tipo II). Las células A549 son células epiteliales que cubren aproximadamente el 7% de la superficie alveolar, mientras que componen el 16% de las células en el pulmón distal (Müller *et al.*, 2010).

Nuestro objetivo fue estudiar si las TiO₂ NPs promueven el proceso de migración, invasión y proliferación en células de adenocarcinoma de pulmón. Cabe señalar que las concentraciones utilizadas en este estudio son concentraciones bajas en comparación con otros estudios realizados.

Para poder estudiar el proceso de invasión de células cancerosas se han utilizado diferentes modelos, siendo el ensayo CAM uno de los mejores modelos y muy bien aceptado. El ensayo CAM es frecuentemente aplicado para estudios de angiogénesis (Ribatti, 2008), invasión (Lokman *et al.*, 2012) y metástasis (Cimpean *et al.*, 2008).

En este estudio se utilizó el ensayo CAM para observar el proceso de invasión y proliferación. Dicho ensayo ofrece diferentes ventajas para el estudio de estos procesos (Zijlstra *et al.*, 2002; Lokman *et al.*, 2012).

La CAM está compuesta de un epitelio multicapa; en la parte más externa se encuentra el ET, seguido del M y en la parte interna se localiza el ED. Además, la CAM contiene proteínas de la matriz extracelular tales como, fibronectina, laminina, colágeno de tipo I e integrina $\alpha_v\beta_3$ (Giannopoulou *et al.*, 2001). Por lo tanto, con la presencia de estas proteínas de la matriz extracelular se puede imitar el ambiente de las células cancerosas y así poder observar el proceso de invasión.

Los resultados mostraron que la exposición a TiO₂ NPs influye en el proceso de invasión y proliferación de las células A549. Para poder observar la invasión utilizando el modelo CAM las células A549 fueron inmunolocalizadas con CK8. La CK8 es una proteína del citoesqueleto, la cual es expresada en varias células epiteliales y células cancerosas (Moll *et al.*, 1982). Además, se ha reportado que la CK8 está altamente expresada en células A549 (Fukunaga *et al.*, 2002). Por esta razón se utilizó CK8 para la inmunolocalización de las células A549 dentro de la CAM.

Los resultados demostraron que las células A549 que fueron expuestas a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y formas de TiO₂ NPs adquirieron un fenotipo de mayor invasividad. Esto se pudo observar mediante las histologías de la CAM,

inmunolocalizando a las células A549. Se han realizado estudios para observar la proceso de invasión utilizando el modelo CAM (Lokman *et al.*, 2012), sin embargo, no existe suficiente evidencia en la cual estén implicadas las TiO₂ NPs en el proceso invasivo de células cancerosas.

Las células A549 que fueron expuestas a 10 µg/cm² de TiO₂ NPs en forma de NS y NB adquirieron una mayor capacidad para invadir la CAM. Las células A549 expuestas a bajas concentraciones (1 y 5 µg/cm²) de TiO₂ NPs en forma de NS tuvieron una menor capacidad de invasión. Además, las células A549 que no fueron expuestas a TiO₂ NPs no tuvieron la capacidad de invadir quedando por encima de las capas de la CAM.

Estos resultados sugieren que las TiO₂ NPs activan cascadas de señalización involucradas con el proceso de invasión. Se han realizado estudios en donde demuestran que las TiO₂ NPs producen daño mitocondrial y previenen la síntesis de ATP, lo cual está relacionado con la generación intracelular de ROS (Tang *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que las TiO₂ NPs producen altas concentraciones de ROS en células A549. Estas concentraciones fueron comparadas con la producción de ROS por NPs altamente tóxicas como los nanotubos de carbón y las emisiones de partículas de diésel, por sus siglas en inglés CNT y DEPs respectivamente (Müller *et al.*, 2010).

Una de las ROS generadas por la exposición a *in vivo* a TiO₂ NPes el H₂O₂ (Li *et al.*, 2013), y por otro lado, se ha demostrado que el H₂O₂ está relacionado en el proceso de migración e invasión en carcinoma de células escamosas de lengua (Liu *et al.*, 2012).

Estos estudios sugieren que las TiO₂ NPs estén activando cascadas de señalización por la producción de ROS en especial H₂O₂, el cual está involucrado con el proceso de invasión. Con base en estos estudios se puede proponer que con las células A549 que no fueron expuestas a TiO₂ NPs no presentaron gran capacidad de invadir la CAM. Esto debido a que no tuvieron un daño mitocondrial para producir gran cantidad de ROS entre ellas H₂O₂.

Uno de los objetivos particulares fue observar la proliferación de las células A549 dentro de la CAM de las células A549. Para poder observar este proceso se utilizó de igual manera el ensayo CAM y dos marcadores de proliferación (Gli1 y Ki-67).

Se utilizó a Gli1 como marcador de proliferación ya que se ha reportado que está involucrado en la proliferación de células de pulmón a través de la regulación de las

ciclinas D1 y D2 (Bermudez *et al.*, 2013). Por su parte, Ki-67 es una proteína que se expresa en todas las fases activas del ciclo celular. Además, se ha estudiado a Ki-67 y la relación que tiene con diferentes tipos de cáncer incluyendo de pulmón (Ahn *et al.*, 2014).

Los resultados con los diferentes marcadores de proliferación demuestran que las células A549 expuestas a diferentes concentraciones de TiO₂ NPs tuvieron la capacidad de proliferar dentro de la CAM. Sin embargo las células no expuestas a las TiO₂ NPs no tuvieron la misma capacidad de proliferación. Esto puede deberse a que las células A549 que no fueron expuestas a TiO₂ NPs no tuvieron la capacidad de invadir la CAM y poder proliferar en un ambiente favorable. Sin embargo, las células A549 expuestas a diferentes concentraciones de TiO₂ NPs si tuvieron la capacidad de penetrar la CAM y proliferar dentro de ella. Además, se ha reportado que en tejido de pulmón de ratones expuestos a TiO₂ NPs se ven sobreexpresados genes relacionados con la proliferación (Li *et al.*, 2013). Esta podría ser una de las razones por la cual se observa una mayor proliferación en las células que fueron expuestas a TiO₂ NPs en comparación con las no expuestas.

Otro objetivo fue evaluar la capacidad de migración de las células A549 cuando son expuestas a TiO₂ NPs. Para poder observar este fenómeno se utilizó el ensayo de migración.

Debido a que los resultados del ensayo CAM mostraron que a una mayor concentración de TiO₂ NPs en sus diferentes formas mayor fue la invasión de las células A549, se esperaba una capacidad de migración similar a los de invasión. Esto quiere decir que a mayor concentración de TiO₂ NPs, mayor sería la capacidad de migración por parte de las células A549.

Sin embargo los resultados demostraron que las células A549 expuestas a TiO₂ NPs durante 24 y 48 h la migración tuvo una tendencia a aumentar. Sin embargo, la migración disminuyo a altas concentraciones. La exposición de las células A549 a TiO₂ NPs durante 7 días aumento significativamente con la mayor concentración de NS. El efecto que tuvo esta exposición de 7 días con NB fue lo contrario ya que la migración disminuyo significativamente.

Este fenómeno de aumento y decremento en la migración con las diferentes concentraciones de TiO₂ NPs puede deberse a la interacción de las TiO₂ NPs con las proteínas del medio en el cual se siembran las células A549. Se ha reportado que todas las NPs de óxido de metal absorben proteínas y Ca²⁺, en especial el TiO₂, en donde

evalúan la influencia del agotamiento de los componentes del medio de cultivo por la absorción de NPs de óxido de metal sobre la viabilidad celular y la proliferación. Utilizando células A549 demostraron que las TiO₂ NPs absorben las proteínas del medio y el Ca²⁺ induciendo citotoxicidad. Debido a esto La conclusión la habilidad de absorción de las NPs de óxido de metal es un factor importante para la estimulación de la citotoxicidad *in vitro* (Horie *et al.*, 2009). Esta puede ser una razón por la cual las células A549 expuestas a TiO₂ NPs presentaron una menor capacidad de migración cuando fueron expuestas a las más altas concentraciones.

El ensayo de migración ha sido muy utilizado para observar la migración de diferentes tipos celulares. Sin embargo, en este estudio una variante fue la exposición a TiO₂ NPs el cual se ha demostrado que absorbe las proteínas del medio produciendo citotoxicidad a las células. Por lo tanto, los resultados sugieren que el ensayo de migración de manera *in vitro* presenta una desventaja cuando se utilizan TiO₂ NPs.

Las NPs pueden existir en forma de NPs individuales o como aglomerados. Por lo tanto, las respuestas toxicológicas de las TiO₂ NPs están relacionadas con el tamaño y la forma de las mismas. Sin embargo, la caracterización de las NPs en las pruebas biológicas es esencial, esto debido a que los posibles cambios fisicoquímicos (por ejemplo, el estado de aglomeración y la variación de la carga superficial) puedan ocurrir en la solución donde se suspendan.

En este estudio se utilizaron dos tipos de TiO₂ NPs, en forma de NS y en forma de NB, las cuales fueron analizadas por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Los resultados obtenidos de los dos tipos de TiO₂ NPs fueron que las TiO₂ NPs en forma de NS tuvieron un tamaño hidrodinámico de 588 nm. Por su parte las TiO₂ NPs en forma de NB tuvieron un tamaño hidrodinámico de 454 nm. Además, presentaron un potencial zeta de -20.9 para las NS y -27.4 para los NB. Se ha reportado que este estado de aglomeración se debe a la atracción de las TiO₂ NPs debido a las fuerzas de van der Waals (Jiang *et al.*, 2009). Esto sugiere que debido a estas fuerzas las TiO₂ NPs en cualquiera de sus formas (NS y NB) puede formar aglomerados.

El tamaño hidrodinámico y el potencial zeta de las NPs, son parámetros importantes ya que pueden tener un efecto dramático en la forma en que un organismo responde a la exposición. Como se ha reportado, el tamaño de las NPs es la principal característica que domina las interacciones con los sistemas biológicos, incluyendo la adsorción,

distribución, metabolismo y excreción (Renwick *et al.*, 2001; Borm *et al.*, 2006). Debido a esta característica las diferentes formas y tamaños de las NPs pueden generar diferentes respuestas biológicas citotóxicas, genotóxicas y la generación de ROS (Barillet *et al.*, 2010).

Para que se puedan tener respuestas biológicas inducidas por las TiO₂ NPs, estas deben de ser principalmente internalizadas por las células. Las células A549 que fueron teñidas mediante H&E mostraron principalmente su morfología. Además, en estos resultados también se pueden observar a las TiO₂ NPs dentro de las células A549 en la periferia del núcleo. Se ha reportado que las TiO₂ NPs forman aglomerados los cuales son internalizados por las células A549 mediante fagocitosis (Singh *et al.*, 2007). Por lo tanto, las imágenes obtenidas sugieren que existe una internalización de las TiO₂ NPs utilizadas en este estudio.

Las diferentes vías de endocitosis son las encargadas de la internalización de partículas dependiendo de su tamaño. Los resultados del análisis de las TiO₂ NPs en forma de NS mostraron que pueden formar aglomerados de 588 nm y para las TiO₂ NPs en forma de NB de 454 nm. Además, se ha demostrado que las NPs con un tamaño de 50-200 nm pueden ser internalizadas por la endocitosis mediada por clatrina, mientras que las partículas de 200-1000 nm son internalizadas por la endocitosis mediada por caveolas o por macropinositosis (Rejman *et al.*, 2004). Consecuentemente, se puede proponer que en este estudio la forma de internalización de las TiO₂ NPs en forma de NS y NB fue por endocitosis mediada por caveolas o macropinositosis. Esto debido al tamaño hidrodinámico que se obtuvo de las diferentes formas de NPs.

Es de gran importancia estudiar los efectos que tienen las diferentes formas de NPs ya que esta característica determina la toxicidad en las células (Hamilton *et al.*, 2009)

En este trabajo se estudió la influencia que tienen las TiO₂ NPs de dos diferentes formas, NS y NB, con el proceso de invasión. Esto fue posible gracias a que se utilizó el ensayo CAM el cual presenta diversas ventajas para este estudio como se ha reportado (Lokman *et al.*, 2012). Además, con este modelo se puede imitar un microambiente similar al de cualquier célula cancerosa que realice el proceso de invasión. Esto debido a que la CAM tiene proteínas similares al de la matriz extracelular.

Por otra parte, también se presentaron desventajas en este estudio. Una de ellas fue el ensayo de migración en donde los resultados fueron lo contrario a lo que se esperaba.

Esto debido a la interacción de las TiO₂ NPs con las proteínas del medio en donde se cultivaban las células A549.

Sin embargo, estos resultados muestran la importancia que tiene el estudiar las respuestas biológicas generadas por las TiO₂ NPs. Como se mencionó anteriormente, el tamaño y la forma de las TiO₂ NPs son de gran importancia, ya que este tipo de NPs están siendo utilizadas en diversos productos de uso común.

Este estudio proporciona conocimientos sobre la influencia de la TiO₂ NPs y el proceso de invasión, el cual es uno de los principales pasos para el proceso de la metástasis. La metástasis es la responsable de la mayor mortalidad en el cáncer de pulmón. Además es la principal causa de muerte asociada al cáncer en el mundo (Siegel *et al.*, 2013).

Esta pequeña aportación sobre el estudio de las respuestas biológicas que tienen las TiO₂ NPs puede ayudar a que exista una regularización adecuada de los nanomateriales en donde se utilizan las TiO₂ NPs. Como se mencionó anteriormente el TiO₂ ha sido clasificado como posible carcinógeno para humanos, esto debido a la escasa evidencia de estudios en humanos. Por esta razón se deben de seguir realizando estudios acerca de la influencia que tienen las TiO₂ NPs para poder entender las respuestas biológicas que pueden generar.

De esta manera se podrá tener una regularización de los límites de exposición a las TiO₂ NPs y una correcta gestión de los nanomateriales en donde son empleadas. De ser esto posible se podrán prevenir los impactos que se puedan generar en la salud humana.

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados se concluye que las células A549 expuestas a TiO_2 NS a concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ tuvieron poca capacidad de invadir la CAM.

Las células A549 que fueron expuestas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en forma de NS y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en forma de NB tuvieron mayor capacidad de ya que lograron atravesar el ET, invadir el M e incluso llegar a la parte más interna de la CAM, el ED.

Las células A549 que fueron expuestas a diferentes concentraciones de TiO_2 NPs en forma de NS y NB tuvieron una mayor capacidad de proliferar dentro de la CAM en comparación con las células que no fueron expuestas a NPs.

La migración de las células A549 tuvo una tendencia a aumentar cuando estas fueros expuestas a bajas concentraciones de TiO_2 NPs en forma de NS. Sin embrago, cuando las células A549 fueron expuestas a las concentraciones más altas de NS y NB la migración disminuyó.

Con base en estas evidencias se concluye también que las TiO_2 NPs están involucradas en el proceso de invasión y de proliferación. Esto sugiere que células expuestas a TiO_2 NPs en forma de NS y NB adquieren un fenotipo de mayor invasividad y esto puede representar la habilidad de las células a promover el proceso de intravasación, extravasación y metástasis.

10. LITERATURA CITADA

- Ahn HK, Jung M, Ha SY, Lee JI, Park I, Kim YS, Hong J, Sym SJ, Park J, Shin DB, Lee JH, Cho EK (2014) Clinical significance of Ki-67 and p53 expression in curatively resected non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. DOI 10.1007/s13277-014-1760-0.
- Bailey CM, Kulesa PM (2014) Dynamic Interactions between Cancer Cells and the Embryonic Microenvironment Regulate Cell Invasion and Reveal EphB6 as a Metastasis Suppressor. *Mol Cancer Res*. 12(9):1303-13.
- Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Mayne-L'Hermite M, Reynaud C, Cassio D, Gouget B, Carrière M (2010) Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study. *J Nanopart Res*. 12:61-73.
- Bermudez O, Hennen E, Koch I, Lindner M, Eickelberg O (2013) Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. *PLoS One*. 7;8(5):e63226.
- Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K et al (2006) The potential risks of nanomaterial: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* 3:11-46.
- Bouhaik IS, Leroy P, Ollivier P, Azaroual M, Mercury L (2013) Influence of surface conductivity on the apparent zeta potential of TiO₂ nanoparticles: application to the modeling of their aggregation kinetics. *J Colloid Interface Sci*. 15;406:75-85.
- Carré G, Hamon E, Ennahar S, Estner M, Lett MC, Horvatovich P, Gies JP, Keller V, Keller N, Andre P (2014) TiO₂ photocatalysis damages lipids and proteins in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol*. 80(8):2573-81.
- Chakravarthi BV, Pathi SS, Goswami MT, Ciešlik M, Zheng H, Nallasivam S, Arekapudi SR, Jing X, Siddiqui J, Athanikar J, Carskadon SL, Lonigro RJ, Kunju LP, Chinnaiyan AM, Palanisamy N, Varambally S (2014) The miR-124-Prolyl Hydroxylase P4HA1-MMP1 axis plays a critical role in prostate cancer progression. *Oncotarget*. 30;5(16):6654-69.
- Chen X, Mao SS (2007) Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem Rev*. 107(7):2891-959.
- Cimpean AM, Ribatti D, Raica M (2008) The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis*. 11(4):311-9.
- Desai S, Laskar S, Pandey BN (2013) Autocrine IL-8 and VEGF mediate epithelial-mesenchymal transition and invasiveness via p38/JNK-ATF-2 signalling in A549 lung cancer cells. *Cell Signal*. 25(9):1780-91.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency) (2010) State of the science literature review: nano titanium dioxide environmental matters. EPA/600/R-10/089.

- Fukunaga Y, Bando S, Fujita J, Yang Y, Ueda Y, Hojo S, Dohmoto K, Tojo Y, Takahara J, Ishida T (2002) Expression of cytokeratin 8 in lung cancer cell lines and measurement of serum cytokeratin 8 in lung cancer patients. *Lung Cancer*. 38(1):31-8.
- Gheshlaghi ZN, Riazi GH, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R (2008) Toxicity and interactions of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim Biophys Sin*. 40(9):777-82.
- Giannopoulou E, Katsoris P, HatziaPOSTOLOU M, Kardamakis D, Kotsaki E, PolyTarchou C, Parthymou A, Papaioannou S, Papadimitriou E (2001) X-rays modulate extracellular matrix in vivo. *Int J Cancer*. 1;94(5):690-8.
- GLOBOCAN (2012). <http://www.iarc.fr/>
- Hamilton RF, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M, Holian A. (2009) Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part Fibre Toxicol*. 6:35.
- Horie M, Nishio K, Fujita K, Endoh S, Miyauchi A, Saito Y, Iwahashi H, Yamamoto K, Murayama H, Nakano H, Nanashima N, Niki E, Yoshida Y (2009) Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chem Res Toxicol*. 16;22(3):543-53.
- Hou Y1, Cai K, Li J, Chen X, Lai M, Hu Y, Luo Z, Ding X, Xu D (2013) Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*. 8:3619-30.
- IARC (2010). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: carbon black, titanium dioxide, and talc. Vol. 93. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
- Janer G, Mas del Molino E, Fernández-Rosas E, Fernández A, Vázquez-Campos S (2014) Cell uptake and oral absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol Lett*. 15;228(2):103-10.
- Jiang J, Oberdörster G, Biswas P (2009) Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res*. 11:77-89.
- Kaegi R, Ulrich A, Sinnet B, Vonbank R, Wichser A, Zuleeg S, Simmler H, Brunner S, Vonmont H, Burkhardt M, Boller M. (2008) Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ Pollut*. 156(2):233-9.
- Li B, Ze Y, Sun Q, Zhang T, Sang X, Cui Y, Wang X, Gui S, Tan D, Zhu M, Zhao X, Sheng L, Wang L, Hong F, Tang M (2013) Molecular mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced pulmonary injury in mice. *PLoS One*. 8(2): e55563.
- Liu M, Scanlon CS, Banerjee R, Russo N, Inglehart RC, Willis AL, Weiss SJ, D'Silva NJ. The Histone Methyltransferase EZH2 Mediates Tumor Progression on the Chick Chorioallantoic Membrane Assay, a Novel Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Transl Oncol*. 1;6(3):273-81.
- Liu W, Su P, Chen S, Wang N, Ma Y, Liu Y, Wang J, Zhang Z, Li H, Webster TJ (2014) Synthesis of TiO₂ nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. *Nanoscale*. 10;6(15):9050-62.

- Liu Z, Li S, Cai Y, Wang A, He Q, Zheng C, Zhao T, Ding X, Zhou X (2012) Manganese superoxide dismutase induces migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via H₂O₂-dependent Snail signaling. *Free Radic Biol Med.* 1;53(1):44-50.
- Lokman NA, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK. (2012) Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an *In Vivo* Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(8):9959-70.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31(1):11-24.
- Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K. (2007) The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med.*, 64(9):609-15.
- Morimoto Y, Oyabu T, Ogami A, Myojo T, Kuroda E, Hirohashi M, Shimada M, Lenggoro W, Okuyama K, Tanaka I (2011) Investigation of gene expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA in rat lung in inhaled nickel oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Ind Health.* 49(3):344-52.
- Moschini E, Gualtieri M, Colombo M, Fascio U, Camatini M, Mantecca P (2013) The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO₂ in human alveolar epithelial cells. *Toxicol Lett.* 24;222(2):102-16.
- Müller L, Riediker M, Wick P, Mohr M, Gehr P, Rothen-Rutishauser B (2010) Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *J R Soc Interface.* 6;7 Suppl 1:S27-40.
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health) (2013) Current strategies for engineering controls in nanomaterial production and downstream handling processes. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) Publication No. 2014-102.
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health) (2011) Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Current Intelligence Bulletin 63.
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health) (2013) Protecting the nanotechnology workforce: NIOSH nanotechnology research and guidance strategic plan, 2013–2016. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) Publication 2014-106.
- Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML (2014) The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis.* In press.
- Olson MS, Gurian PL (2012) Risk assessment strategies as nanomaterials transition into commercial applications. *J Nanopart Res.* 14:786.
- Paul R, Bautista L, De la Varga M, Botet JM, Casals E, Puentes V, Marsal F (2010). Nano-cotton fabrics with high ultraviolet protection. *Textile Research Journal.* 80(5), 454-462.

- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res.* 14:1109
- Ponce A. (2013) Nanomaterials and workplace health & safety What are the issues for workers? European Trade Union Institute. ISBN 978-2-87452-288-8.
- Porter DW, Wu N, Hubbs A, Mercer R, Funk K, Meng F, Li J, Wolfarth M, Battelli L, Friend S, Andrew M, Hamilton R, Sriram K, Yang F, Castranova V, Holian A. Differential mouse pulmonary dose-and time course-responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts. *Toxicol Sci.* 131(1):179-93.
- RCEP (Royal Commission on Environmental Pollution) (2008) Novel materials in the environment: The case of nanotechnology. Disponible en www.rcep.org.uk
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 1;377:159-69.
- Renwick LC, Donaldson K, Clouter A (2001) Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 172:119-127.
- Ribatti D (2008) Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 270:181-224.
- Roco MC (2011) The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J Nanopart Res.* 13:427-45.
- Rosas C, Sinning M, Ferreira A, Fuenzalida M, Lemus D. (2014) Celecoxib decreases growth and angiogenesis and promotes apoptosis in a tumor cell line resistant to chemotherapy. *Biol Res.*16;47(1):27.
- Sanchez VC, Pietruska JR, Miselis NR, Hurt RH, Kane AB (2009) Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we learned from asbestos?. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 1(5):511-29.
- Sasipriya K, Manivasakan P, Yuvakkumar R, Dhineshbabu N R, Prabu P, Rajendran V (2014) Enhancement of UV property on cotton fabric by TiO₂ nanorods. *Synthesis and reactivity in inorganic, metal-organic, and nano-metal chemistry.* 44:5, 748-758.
- Shen W, Zhu J, Yu Z, Xue Qungyu (2008) Effect of hypoxia on migration, invasion and adhesion to endothelium of human pulmonary adenocarcinoma A549 cells. *Chinese-German J Clin Oncol.* 7: 509-514.
- Simkó M, Mattsson MO (2010) Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review. *Part Fibre Toxicol.* 21; 7:42.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 15; 10:15.
- Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, Berlo D, Höhr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, P J.A. Borm, Roel P.F (2007) Schins. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 222; (2): 141-151.

- Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S (2011) Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol.* 45(4):227-47.
- Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ (2001) Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 24(2):108-15.
- Tang Y, Wang F, Jin C, Liang H, Zhong X, Yang Y (2013) Mitochondrial injury induced by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36; (1): 66-72.
- Tao YR, Wu XC, Xiong WW (2014) Flexible Visible-Light Photodetectors with Broad Photoresponse Based on ZrS₃ Nanobelt Films. *Small.* In press.
- Tedja R, Marquis C, Lim M, Amal R (2011) Biological impacts of TiO₂ on human lung cell lines A549 and H1299: particle size distribution effects. *J Nanopart Res.* 13:3801-3813.
- Tsai JY, Lee MJ, Dah-Tsyr Chang M, Huang H (2014) The effect of catalase on migration and invasion of lung cancer cells by regulating the activities of cathepsin S, L, and K. *Exp Cell Res.* 15;323(1):28-40.
- Voigt W (2005) Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med.* 110:39-48.
- Wang X, Li Z, Shi J, Yu Y (2014) One-Dimensional Titanium Dioxide Nanomaterials: Nanowires, Nanorods, and Nanobelts. *Chem Rev.* 10.1021/cr400633s
- Wang X, Li J, Li Q, Chen B, Song G, Zhang W, Shi L, Zou B, Liu R (2014) Yellow-light generation and engineering in zinc-doped cadmium sulfide nanobelts with low-threshold two-photon excitation. *Nanotechnology.* 25(32):325702
- Windler L, Lorenz C, von Goetz N, Hungerbühler K, Amberg M, Heuberger M, Nowack B (2012) Release of titanium dioxide from textiles during washing. *Environ Sci Technol.* 7;46(15):8181-8.
- Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC (2011) The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer.* 24; 11(7):512-22.
- Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND, Quigley JP (2002) A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1; 62(23):7083-92.