



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

CAMPUS ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Evaluación de los efectos de las nanopartículas metálicas de TiO₂, CeO₂ y
Ag sobre el balance proteostático, estrés oxidante y metabolismo en un
modelo celular de queratinocitos humanos”**

TESIS

Que presenta

M.C. VERÓNICA MONTESINOS CRUZ

**Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA

Directores de tesis:

Dra. Andrea Marisa Gabriela De Vizcaya Ruiz

Dr. Rodrigo Franco Cruz

Ciudad de México

Marzo, 2020

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y en la Universidad de Nebraska-Lincoln; con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) donativo PEI-2015 #221791, el apoyo parcial de National Institutes of Health Grant P20RR17675, y la oficina de la Universidad de Nebraska-Lincoln (Rodrigo Franco). La M.C. Verónica Montesinos Cruz con el número de becario 408141 recibió la Beca de Movilidad en el Extranjero 2018- 2019 (291250) por parte del Conacyt.

RESUMEN

Las nanopartículas derivadas de metales (Mt-NPs) han sido utilizadas cada vez más en la cosmética/dermatología por sus propiedades de protección ultravioleta (dióxido de titanio [TiO₂]), antioxidantes (dióxido de cerio [CeO₂]) y/o antibacteriales (plata [Ag]), debido a sus características fisicoquímicas intrínsecas. Algunas estimaciones sugieren que $\geq 10\%$ del contenido de los productos para la piel se basan en nano-formulaciones, sin embargo, los efectos dermatotóxicos de las Mt-NPs aún no están claros. Varios reportes han evaluado la toxicidad de Mt-NPs en queratinocitos, y en la ausencia de toxicidad (muerte celular) estas Mt-NPs han sido consideradas seguras para el uso de aplicaciones cosméticas. Sin embargo, existe poca comprensión de los mecanismos homeostáticos involucrados en la sobrevivencia de los queratinocitos cuando son expuestos a concentraciones sub-tóxicas de NPs, un tema abordado en este estudio. Queratinocitos humanos (HaCaT) fueron expuestos de manera subaguda (48-144 horas) a concentraciones sub-tóxicas ($\leq 30 \mu\text{g/ml}$) de NPs de rutilo (r) TiO₂ (cilíndrico), CeO₂ (cúbico) y Ag (esférico), con tamaños en seco e hidrodinámicos de < 40 y < 100 nm, y una pureza $> 98\%$. Evaluamos de manera indirecta la captura de las Mt-NPs por cambios en la dispersión lateral de luz (SSC) por citometría de flujo como indicador de la granularidad. Mientras que, las NPs de rTiO₂ y CeO₂ mostraron cambios profundos en SSC cuando fueron comparadas con las NPs de Ag, la cinética (tiempo y dosis-respuesta) fue similar, sugiriendo que las tres Mt-NPs fueron similarmente capturadas por las células. Las NPs de rTiO₂ y CeO₂, pero no las de Ag incrementaron la autofagia. Por el contrario, no se indujo aumento en los niveles basales de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por la exposición a ninguna de las Mt-NPs probadas. Se observaron agregados de las NPs de Ag que mostraron aumentos en la fluorescencia far-red (≥ 740 nm emisión), y que han sido atribuidos a su unión con moléculas tiol como el glutatión (GSH). Por consiguiente, la inhibición de la síntesis del GSH sensibilizó a los queratinocitos a las NPs de Ag, pero el deterioro del reciclaje del GSH oxidado no tuvo efecto sobre la toxicidad de estas. Estos resultados sugieren que la homeostasis del GSH, y su unión/eliminación de las NPs de Ag, pero no la eliminación de ROS es esencial para la sobrevivencia de los queratinocitos después de la exposición a estas NPs. A niveles sub-tóxicos de NPs rTiO₂ y Ag, pero no de CeO₂, se comprometió el flujo metabólico (glucólisis y respiración), sin embargo, los niveles de ATP no se alteraron. Finalmente, observamos que la exposición a las Mt-NPs sensibilizó a los queratinocitos a la exposición a otros xenobióticos diferentes a rayos UV (arsenito [NaAsO₂] y paraquat). Nuestros resultados demuestran la contribución diferencial de la autofagia y la homeostasis del GSH a la sobrevivencia de los queratinocitos humanos expuestos a concentraciones sub-tóxicas de Mt-NPs y resaltan el incremento de la susceptibilidad de los queratinocitos expuestos a las Mt-NPs a la exposición a xenobióticos.

ABSTRACT

Metal-derived nanoparticles (Mt-NPs) have been increasingly used in cosmetology/dermatology due to their ultraviolet shielding (titanium dioxide [TiO₂]), antioxidant (cerium dioxide [CeO₂]), and/or biocidal (silver [Ag]) properties, given by their intrinsic physicochemical characteristics. Estimates suggest that ≥10% of skin products content is based on nanoformulations, but the dermatotoxic effects of Mt-NPs are still unclear. A number of reports have evaluated the toxicity of Mt-NPs in keratinocytes and in the absence of overt toxicity (i.e. cell death), Mt-NPs have been largely considered safe for their use in cosmetic applications. However, there is little understanding in regard to the homeostatic mechanisms involved in the survival of keratinocytes when exposed to subtoxic concentrations of NPs, an issue that we aimed to address in this study. Human keratinocytes (HaCaT) were exposed sub- acutely (48-144 hours) to subtoxic concentrations (≤30 µg/ml) of rutile (r) TiO₂ (cylindrical), CeO₂ (cubic) and Ag (spherical) NPs with a median core / hydrodynamic size of < 40 / < 100 nm and >98% purity. Mt- NP uptake was indirectly quantified by changes in the light side scatter (SSC) of cells assessed by flow cytometry. While rTiO₂ and CeO₂ NPs exerted more profound changes in the SSC when compared to Ag NPs, the kinetics (time and dose-response) were similar suggesting that the three Mt-NPs were similarly uptaken by cells. rTiO₂ and CeO₂ NPs, but not Ag NPs increased autophagy. Inhibition of autophagy flux and autophagosome elongation prompted rTiO₂ and CeO₂ NPs toxicity. In contrast, no increase in the steady-state levels of reactive oxygen species (ROS) was induced by exposure to any of the Mt-NPs tested. Interestingly, Ag NPs aggregates observed an increased far-red autofluorescence (≥740 nm em), which has been ascribed to their binding to thiols molecules such as glutathione (GSH). Accordingly, inhibition of GSH synthesis sensitized keratinocytes to Ag NPs, but the impairment of oxidized GSH recycling had no effect on Ag NP toxicity. These results suggest that GSH homeostasis, and their direct binding/scavenging of Ag NPs, but not ROS scavenging, is essential for keratinocyte survival upon exposure to Ag NP. At subtoxic levels, rTiO₂ and Ag, but not CeO₂ NPs, compromised metabolic flux (glycolysis and respiration), but ATP levels were unaltered. Finally, we observed that exposure to Mt-NPs sensitized keratinocytes to non-UV xenobiotic exposure (arsenite [NaAsO₂] and paraquat). Overall, our results demonstrate the differential contribution of autophagy and GSH homeostasis to the survival of human keratinocytes exposed to subtoxic concentrations of Mt-NPs and highlight the increased susceptibility of keratinocytes exposed to Mt-NPs to xenobiotic exposure.

***Este trabajo está dedicado a mi Familia y a Rodrigo Franco Cruz.
Gracias por el tiempo que invirtieron en mí***

A mi mamá y hermana

Gracias por apoyarme mientras hacía lo que me apasiona, por estar incondicionalmente conmigo, por ser mis mejores amigas.

Gracias por ser siempre la mejor opción para refugiarme, por apoyarme cuando más lo necesitaba, por darme los mejores consejos. Gracias por entender todo el tiempo que dedique a este trabajo. Gracias por siempre estar a mi lado.

Dedicatoria

A mi mentor

Este trabajo fue un esfuerzo de meses en los que deposité mi confianza en el Dr.
Rodrigo Franco Cruz.

Quiero agradecerle infinitamente todo lo que hizo por mí. Gracias por iniciar esta cadena de eventos que me provocaron tanta gratitud.

Gracias por todas las veces en que me dejó verlo preparar su café. En las que se tomó el tiempo para preguntarme y corregirme. En las que me enseñó cada técnica y cada procedimiento. En las que alzó sus mangas y se levantó de su silla para enseñarme como se deben de hacer las cosas. Gracias por hacer suyo el proyecto y gastar tiempo en él.

Gracias por enseñarme el valor de la humildad, respeto, profesionalismo y por supuesto, sentido del humor. Por tener tanta paciencia y por impulsarme a continuar haciendo lo que me gusta. Por ordenar mis pensamientos y enseñarme que a donde quiera que vaya, estaré construyendo mi mundo con cimientos sólidos aprendidos de usted.

Gracias por ser el mejor ejemplo para seguir. Gracias por crear el mejor ambiente para trabajar en su laboratorio y por incluirme en él. Gracias por enseñarme que las cosas son tan simples como nosotros queramos verlas. Por aceptarme como su estudiante y sacar lo mejor para mí. Gracias por darme una educación íntegra y por confiar en mí.

Gracias por abrirme sus puertas Doctor Rodrigo.

Dedicatoria

Agradecimientos

Al CINVESTAV-IPN a través del Departamento de Toxicología, y del laboratorio 26 por proveerme las facilidades para lograr mis estudios de Doctorado.

A mis directores de tesis, Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz y Dr. Rodrigo Franco Cruz, gracias por su tiempo y apoyo para terminar mi proyecto de Doctorado.

Al *Department of Veterinary and Biomedical Sciences* y el *Redox Biology Center* de la Universidad de Nebraska, Lincoln, Estados Unidos, por proveerme todas las facilidades y apoyo para lograr mis objetivos de estancia Doctoral. Además de incluirme y hacerme sentir parte de su comunidad.

A mis asesores de tesis los Dres. Luz María Del Razo Jiménez, María Betzabet Quintanilla Vega, Claudia García Cuéllar y Federico Castro Muñoz Ledo, gracias por todo su tiempo para lograr este trabajo. A los Dres. Daniel Bahena Uribe y Jorge Roque De La Puente, por su apoyo en el área de Microscopia electrónica LANE-CINVESTAV.

Al Dr. You Zhou y Jaydeep Kolape del *Morrison Microscopy*, por su disponibilidad para trabajar en el área. A Dirk Anderson de la unidad de *Flow Cytometry*, por su tiempo, confianza, disponibilidad y asesoramiento en el área. A la Dra. Angela Pannier y el Dr. Eric Farris del *Biological Systems Engineering Department*, por su apoyo y ayuda durante el trabajo en su laboratorio. A la Dra. Mengna Xia de *Biomedical and Obesity Research* por su asesoría. Gracias a todos ellos pertenecientes a la Universidad de Nebraska, Lincoln, Estados Unidos.

A la Q.B.P. Juana Narváez Morales gracias por el apoyo técnico brindado.

Al Conacyt por la Beca otorgada y al Cinvestav por la Beca terminal.

Acknowledgment

First and foremost, I would like to thank the University of Nebraska, Lincoln for accepting me into the Ph.D. program and giving me the opportunity to continue my education at a prestigious University.

A very sincere gratitude goes out to my advisor, Dr. Rodrigo Franco, for his continued support throughout my study and research. His guidance, patience and understanding, as I pursued my dream, is the reason I have achieved my goal of earning a Ph.D.

To Dr. Greg Somerville. Thank you for the many laughs, talks, and your continued support throughout my stay.

Thanks to my laboratory colleague, Jordan Rose, for the moral support throughout the long and difficult laboratory sessions. Making me laugh and listening to my stories made bearing the long days and nights possible.

I would like to thank all of my friends. Bikash Ranjan Sahoo, for saving me so many times, for understanding the crazy things I said and for supporting me in times of need. Ari, for always sharing a shy smile. Ninaad Lasrado, for making me laugh, visiting me often and trusting me. Raj, for visiting me and for always knowing how to bring a smile to my face.

A special thanks goes out to Paul and Sherry Johnson for opening up their home and becoming my home-away-from-home. For being there when others couldn't be and for always bringing a smile to my face when others couldn't.

Gisella, for the continued support and for introducing me to people like Paul and Sherry. For always being there to listen and for a sincere friendship. Pedro, Shen and Elisse, for your friendship and support when I needed it the most.

Brian Kleinknecht, for friendship and for providing me company when I needed a break. Roman, for always having my back and continuously saving me

A mi familia

Muchas gracias por estar conmigo. Gracias Mama, Frank, Max, Ney y Rai por siempre apoyarme y darme los mejores consejos. Gracias familia por dejarme hacer lo que más me gusta y seguirme en el largo camino. Gracias por comprenderme.

A mis amigos

A mis amigas de generación, muchas gracias por su compañía. Fue una gran aventura.

A Juanita, muchas gracias por tu amistad, por haberme apoyado tanto. ¡Por las sesiones de risas!, la mejor medicina!

A los Doctores Fernando, Enrique, Juan Manuel, Néstor gracias por los mejores consejos.

Al Dr. Pablo Hernandez Franco muchas gracias porque sin tu opinión nunca hubiera empezado con esta aventura, gracias por haberme dado el mejor consejo de mi vida. Gracias por escucharme.

Al Dr. Rodrigo Franco Cruz, mil gracias por proveerme el mejor ambiente para lograr mis estudios, gracias por su confianza, tiempo y apoyo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA PIEL.....	1
1.1.1 Estructura y función.....	1
1.1.1.1 Epidermis	2
1.1.1.2 Dermis	3
1.1.1.3 Hipodermis	3
1.1.2 Enfermedades de la piel asociadas a exposiciones ambientales.....	4
1.2 COSMÉTICA Y NANOTECNOLOGÍA	6
1.2.1 Cosmético	6
1.2.2 Nanotecnología	7
1.2.2.1 Nanopartículas y características	8
1.2.2.2 Nanopartículas usadas en la industria cosmética.....	8
1.2.2.2.1 Nanopartículas de óxido de titanio (NPs TiO₂)	11
1.2.2.2.2 Nanopartículas de óxido de cerio (NPs CeO₂)	12
1.2.2.2.3 Nanopartículas de plata (NPs Ag)	13
1.2.3 Principales productos de uso común que contienen NPs	14
1.2.4 Niveles de exposición de las NPs.....	17
1.2.4.1 Penetración	17
1.2.4.2 Acumulación.....	19
1.2.5 Regulaciones del uso de NPs en cosméticos	19
1.2.6 Nanotoxicología	22
1.3 MECANISMOS DE TOXICIDAD DE LAS Mt-NPs EN LA PIEL	23
1.3.1 Especies reactivas de oxígeno	23
1.3.1.1 Generación de ROS por las NPs	23
1.3.2 Mecanismos de sobrevivencia	25
1.3.2.1 Antioxidantes.....	25
1.3.2.1.1 Glutati6n	26
1.3.2.3 Metabolismo celular	27
1.3.2.3.1 Gluc6lisis y respiraci6n celular	27
1.3.3 Autofagia.....	29
1.3.4 Inflamaci6n.....	30
1.3.5 Senescencia.....	32
1.4 JUSTIFICACI6N	33
1.5 HIP6TESIS.....	33
1.6 OBJETIVOS.....	34
1.6.1 OBJETIVO GENERAL	34
1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
2. MÉTODOS.....	35
2.1 FASE I. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS Mt-NPs. Microscopía de transmisión electrónica y microscopía electrónica de barrido.....	36
2.1.1 Principio.....	36
2.1.2 Procedimiento	37
2.2 Análisis de seguimiento de nanopartículas.....	38
2.2.1 Principio.....	38
2.2.2 Procedimiento	38
2.3 Dispersión dinámica de luz.....	39
2.3.1 Principio.....	39
2.3.2 Procedimiento	39
2.4 Caracterización por dispersión	40

2.5 FASE II. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CELULARES. Modelo celular	40
2.6 Proliferación	41
2.7 Viabilidad celular	41
2.7.1 Liberación de lactato deshidrogenasa	41
2.7.1.1 Principio	42
2.7.1.2 Procedimiento	42
2.7.2 Integridad de la membrana plasmática	42
2.7.2.1 Principio	42
2.7.2.2 Procedimiento	43
2.8 Determinación de senescencia	43
2.8.1 Principio	43
2.8.2 Procedimiento	43
2.9 Detección de interleucinas	44
2.9.1 Principio	44
2.9.2 Procedimiento	44
2.10 Inmunodetección por Western blot	44
2.10.1 Principio	45
2.10.2 Procedimiento	45
2.11 Cambios en la granularidad celular	45
2.11.1 Principio	46
2.11.2 Procedimiento	46
2.12 Determinación de la actividad lisosomal	46
2.12.1 Principio	46
2.12.2 Procedimiento	47
2.13 Determinación de autofagia	47
2.13.1 Principio	47
2.13.2 Procedimiento	48
2.14 Determinación de especies reactivas de oxígeno	48
2.14.1 Principio	48
2.14.2 Procedimiento	49
2.15 Cambios en el metabolismo celular	49
2.15.1 Principio	49
2.15.2 Procedimiento	50
2.16 Contenido de ATP	50
2.16.1 Principio	51
2.16.2 Procedimiento	51
2.17 Análisis estadístico	52
3. RESULTADOS	53
3.1 Caracterización fisicoquímica de las Mt-NPs	53
3.1.1 Obtención de tamaños nanométricos	53
3.1.2 Determinación de tamaño, forma y composición de las Mt-NPs	56
3.1.3 Determinación de la concentración de las Mt-NPs en solución	58
3.1.4 Caracterización de las Mt-NPs por dispersión	60
3.2 Proliferación de las células HaCaT	63
3.3 Las Mt-NPs no afectan la viabilidad celular determinada por la liberación de LDH	64
3.4 Propiedades citotóxicas de las Mt-NPs en los queratinocitos	65
3.5 Las Mt-NPs no inducen senescencia	67
3.6 Expresión de interleucinas por la exposición a las Mt-NPs	68
3.7 Las Mt-NPs no cambian la expresión de proteínas asociadas a la inflamación ..	69
3.8 Cambios en el parámetro Side Scatter Chanel por captura de las Mt-NPs	70
3.9 Las NPs rTiO ₂ y CeO ₂ incrementan la actividad lisosomal	73
3.10 La autofagia protege a los queratinocitos de la toxicidad de rTiO ₂ y CeO ₂	74

3.11 Caracterización intrínseca de la fluorescencia de las Mt-NPs	77
3.12 El GSH es esencial para la supervivencia de los queratinocitos expuestos a las NPs de Ag.....	78
3.13 Las NPs de rTiO ₂ y Ag alteran la bioenergética de los queratinocitos.....	81
3.14 Las Mt-NPs modulan la sensibilidad de los queratinocitos a xenobióticos.....	84
4. DISCUSIÓN	87
4.1 Características fisicoquímicas de las Mt-NPs.....	88
4.2 Efectos citotóxicos de las Mt-NPs	90
4.3 La autofagia como protector de citotoxicidad ante Mt-NPs.....	91
4.4 El GSH es importante en la supervivencia celular ante las NPs de Ag.....	92
4.5 Alteración en el metabolismo energético por las Mt-NPs.....	93
4.6 Incremento en la sensibilidad de los queratinocitos a xenobióticos por Mt-NPs .	94
5. CONCLUSIONES	96
6. PERSPECTIVAS.....	97
7. REFERENCIAS.....	98
8. APÉNDICE.....	113

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Efectos biológicos NPs TiO ₂ y Ag en la piel.....	15
Tabla 2. Productos cosméticos basados en nanotecnología.....	16
Tabla 3. Concentración de las partículas por NTA.	60
Tabla 4. Protocolo de dispersión de las Mt-NPs.	61
Tabla 5. Caracterización de Mt-NPs en agua y medio de cultivo.....	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Micro anatomía de la piel.....	4
Figura 2. Ranking de empresas de belleza con nanopatentes.	10
Figura 3. Tipos de materiales usados en la cosmética.	11
Figura 4. Estructura cristalina de las NPs de estudio.	13
Figura 5. Número de productos registrados por la CPI y <i>The Nanodatabase</i>	14
Figura 6. Rutas de penetración de NPs en la piel.....	18
Figura 7. Mecanismos de generación de ROS por Mts-NPs.....	25
Figura 8. Metabolismo de las ROS por la vía del GSH.	27
Figura 9. Autofagia inducida por NPs.....	30
Figura 10. Respuestas inflamatorias de las Mt-NPs en piel.....	31
Figura 11. Diseño experimental.....	36
Figura 12. Micrografías tomadas por TEM.	53
Figura 13. Tamaño hidrodinámico de las NPs rTiO ₂	54
Figura 14. Tamaño hidrodinámico de las NPs CeO ₂	55
Figura 15. Tamaño hidrodinámico de las NPs de Ag.	56
Figura 16. Caracterización fisicoquímica de las Mt-NPs.....	57
Figura 17. Microanálisis elemental SEM-EDX.	58
Figura 18. Cinética de las Mt-NPs en el tiempo.	59
Figura 19. Fotografías representativas de las Mt-NPs en suspensión por NTA. ...	60
Figura 20. Cinética de las Mt-NPs en medio de cultivo.....	63
Figura 21. Proliferación de las células HaCaT.....	64
Figura 22. Viabilidad celular medida por la liberación de LDH.....	65
Figura 23. Propiedades citotóxicas de las NPs rTiO ₂ , CeO ₂ y Ag.....	66
Figura 24. Citotoxicidad de las Mt-NPs a concentraciones sub-tóxicas.....	67
Figura 25. Las NPs de rTiO ₂ , CeO ₂ y Ag no inducen senescencia.	68
Figura 26. Incremento de IL-8 e IL-1 α por la exposición a las NPs de Ag.....	69
Figura 27. Las Mt-NPs no incrementan la expresión de proteínas asociadas a la inflamación.....	70
Figura 28. Cambios en SSC de los queratinocitos tratados con las Mt-NPs como una evaluación indirecta de su captura.....	72
Figura 29. Cambios en los niveles de proteína LAMP1.	73
Figura 30. Actividad lisosomal de queratinocitos tratados con las Mt-NPs.....	74
Figura 31. La autofagia protegió a los queratinocitos de la toxicidad de las NPs rTiO ₂ y CeO ₂	75
Figura 32. Formación del autofagosoma (eGFP-LC3-II <i>puncta</i>) en queratinocitos tratados con las Mt-NPs.	77
Figura 33. Histogramas que representan la auto fluorescencia de las células tratadas con las Mt-NPs.	78
Figura 34. El metabolismo de GSH es esencial para la sobrevivencia de los queratinocitos expuestos a las NPs de Ag independiente de la generación de ROS.	80
Figura 35. Efectos de las Mt-NPs en la bioenergética de los queratinocitos.....	83

Figura 36. Efectos de las Mt-NPs en la supervivencia de los queratinocitos
expuestos a xenobióticos. 85

Figura 37. Mecanismos de supervivencia de queratinocitos expuestos a Mt-NPs y
su susceptibilidad a la exposici3n de xenobi3ticos. 86

ABREVIATURAS

•OH	Radical hidroxilo
3⁺ [Ce₂O₃]	Óxido de cerio reducido
3-MA	Metil adenina
4⁺ [CeO₂]	Óxido de cerio oxidado
ADP	Adenosin Difosfato
ATP	Adenosin Trifosfato
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CCCP	Carbonil Cianuro m-clorofenilhidrazona
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CO₂	Dióxido de carbono
CPI	<i>Nanotechnology Consumer Product Inventory</i>
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i>
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FADH₂	Flavín Adenín dinucleótido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G6PD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GIN	<i>Global Issues in Nanotechnology</i>
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación Disulfuro
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HaCaT	<i>Hight Calcium Temperature</i>
HEPES	Acido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanosulfónico
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
K	Queratinas
LC3-II	Proteína asociada a microtúbulos 1A-1B-Cadena ligera 3
LDH	Lactato Deshidrogenasa
Mt-NPs	Nanopartículas Metálicas
NaAsO₂	Arsenito de Sodio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NEHI	<i>Nanotechnology Environmental and Health Implications</i>

NF-κB	Factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de células β activadas
NIOSH	<i>National Institute of Occupational Safety and Health</i>
NOS-2	Óxido Nítrico Sintasa- isoforma 2
NPEG	<i>Nanotechnology Public Engagement</i>
NPs	Nanopartículas
NPs Ag	Nanopartículas de Plata
NPs CeO₂	Nanopartículas de Óxido de Cerio
NPs TiO₂	Nanopartículas de Óxido de Titanio
NSET	<i>Nanoscale Engineering and Technology</i>
NTA	Análisis de Seguimiento de Nanopartículas
NTIG	<i>The Nanotechnology Interest Group</i>
O₂⁻	Anión Superóxido
OCR	Tasa de Consumo de Oxígeno
ONOO⁻	Peroxinitrito
p-62	Sequestosoma 1 (SQSTM1)
PBS	Solución Salina de Fosfato
PDI	Índice de Polidispersión
PI	Ioduro de Propidio
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PQ	Paraquat
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rTiO₂	Nanopartículas de óxido de titanio isoforma rutilo
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
SFB	Suero Fetal Bovino
SIPS	Senescencia Prematura Inducida por Estrés
SSC	<i>Side Scatter</i>
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
TLR-2	Receptor Tipo Toll
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral
UV	Ultravioleta
WB	Western blot

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, su área de superficie es de 1.8 m² aproximadamente. Este órgano se considera la primera barrera en contra de factores ambientales. Ante algún daño, en condiciones normales, tiene una capacidad de regeneración de ~14 días por medio del proceso de la descamación. La piel está compuesta de queratinocitos, melanocitos, células de Merkel, células de Langerhans, sustancias intercelulares, cabello, glándulas sebáceas, glándulas ecrinas y glándulas apocrinas distribuidas en tres capas, epidermis, dermis e hipodermis.

1.1.1 Estructura y función

La estructura de la piel se caracteriza por una vasculatura de pequeños vasos y capilares sanguíneos, que interactúan con glándulas sudoríparas y folículos pilosos. Esta se encuentra distribuida en todo el órgano, mejorando el flujo sanguíneo, controlando el sistema neuroendocrino y el sistema del óxido nítrico (NO) (Hodges and Johnson 2009). Su sistema somatosensorial involucra al sistema simpático, parasimpático e inervaciones sensoriales que generan respuestas a sensaciones de la piel, músculos y articulaciones. Los diferentes tamaños de fibras y terminaciones nerviosas generan una gran complejidad de sensaciones que proveen respuesta al tacto, presión, frío, calor y dolor (Seiffert and Granstein 2006).

Su sistema inmunológico está constituido por células dendríticas circundantes que llegan a la zona cuando factores específicos interactúan con los vasos sanguíneos. Células como las de Langerhans reconocen antígenos y son el primer sistema de defensa en contra de insultos cutáneos.

Dentro de la población celular, además de los queratinocitos, se encuentran los melanocitos. Estas células se caracterizan por la producción de melanina, un pigmento empaquetado en los melanosomas. La melanina se genera por la conversión enzimática de la L-tirosina y la participación de la tirosinasa dependiente

de cobre (Olivares and Solano 2009). Este tipo de células dendríticas pigmentadas tienen gran importancia debido a su capacidad de proteger en contra de los rayos ultravioleta (UV), por lo que la coloración de la piel está ligada a su actividad. Su población representa un número pequeño, en un orden de 4:10 células (melanocito:queratinocito). La motilidad de este tipo celular y su interacción con queratinocitos de la capa basal interviene en la migración fluida hacia a la parte superior de la epidermis, como una respuesta a la adaptación de color en los mamíferos (Schiaffino 2010). Las anomalías en la migración, en los primeros años de vida, provocan diferentes padecimientos acentuados en personas de color y la disfunción en la producción de la melanina se ha asociado a la generación de melanoma (Schiaffino 2010).

Entre las funciones de la piel se encuentran la regulación de la temperatura corporal, balance electrolítico, protección de la radiación UV y secreción de sustancias tóxicas por medio del sudor. También se encarga de la síntesis y procesamiento de vitaminas (D), hormonas y sustancias constitutivas (queratina, colágeno, lípidos y carbohidratos). Es considerado un órgano de protección a xenobióticos, soporte mecánico, sensorial y secreción (Nafisi and Maibach 2017).

1.1.1.1 Epidermis

El ambiente celular de esta capa se compone de un 90% de queratinocitos y el porcentaje restante de células dendríticas, melanocitos, células de Merkel y Langerhans (Filipe et al. 2009). Los queratinocitos están dispuestos en cinco estratos, basal, espinoso, granuloso, lucido y córneo. Cada estrato de queratinocitos produce diferentes tipos de queratinas. Las queratinas son filamentos intermedios que mantienen la estructura del citoesqueleto, proveen estabilidad mecánica y mantienen el equilibrio de la adhesión intracelular (Moll, Divo and Langbein 2008). Las queratinas 5-14 (K5/K14) son comúnmente reportadas en las capas basales mientras que las queratinas 1-10 (K1/K10) son reportadas en las capas supra basales (Omary et al. 2009). La correcta producción de queratinas está relacionada a la producción de hormonas tiroideas y vitamina D además de glucocorticoides y ácido retinoico. La alteración en la producción de K1/K10 está asociada a la

hiperqueratosis epidermolítica, K5/K14 a epidermolisis bullosa y K2 a ictiosis bullosa de Siemens (Ramot et al. 2009).

Los queratinocitos están en constante proceso de queratinización (migración/recambio) permitiendo a las células del estrato córneo ser sustituidas por nuevas provenientes del estrato basal. Durante este proceso, colágenos (IV y XVII), elastina, nidógeno, fibronectina, lamininas, demosomas, familias de proteínas de adhesión, cadherinas (desmogleína y desmocolina), proteínas dependientes de calcio, proteínas armadillo (placoglobina, placofilina) que unen cadherinas y queratinas, el complejo placa-placa (desmoplaquina, peri-plaquina), filamentos de anclaje (plectina) y proteoglicanos funcionan como andamios celulares. Estos incrementan su expresión en la capa basal y disminuyen hasta el estrato córneo, por lo que se han asociado a tiempos de vida cortos (Sandjeu and Haftek 2009). Esta migración asegura el constante recambio celular través de la exfoliación, disminuyendo el riesgo de padecimientos de la piel (Pincelli and Marconi 2010).

1.1.1.2 Dermis

La dermis está compuesta de tejido conectivo que amortigua la tensión en el órgano y provee turgencia a la piel. La producción de colágeno tipo I (hasta en un 80%) es característica de esta capa y su disminución por la exposición a rayos UV induce la forma laxa de la piel (Sandjeu and Haftek 2009). Los fibroblastos son el tipo celular más común que se encuentra en el tejido conectivo.

En esta capa se pueden encontrar macrófagos y células del sistema inmune, además de estructuras accesorias como cabello, glándulas sebáceas, glándulas linfáticas vasos sanguíneos y nervios (Olivares and Solano 2009).

1.1.1.3 Hipodermis

La hipodermis (tejido subcutáneo) está compuesta de adipocitos y tejido subcutáneo laxo. Ambos se concentran alrededor de las estructuras vasculares y proveen conductividad entre la dermis y el sistema vascular. Protege al sistema linfático,

sanguíneo y nervioso. Esta estructura está encargada de dar textura, mantener la temperatura y facilitar la movilidad de la piel (Nafisi and Maibach 2017).

En la Figura 1 (A) se muestran los cinco estratos que conforman la epidermis y se observa el cambio de estructura celular desde el estrato basal hasta el córneo y en (B) se muestra un esquema que señala las tres capas de la piel, epidermis, dermis e hipodermis y los componentes de cada uno de ellos. Además, se muestran las estructuras accesorias como glándulas sebáceas, sudoríparas, músculos erectores y cabello.

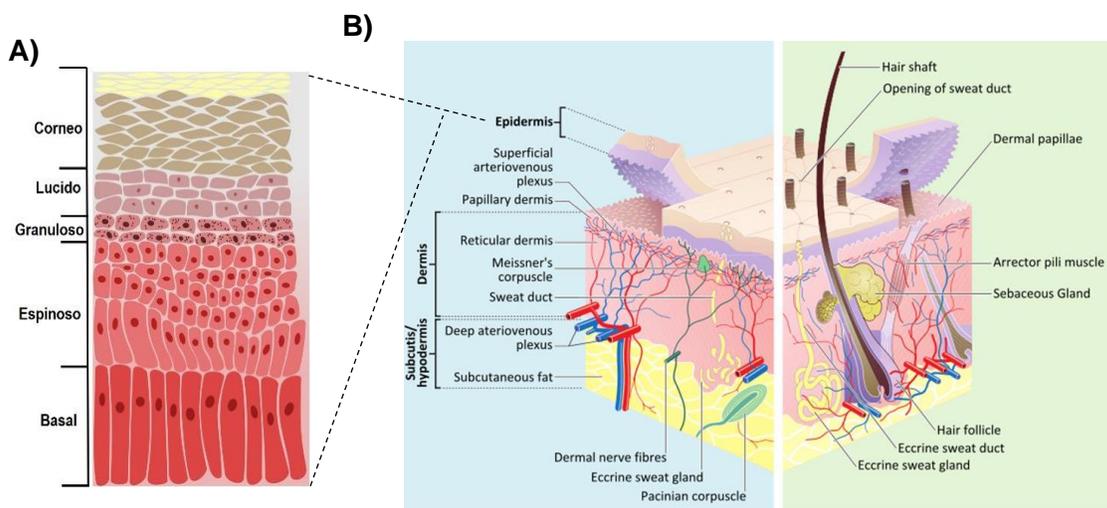


Figura 1. Micro anatomía de la piel.

A) Estratos que conforman la epidermis y **B)** las tres capas que conforman la piel, epidermis, dermis e hipodermis. Tomado y modificado de <https://zoldtom.blogspot.com/2017/08/>, 2017.

1.1.2 Enfermedades de la piel asociadas a exposiciones ambientales

Con el continuo desarrollo de la industria, se ha incrementado la contaminación atmosférica a niveles alarmantes. La piel es uno de los primeros órganos expuestos a contaminantes como partículas suspendidas, compuestos orgánicos volátiles, ozono, humo de tabaco, rayos UV, metales, herbicidas y nanopartículas (NPs) contenidas en diferentes vehículos. Hasta hoy se han estudiado muchos de los efectos ocasionados por rayos UV, dejando a un lado los ocasionados por otros contaminantes como arsénico, paraquat y NPs.

Recientemente, los efectos dermatotóxicos han sido asociados a la interrupción de la barrera cutánea, disminuyendo la capacidad para cerrar heridas, la elasticidad y aumento en la pigmentación (Krutmann et al. 2017). También han sido ligados a enfermedades inflamatorias como dermatitis atópica, acné y psoriasis, además de alergias, envejecimiento prematuro e incluso cáncer (Kim, Cho and Park 2016). Este tipo de enfermedades está asociado al incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que altera vías de señalización celular y modifica al ADN (Godic et al. 2014).

El arsénico es un metal distribuido ubicuamente en el medio ambiente y sigue siendo una amenaza importante para la salud humana. Una vez que el arsénico ingresa en el organismo, se une a la globina de la sangre y se transporta en todo el sistema almacenándose principalmente en hígado, riñón, corazón, cabello y piel. El arsénico en la piel, tiene afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH) de las queratinas (Gasque Silva 2013). Las lesiones cutáneas se consideran la primera manifestación de toxicidad por este metal después de una exposición prolongada (Rahman, Ng and Naidu 2009). Se ha observado en regiones endémicas con exposición a arsénico del 17% al 66% de las personas expuestas presenta manifestaciones cutáneas como hiperpigmentación, queratosis y enfermedad de Bowen (Huang, Lee and Yu 2019). El 1% desarrolla cáncer en células basales y escamosas u otras neoplasias cutáneas (Lee, Liao and Yu 2011).

El paraquat es uno de los herbicidas más usados en el mundo. En piel sana su absorción es lenta, sin embargo, en una piel ligeramente dañada la absorción se vuelve más rápida. Los efectos por contacto dérmico al herbicida están asociados a dermatitis, eritema, ampollas, abrasión y ulceración (Vale, Meredith and Buckley 1987, Tungsanga et al. 1983).

En cuanto a la generación de enfermedades relacionadas a la interacción NPs-piel hasta hoy solo existe un reporte de dermatitis y asma en una mujer expuesta a NPs de níquel que usó en la fabricación de tinta plateada (Journeay and Goldman 2014). Algunos reportes indican efectos en la piel por la elaboración de tatuajes, lo cual se

ha asociado a la profundidad (dermis) que involucran las técnicas, además del tipo de NPs contenidas en las tintas (carbón negro y pigmentos orgánicos) que mejoran la coloración y efectos (Grant et al. 2015, Høgsberg et al. 2011). Se han reportado síntomas como comezón, hinchazón, inflamación de nódulos y ardor después de su elaboración (Høgsberg, Hutton Carlsen and Serup 2013). Sin embargo, muchos de estos padecimientos están siendo ligados a las condiciones de salud, edad, sexo, sitio de exposición, temperatura e hidratación entre otros factores que varían de persona a persona.

1.2 COSMÉTICA Y NANOTECNOLOGÍA

La cosmética es una disciplina de las ciencias de la salud que se ha dedicado al diseño de productos que ayudan a mejorar la apariencia y salud del ser humano. A través de productos dirigidos al cuidado y embellecimiento de la piel evitando o disminuyendo las alteraciones por las exposiciones ambientales y tratamiento de lesiones o enfermedades.

1.2.1 Cosmético

Diariamente al menos el 83.5% de la población mundial utiliza algún producto para el cuidado de la piel. Según la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) en el documento *Federal Food, Drug and Cosmetics Act* (FD&C Act) define a un cosmético como “una sustancia (preparado) destinada a ser puesta en contacto con diversas partes del cuerpo humano (epidermis, sistema capilar y piloso, labios, uñas, órganos genitales externos, mucosa de la cavidad bucal y dientes) con el fin principal de limpiarlas, perfumarlas, modificar su aspecto y/o corregir sus olores corporales y/o protegerlas o mantenerlas en buen estado”.

En nuestro país existen al menos 67 empresas nacionales e internacionales dedicadas a este sector (<http://canipec.org.mx/>). México al ser un país que carece de normatividades que regulen la producción de cosméticos, ocupa el tercer lugar en su producción después de Estados Unidos y Brasil. México exporta cosméticos

a más de 100 países en todo el mundo, principalmente a América Latina y Estados Unidos (<http://www.2006-2012.economia.gob.mx>). Sin embargo, solo en Estados Unidos y Europa los productos son regulados en base a las necesidades de la empresa productora.

Cada empresa cuenta con diferentes requerimientos que varían dependiendo del país. Dentro de los ingredientes más regulados se encuentran los aditivos de color, de los cuales no se indican las cantidades exactas usadas en las formulaciones. De los ingredientes restringidos y prohibidos por la FDA (2015) se enlistan el bitionol, clorofluorocarbonos, cloroformos, salicilanilidas halogenadas, hexaclorofeno, compuestos de mercurio y cloruro de metileno. Entre los contaminantes potenciales se encuentran 1,4-dioxano, priones y plomo. De los ingredientes más utilizados y reconocidos se mencionan a los α y β -hidroxiácidos, aditivos de color, dietanolamina, fragancia, parabenos, ftalatos, talco, y compuestos nanométricos. De acuerdo con la *Royal Society & the Royal Academy of Engineering Report (2004)*, las NPs deben de ser tratadas como nuevos compuestos químicos debido al riesgo que estas pueden causar en los sistemas biológicos, sin embargo, ante la gran cantidad de reportes que indican la ausencia de muerte celular, estos materiales han sido denominados seguros para su uso.

1.2.2 Nanotecnología

La nanotecnología es una ciencia, ingeniería y tecnología encargada del estudio de los materiales a escala nanométrica, $< 100\text{nm}$. Esta se enfoca en producir y desarrollar múltiples nanomateriales de orígenes fisicoquímicos variados para aplicarlos en diferentes áreas. Entre estas se encuentran la química, biología, física y medicina en donde se involucra a la cosmética (EPA, 2016; National Science Foundation, 2016; y National Nanotechnology, 2016).

1.2.2.1 Nanopartículas y características

Según la Agencia Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) los nanomateriales han sido clasificados de acuerdo a su origen (basados en carbono, metales, dendrímeros y compósitos) y al número de dimensiones que estas presentan: dimensión cero: las tres dimensiones se ubican en el régimen nanométrico [forma esférica]; una dimensión: con longitud variable [fibras o tubos]; dos dimensiones: con áreas de tamaño indefinido [laminas]; tres dimensiones: en la que los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas [policristales]) (Jeevanandam et al. 2018).

Dentro de las características que también provocan la variabilidad en las respuestas son el tamaño en seco, forma, estado de agregación (aglomerados, agregados), área de superficie (composición y carga), tamaño hidrodinámico y composición química. Estas propiedades influyen sobre los efectos en los sistemas biológicos alterando la absorción, distribución, metabolismo y excreción (Choi et al. 2007, Powers Christina et al. 2011). Algunos estudios han confirmado que los diferentes estados de síntesis y administración/exposición las hace peligrosamente distintamente (Jiang et al. 2008). Por lo que en años recientes se ha hecho necesario definir de manera precisa las características de las NPs con la finalidad de entender el potencial tóxico que cada una de ellas puede tener en los sistemas biológicos (The Royal Society, 2016). Esto además podría ayudar a asegurar resultados reproducibles.

1.2.2.2 Nanopartículas usadas en la industria cosmética

El uso de las NPs ha tomado relevancia en la innovación de productos de belleza (Szacilowski et al. 2005). Sobre todo aquellos que tienen que ver con la protección antibacterial y rayos ultravioleta (UV) (Vance et al. 2015). Cada año productos nuevos con NPs en sus formulaciones, que varían entre el 5-80% del contenido total, entran al mercado (Raj et al. 2012, Niska et al. 2018). En esta industria, básicamente son usados dos tipos de NPs, solubles y/o biodegradables (materiales que se desintegran al contacto con la piel) e insolubles/bio-persistentes (Nafisi and

Maibach 2017). A continuación, se enlistan las NPs más comúnmente registradas en el uso de los productos cosméticos.

NANOPARTÍCULAS SOLUBLES Y/O BIODEGRADABLES

- Liposomas [acarreadores de doble capa lipídica]
- Nanosomas [compuestas de cabezas de H₂O y colas de ácidos grasos]
- Ethosomas [diseñados para contener altas cantidades de etanol]
- Niosomas [vesículas surfactantes no iónicas]
- Transferosomas [moléculas con varios tipos de solubilidades]
- Cubosomas [compuestas de dos canales acuosos internos]
- Ultrasomas [liposomas multilamelares]
- Fotosomas [enzimas fotoliasas envueltas en liposomas]
- Aquasomas [o cuerpos de agua, consisten en el ensamblaje de tres capas unidas a un núcleo sólido]
- Micro, nano y multi-emulsiones

NANOPARTÍCULAS INSOLUBLES/BIO-PERSISTENTES

- Metales (Mts-NPs)
- Óxidos metálicos
- Base carbón [fullerenos, nanodiamantes]
- Polímeros
 - a) Nanocápsulas [capsulas poliméricas rodeadas de aceite o agua]
 - b) Hidrogeles [fluidos biológicos formadas por reacciones químicas o físicas], quitosano [polisacáridos lineares]
 - c) Cristales líquidos

OTRO TIPO DE NANOPARTÍCULAS

- Ciclodextrinas [polisacáridos cíclicos no tóxicos]
- Dendrímeros

En general, las NPs metálicas/óxidos (Mt-NPs) son los materiales que se han relacionado a la activación de mecanismos de estrés oxidante ligados a padecimientos en la piel (Robertson, Sanchez and Roberts 2010), sobre todo si son aplicaciones repetidas.

En el 2015 y 2016 se reportó el incremento en la eficiencia de las formulaciones cosméticas con el uso de las NPs (Firooz, Nafisi and Maibach 2015, Nassiri-Kashani et al. 2016). Dentro de los beneficios se indicó una mayor solubilidad y transparencia, mejora del color y acabado, mayor protección a los rayos UV y propiedades antibacteriales; y una mayor penetración en la piel que se ha ligado a la duración de los efectos (Kaul et al. 2018, Niska et al. 2018). De las ventajas se enlistan protección en contra de la descomposición química, mejora de la disolución de compuestos y mayor liberación tópica (Nafisi and Maibach 2017). En la Figura 2 se muestran el ranking de las 10 empresas de belleza con más nanopatentes registradas hasta el 2012, encabezada por L'Oréal.

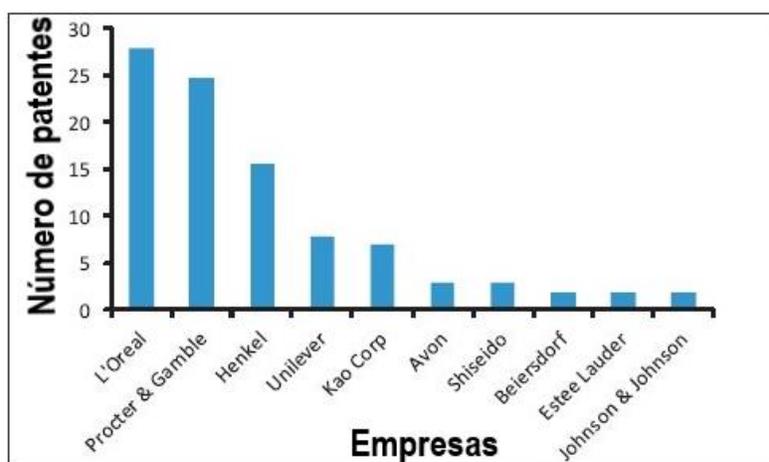


Figura 2. Ranking de empresas de belleza con nanopatentes.

Se muestra el número de patentes por empresa. Tomado de (Raj et al. 2012).

Las Mts-NPs usadas en más de 600 productos cosméticos se presentan en la Figura 3-A. De las Mt-NPs, incluyendo óxidos, las NPs de plata (NPs Ag) y titanio (NPs TiO₂) en rangos de tamaño de 20-50 nm son los materiales más usados (gráfica superior derecha) debido a sus propiedades antibacteriales y protectoras a rayos UV (Shi et al. 2013). Otras Mts-NPs identificadas se enlistan en el panel B de la Figura 3, de estas, el óxido de cerio (NPs CeO₂) tiene relevancia por sus características antioxidantes (Robertson et al. 2010).

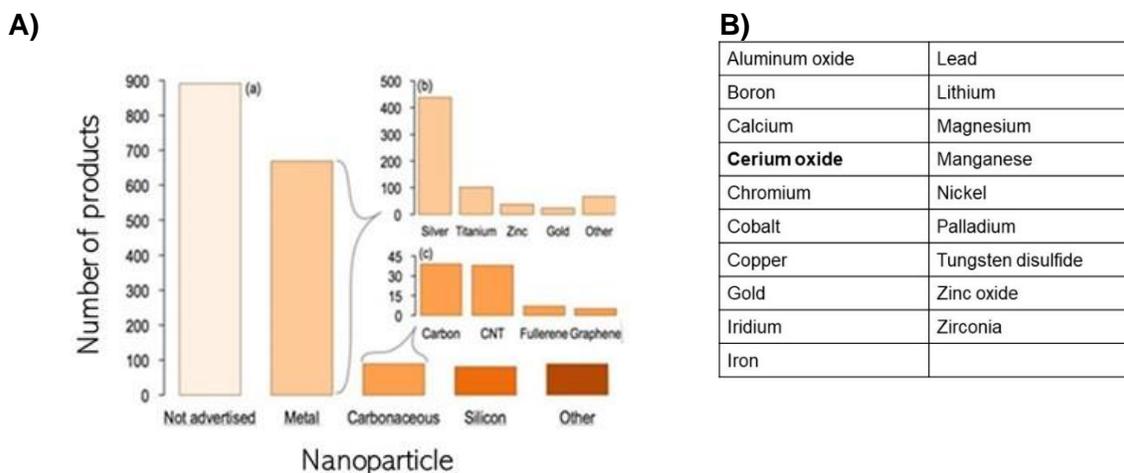


Figura 3. Tipos de materiales usados en la cosmética.

A) Número de productos categorizados por el tipo de material. La ampliación de la gráfica superior derecha muestra las Mt-NPs más usadas, **B)** Lista de Mt-NPs englobadas en la barra “others”. Tomado de (Vance et al. 2015, Raj et al. 2012).

1.2.2.2.1 Nanopartículas de óxido de titanio (NPs TiO₂)

El titanio pertenece a la familia de los metales de transición y muestra una configuración electrónica 4s. Es uno de los materiales más manufacturados a escala global debido a sus propiedades fotocatalíticas, ópticas y electrónicas. El óxido de titanio se puede encontrar en la naturaleza en forma de broquita (ortorrómbico), anatasa y rutilo (ambas tetragonales) (Shi et al. 2013). Las características de las NPs TiO₂ pueden ser modificadas siguiendo diferentes métodos de funcionalización. Su alta estabilidad depende de su tamaño, estructura, forma, volumen, radio, carga y formación de aglomerados/agregados (Zoroddu et al. 2014)

En la cosmética, la utilización de la isoforma rutilo (rTiO₂) es debida a la baja toxicidad y elevada fotocatalisis (Sarria et al. 2005). Las NPs TiO₂ generan formulaciones transparentes, menos viscosas, mezclas fáciles de aplicar y pueden funcionar como vehículos. Los productos que comúnmente contienen estos materiales son la pasta de dientes, maquillaje y bloqueadores solares. Estudios recientes indican que su internalización y depósito es en los estratos profundos de la epidermis, puede ser a través de folículos sebáceos (Filipe et al. 2009). No se ha

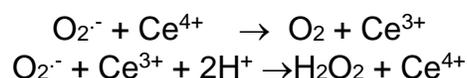
reportado efectos tóxicos cuando son aplicadas como emolientes dermatológicos y protectores solares (Chen et al. 2016).

1.2.2.2 Nanopartículas de óxido de cerio (NPs CeO₂)

El elemento cerio, naturalmente se encuentra en forma de óxido. Este lantánido presenta una configuración electrónica 4f y muestra propiedades catalíticas, magnéticas y eléctricas. Como NP posee altos puntos de fusión, tolerancia a la radiación, fuerte atracción electrostática, afinidad por el oxígeno y potencial redox (Samiee and Goharshadi 2012, Ye et al. 2011).

Las NPs CeO₂ pueden existir en los estados reducido 3⁺ (Ce₂O₃) y oxidado 4⁺ (CeO₂), de tal manera que pueden funcionar como antioxidantes u oxidantes. La actividad antioxidante (óptima a pH fisiológico) está mediada por los espacios libres de oxígeno en la superficie de las NPs, de forma que la disminución de tamaño incrementa este comportamiento (Korsvik et al. 2007, Chen et al. 2016). Por esta razón ofrecen varios sitios de catálisis en comparación con agentes farmacológicos o enzimas que solo disponen de un sitio activo por molécula (Tarnuzzer et al. 2005). En el estado oxidado 4⁺ (pH ácido) se observa una configuración electrónica estable y una forma cristalina tipo fluorita, en la cual los átomos de cerio son rodeados por 8 aniones de oxígeno en posición tetraédrica (Xu and Qu 2014, Korsvik et al. 2007).

En las células, cuando los electrones de las NPs CeO₂ no son atrapados después de la primera reacción con las ROS, las NPs se comportan como potentes catalizadores (Korsvik et al. 2007). Aunque el sitio activo de las NPs CeO₂ todavía no ha sido establecido, se puede especular acerca del mecanismo de acción basado en el estudio de Korsvik *et al.* (2007) sobre el comportamiento mimético de las NPs CeO₂ y la super óxido dismutasa (SOD). Similar al Fe y Mn-SOD es posible que la dismutación del anión superóxido por las NPs CeO₂ sea catalizada de la siguiente manera:



Por lo tanto, la catálisis puede ocurrir en el mismo átomo de cerio, como en el caso de la SOD dependiente de metal.

1.2.2.2.3 Nanopartículas de plata (NPs Ag)

La plata es un elemento metálico, dúctil y maleable; posee propiedades eléctricas y térmicas. De forma natural puede encontrarse combinada con azufre (argentita), arsénico (proustita), antimonio (pirargirita) y cloro (plata cornea). Tiene una configuración electrónica 4d. Las NPs Ag conservan muchas de las propiedades del metal, entre ellas las antibacteriales y antifúngicas. El efecto antibacterial de las NPs Ag es debido a la liberación continua de protones (Ag^+). Esta liberación inactiva complejos enzimáticos que contienen azufre, fósforo, oxígeno o nitrógeno (tioles, carboxilatos, fosfatos, hidroxilos, aminas imidazoles, indoles) frenando la replicación y transducción de señales en las bacterias. La disminución del pH provoca que los protones interactúen con la cadena respiratoria mitocondrial (alterando la oxidación de glucosa, glicerol, fumarato y succinato) disminuyendo la división celular y llevando a la muerte celular (Khalandi et al. 2017). La generación de radicales libres es otro mecanismo por el cual las membranas celulares pueden hacerse permeables. En la Figura 4 se muestran las estructuras cristalinas de las NPs rTiO_2 , CeO_2 y Ag.

En la Tabla 1 se muestran los efectos que ocasionan las NPs de TiO_2 , CeO_2 y Ag sobre la piel. En el caso de las NPs CeO_2 los estudios son escasos.

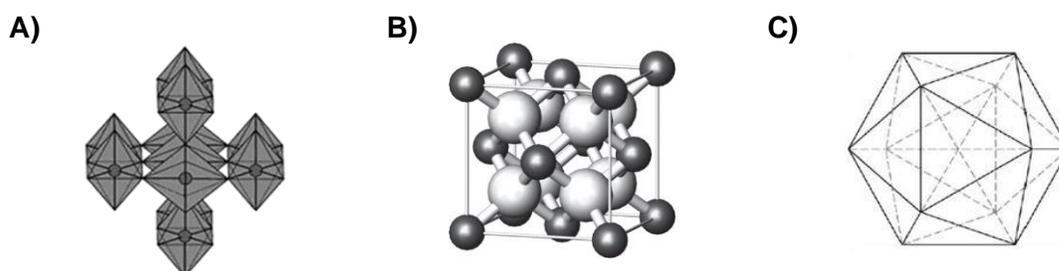


Figura 4. Estructura cristalina de las NPs de estudio.

Se muestran los modelos de las estructuras cristalinas. En **A)** NPs TiO_2 en su isoforma rutilo, **B)** NPs del lantánido CeO_2 y **C)** NPs Ag en su forma cristal decaedro. Tomado de

(Hofmeister, Tan and Dubiel 2005, Gupta and Tripathi 2011, Chueh William and Haile Sossina 2010).

1.2.3 Principales productos de uso común que contienen NPs

En octubre de 2013, el Inventario de Productos de Consumo de Nanotecnología (CPI, por sus siglas en inglés) publicó la existencia de 1814 productos disponibles para los consumidores, provenientes de 622 compañías y 32 países. De estos, el 70% no proporcionan información acerca de la composición o tipo de material usado o del medio en donde las NPs son suspendidas. En total, 762 productos pertenecen a la categoría de salud y fitness (que incluyen cosméticos), siendo las NPs Ag las más usadas para estos fines con 435 productos (Vance et al. 2015). Bajo el mismo orden de ideas, *The Nanodatabase*, desarrollada por *The Danish Ecological Council and Danish Consumer Council* ha respaldado este inventario con una base de datos elaborada con reportes científicos (<http://nanodb.dk/en/>). En la Figura 5 se muestra una gráfica con el número de productos registrados hasta el 2016 por la CPI y *The Nanodatabase* de acuerdo a las NPs usadas, además se observa que el uso de productos dermatológicos es el predominante (Foss Hansen et al. 2016).

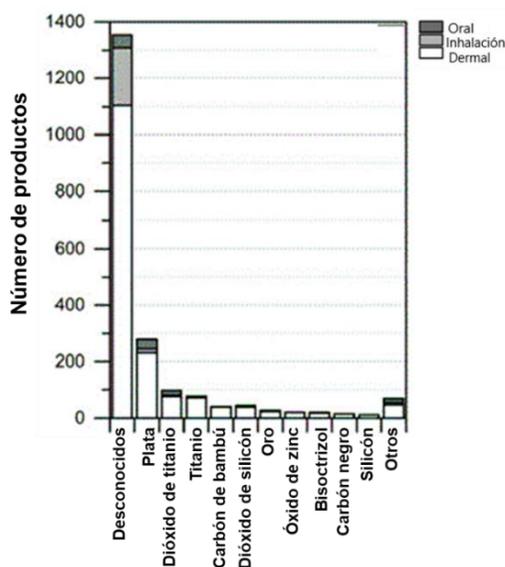


Figura 5. Número de productos registrados por la CPI y *The Nanodatabase*. Se muestra el número de productos registrados en ambas bases de datos actualizadas hasta el 2016, además del número de productos por categoría referente al tipo de NPs. Tomada de (Foss Hansen et al. 2016).

Tabla 1. Efectos biológicos NPs TiO₂ y Ag en la piel.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS (PIEL)	TiO ₂ NP	Ag NP	CeO ₂ NP
Absorción de radiación UV	✓	✓	-
Propiedades antibacteriales	✓	✓✓	-
Propiedades Antinflamatorias	NE	✓	-
Citotoxicidad	✓	✓✓	-
Fototoxicidad	✓	NA	-
Genotoxicidad y carcinogenicidad	Solo bajo UV	✓	-
Habilidad para penetrar fácilmente a través de la piel	✓	✓	✓
Acumulación en células	✓	✓	✓
Disminución en la viabilidad celular	✓	✓	-
Daño a la membrana celular	✓	NA	-
Generación de ROS	✓	✓	✓
Alteración en la función mitocondrial	✓	✓	-
Disminución en la adhesión y migración celular	✓	✓	-
Inducción de muerte celular autofágica	✓	✓	-
Inducción de muerte celular apoptótica	✓	✓	-
Inducción de muerte celular necrótica	✓	NA	-
Disminución de la actividad antioxidante	NA	✓	✓
Disminución de la capacidad de contraer colágeno	✓	NA	-
Lipoperoxidación	✓	✓	-
Inducción de inflamación	NA	✓	-

✓ - Propiedades exhibidas; ✓✓- propiedades fuertemente exhibidas; NE – propiedades no exhibidas; NA – datos no disponibles. Tomado y modificado de (Niska et al. 2018).

Uno de los objetivos de la creación de estas bases de datos fue la generación de estrategias, herramientas y políticas que aseguren el uso responsable de estos productos, además de la identificación exacta de los componentes de cada uno de ellos. Hasta hoy, se ha reportado que 70% de los bloqueadores solares puestos a la venta contienen NPs TiO₂. Algunas estimaciones indican que la aplicación de 500 µl de bloqueador solar equivaldría a administrar 0.1 mg/cm² de NPs TiO₂ sobre la piel. Sin embargo, las diferentes características que las NPs presentan, han impedido esclarecer los posibles efectos.

Reportes recientes han publicado listados de productos cosméticos clasificados de acuerdo con su uso en la piel, labios y cabello, señalando el tipo de Mts-NPs usadas y la empresa que las manufactura (Madan and Nanda 2018, Kaul et al. 2018). Algunos otros reportan los beneficios ofrecidos a los consumidores, sin embargo, ninguno de estos describe las características fisicoquímicas de los materiales. De los productos más populares puestos a la venta se encuentran las cremas hidratantes, antiarrugas, antienvjecimiento, filtros solares y lápices labiales , como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Productos cosméticos basados en nanotecnología Tomado de (Nafisi and Maibach 2017).

Product	Proposed Use	Manufacturer	Marketing Claims
Hydra Flash Bronzer Daily Face moisturizer	Moisturizer	Lancôme	Nanocapsules of pure Vit E provide powerful antioxidant protection and ensure a natural, healthy glowing skin
Hydra Zen Cream	Moisturizer	Lancôme	Containing nanoencapsulated triceramides. It provides perfect comfort and softness, full hydration to skin; renews skin's health; and protects skin from signs of daily stress
Nano-in Hand and Nail Moisturizing Serum and Foot Moisturizing Serum	Moisturizer	Nano-Infinity Nanotech	Fine crystals of ZnO NPs penetrate skin tissue to prevent hands and nails from being hurt
Lancôme Renergie Microlift	Antiwrinkle	Lancôme	Formulated with colloidal silica and soy protein NPs to provide the best possible face-lift effect
RevitaLift Anti-Wrinkle, Firming Face, Neck Contour Cream	Antiwrinkle	L'Oréal	RevitaLift formula is enriched with Pro-Retinol A, encapsulated in nanosomes
RevitaLift Double Lifting	Antiwrinkle	L'Oréal	It contains nanosomes of Pro-Retinol A and has a unique dual action treatment that instantly retightens skin and effectively fights wrinkles
Eye Tender	Antiwrinkle	Kara Vita	It contains nanospheres, delivers 13 bioactives including wrinkle-reducing peptides to stimulate fibroblasts, build collagen, brighten skin, and reduce inflammation for a younger, healthier appearance

1.2.4 Niveles de exposición de las NPs

1.2.4.1 Penetración

Es conocido que la interacción y efectos de los diferentes xenobióticos, incluyendo las NPs, depende de la salud de la piel (Larese Filon et al. 2015) . Su integridad, la región anatómica expuesta y las diferentes enfermedades (alergias, dermatitis, eczema atópico, psoriasis, etc.) ayudan a incrementar la absorción, internalización, acumulación y la generación de efectos celulares. De forma que, cuando existe una piel enferma se reduce la función de la barrera protectora, como resultado de la alteración de las uniones estrechas (queratinocitos-estrato granuloso), además de la disminución de factores inmunológicos, secreciones glandulares y cambios en la organización y composición lipídica (Niska et al. 2018, Kezic and Nielsen 2009). En este caso se puede facilitar la penetración de componentes que normalmente son incapaces de traspasar esa barrera.

En general, se ha reportado que la internalización de las NPs puede ser a través de dos rutas, la transepidérmica (transcelular e intracelular) y la transapendicular (transfolicular y transadoripara) (Czajkowska-Kośnik, Szekalska and Winnicka 2019). El ingreso de las NPs por glándulas sudoríparas y folículos pilosos es una ruta conocida debido al diámetro que estos presentan (5-80 μm). Esta vía de internalización provoca una interacción directa al torrente sanguíneo y al sistema linfático, provocando un ingreso más rápido a la microcirculación dérmica (Roberts and Walters 2007). En la ruta transcelular se ha hipotetizado que las NPs pueden atravesar la capa de fosfolípidos e interactuar con proteínas como queratinas. Esta vía se considera de difícil acceso, debido a las múltiples interacciones con biomoléculas a través de los estratos que conforman los queratinocitos. Sin embargo, es clave cuando se usan potenciadores para la penetración en la piel (McCarley and Bunge 2001, Safwat et al. 2018). En la ruta intercelular las NPs atraviesan las capas a través de los pequeños espacios intercelulares con velocidades de difusión controladas por su capacidad lipofílica, además de su peso molecular, solubilidad y tipos de enlaces. En la Figura 6-A se muestra un esquema que ejemplifica las tres rutas de ingreso de las NPs y la interacción con diferentes biomoléculas y glándulas.

Otros de los factores importantes que influyen en la internalización de las NPs, son sus características fisicoquímicas, como estructura, composición, superficie, potencial ζ , aglomeración/agregación, densidad, liberación de iones, impurezas, vehículo, temperatura, pH y tamaño (Zhang et al. 2008, Larese Filon et al. 2015, Kokura et al. 2010, Gajbhiye and Sakharwade 2016). En general, la ruta transepidérmica, está asociada al ingreso de las Mts-NPs dependientes del tamaño. En la Figura 6-B se muestra que el ingreso de las NPs ≤ 4 nm puede darse en piel sana, las NPs de 4 - 20 nm pueden ingresar en piel ligeramente dañada, y en la piel con algún tipo de padecimiento pueden ingresar NPs de hasta 21 - 45 nm. Sin embargo, las NPs > 45 nm son incapaces de ingresar a estrato profundos de la piel (Zhang et al. 2008, Niska et al. 2018)

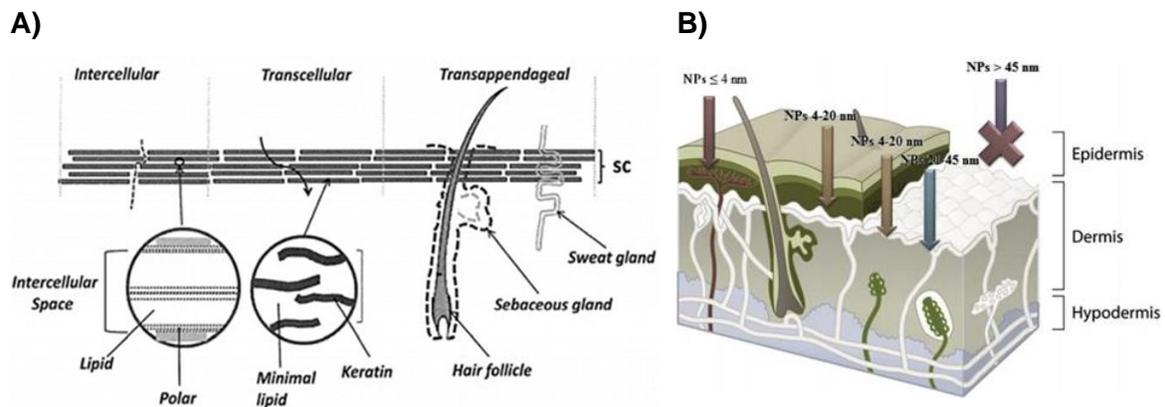


Figura 6. Rutas de penetración de NPs en la piel.

A) Se describen tres vías por las cuales Mts-NPs pueden ingresar a los estratos de la piel, además de las interacciones con otras biomoléculas y glándulas, **B)** Rangos de tamaños de Mts-NPs que pueden ingresar por la ruta transepidérmica humana. Tomado de (Xiao Wen et al. 2013, Niska et al. 2018).

Una vez que las NPs ingresan a los diferentes estratos de la piel, la interacción celular depende nuevamente de sus características fisicoquímicas. Por ejemplo, aglomerados de NPs > 500 nm < 1 μ m pueden internalizarse por fagocitosis a través del sistema de opsonización. La pinocitosis involucra cuatro vías de ingreso, la primera es referente a la captación de aglomerados de hasta 1 μ m a través del sistema de macropinocitosis y las tres restantes son mediadas por endocitosis

asistida por clatrina (~120 nm), o por caveolinas (~60 nm), ambas asociadas a NPs funcionalizadas, y la endocitosis independiente de caveolinas y clatrininas (90 nm). O puede llevarse a través de la penetración directa en tamaños de 4-10 nm (Pulido-Reyes et al. 2017)

1.2.4.2 Acumulación

En sistemas biológicos, se ha reportado que las Mts-NPs que logran atravesar la epidermis han sido encontradas en surcos del estrato córneo y en folículos pilosos, y que además son reconocidas por el sistema inmune y ganglios linfáticos (Prow et al. 2011, Filipe et al. 2009). Algunos autores han descrito cómo el sistema linfático tiene la capacidad de transportar Mts-NPs hacia el torrente sanguíneo (Price 1975, Price and Henderson 1978, Prow et al. 2011). Una vez ahí, las NPs tienen a acumularse en órganos específicos dependiendo de sus características fisicoquímicas. Por ejemplo, en el caso de las NPs TiO₂, se ha reportado que tienden a acumularse en el hígado, bazo y riñón (Shakeel et al. 2015, Wang et al. 2007, Cui et al. 2011). Las NPs CeO₂ en el corazón y pulmón (Chen et al. 2016) y las NPs Ag en el hígado, riñón, corazón y cerebro (Chen and Schluesener 2008).

Una vez que ingresan a los diferentes tipos celulares, las NPs pueden acumularse como agregados en el citoplasma, mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, lisosomas y núcleo (Zucker et al. 2013, Sabella et al. 2014, Oh and Park 2014, Behzadi et al. 2017). De los principales efectos reportados son la generación de ROS, estrés oxidante, inflamación y genotoxicidad/mutagénesis (Nanda and Madan 2018).

1.2.5 Regulaciones del uso de NPs en cosméticos

La FDA de los Estados Unidos y la *Royal Society* de Londres han sido de las primeras organizaciones que han tratado de normar el uso de nanomateriales en cosméticos. En el 2011, la FDA emitió *The Safe Cosmetics Act* en donde propuso que la producción de cosméticos debe seguir las mismas normativas que la de los fármacos, sin embargo, esta propuesta aún no se ha llevado a cabo. La FDA junto

con *Nanoscale Engineering and Technology* ayudan a revisar las solicitudes para el desarrollo de productos cosméticos que contienen nanomateriales. Ambas organizaciones sugirieron una guía de estudios básicos de pruebas de toxicidad dérmica. En esta destacan ensayos de viabilidad celular, irritación/sensibilización, foto-toxicidad, foto-alergenicidad y máxima absorción de componentes(http://emergingtech.foe.org.au/wp-content/uploads/2014/08/Cosmetics_nanotoxicology-and-skin-penetration-October-20062.pdf). En el 2015, la FDA sugirió que todos los productos de uso tópico con nanomateriales deben ser probados en todo tipo de piel, tanto intacta como dañada. Además, solicitan tomar en cuenta, sin ser una obligación para las empresas cosmetológicas, que todo producto debe llevar un etiquetado que indique las características fisicoquímicas de los nanomateriales, rutas de exposición, formulación y número de partículas por aplicación.

En contraparte, *The Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products* emitida también por la FDA indica que no se establecen definiciones regulatorias para los conceptos nanotecnología, nanomateriales, nanoescala u otros términos relacionados. Debido a que los nanomateriales no infringen ninguna ley puesto que no están considerados como compuestos prohibidos (Section 301(a) de la *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* (the FD&C Act) (21 U.S.C. 331(a))). En los Estados Unidos no se requiere un etiquetado que especifique los ingredientes de los cosméticos debido a que esto queda como responsabilidad de quien los produce y quien los consume. Además en ese país, los productos cosméticos que contengan nanomateriales no necesitan la aprobación de la *FDA* antes de entrar al mercado.

Por otra parte, la Unión Europea se destaca por la implementación de regulaciones como *Product Submission File* que incluye un reporte de seguridad de cosméticos y una declaración de conformidad. Este reporte se guarda hasta 10 años después de poner a la venta los productos. Además, los miembros de estos países poseen *The Cosmetic Notification to the Committee* con la que se genera una base de datos con cada ingrediente usado en los cosméticos y se asocia a una red de centros o

instituciones especialistas en el área, en caso de que algún cosmético muestre efectos dañinos. En la Unión Europea, se obligan las etiquetas que especifiquen los posibles riesgos al usar un cosmético.

En el 2006, a través de *Notes of Guidance for the Testing of Cosmetics Ingredients and their Safety Evaluation*, se sugirió que las características a evaluar en cosméticos con nanomateriales son la descripción de características fisicoquímicas, y datos de absorción/penetración, toxicidad (aguda/subcrónica), irritación (piel/mucosas), foto y genotoxicidad (Nafisi and Maibach 2017). Estos requerimientos fueron descritos únicamente para máscaras de pestañas y filtros solares. La Unión Europea a través *The Cosmetics Products Notification Portal* emitió un listado elaborado por productores, importadores y terceras personas, en donde solicita que se describan todos los ingredientes que contienen los cosméticos, incluyendo nanomateriales (artículo 16, http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetics_1223_2009_regulation_en.pdf). El documento debe de publicarse seis meses antes de que el producto entre a la venta, ya que en caso de que exista alguna duda de los efectos de los nanomateriales usados, la misma Comisión Europea puede solicitar un análisis completo de riesgos del producto.

Otros de los países pioneros en la implementación de la regularización de nanomateriales en cosméticos es Austria. A través de *The Therapeutic Goods Administration* regula las medicinas y los bloqueadores solares que contienen nanomateriales. *The National Industry Chemical Notification and Assessment Scheme*, es la encargada de modular la seguridad de los ingredientes usados en maquillajes y cuidado personal (Nafisi and Maibach 2017). Australia, en acuerdo con Canadá, han mostrado su preocupación acerca de las regulaciones de los nanomateriales en los cosméticos, sin embargo, solo han logrado un etiquetado de los ingredientes.

Aunque aún no se cuenta con una regulación a nivel internacional para la utilización de nanomateriales en los cosméticos, existen algunas organizaciones encargadas

de monitorear su uso, entre ellas, la *Environmental Protection Agency (EPA)*, the *Technical Committees ISO229*, *The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)*, *Global Issues in Nanotechnology (GIN)*, the *NSET Subcommittee*, the *Nanotechnology Environmental and Health Implications (NEHI)*, y la *Public Participation in Nanotechnology (NPEG)* (Madan and Nanda 2018).

1.2.6 Nanotoxicología

Actualmente la producción de nanomateriales se ha incrementado exponencialmente como resultado de la demanda en la utilización de las diferentes disciplinas. Esto ha resultado también en un incremento en la interacción con los sistemas biológicos. Ante ello, la nanotoxicología se encarga de estudiar la toxicidad de los nanomateriales con base en sus propiedades fisicoquímicas sobre la dosis respuesta y de acuerdo al potencial de riesgo en los sistemas biológicos (Oberdörster et al. 2005, Oberdörster, Stone and Donaldson 2007, Jiang et al. 2008).

Desde el año 2005 se publicaron los primeros esquemas que muestran que las principales rutas de exposición de las NPs en el ser humano son la inhalación e ingestión (Oberdörster et al. 2005). Algunos estudios reportan que la acumulación, en modelos murinos, puede darse en el corazón, hígado, riñón y cerebro, lo cual depende del tipo de NPs (Chen and Schluesener 2008, Robertson et al. 2010). Sin embargo, a la fecha, los estudios asociados a los efectos dérmicos siguen siendo pocos. Bajo el mismo orden de ideas, la nanobiotecnología es una rama de la nanotecnología que se encarga de estudiar el diseño y la manipulación de las diferentes NPs a través de las interacciones biológicas y bioquímicas. Esta rama junto con la nanotoxicología ha sido la antesala de los estudios del uso de las NPs en la terapéutica y cosmética.

1.3 MECANISMOS DE TOXICIDAD DE LAS Mt-NPs EN LA PIEL

Recientemente, los mecanismos de toxicidad de los nanomateriales se han estudiado intensamente debido a que muchos de ellos muestran diferentes respuestas. Sin embargo, un mecanismo importante y común de toxicidad celular es la generación de ROS que puede resultar en daño oxidante.

1.3.1 Especies reactivas de oxígeno

Las ROS, se producen como resultado del metabolismo celular normal, son necesarias para la modulación de múltiples eventos celulares, como sobrevivencia o muerte celular, diferenciación, proliferación, transducción de señales, expresión génica, regulación de proteínas y producción de factores ligados a la inflamación que estimulan mitocondrias y enzimas antioxidantes (Sharifi et al. 2012). Las ROS se dividen en dos grupos: radicales libres (moléculas que contienen uno o más electrones no apareados y que dan reactividad a la molécula) y no radicales (dos radicales libres comparten sus electrones no apareados). Los principales organelos involucrados en la generación de ROS son las mitocondrias, retículo endoplasmático, peroxisomas, microsomas y complejos NOx de las membranas celulares. Los cuales pueden ser estimulados por fuentes extracelulares como radiación UV, contaminantes ambientales y nanomateriales.

1.3.1.1 Generación de ROS por las NPs

Los materiales de tamaño cercano a los átomos ($\leq 100\text{nm}$) muestran propiedades diferentes, sobre todo en el incremento del área de superficie y el comportamiento de los electrones en la nanopartícula. Esto se explica a través de la relación volumen área de un cubo. Mientras el volumen se mantiene el área se incrementa y los lados disminuyen, es decir, si un cubo de material de lado l , se reduce hasta obtener un nanocubo, la superficie específica se incrementa, debido a que es inversamente proporcional al lado de dicho cubo. De forma que, mientras más pequeña es una

NP se incrementan los sitios activos en su superficie aumentando la reactividad química y liberando espacios para la catálisis bioquímica. Esto puede provocar modificaciones estructurales, cambios en las propiedades electrónicas de la superficie y formación de grupos reactivos. Los oxidantes y los radicales libres dispuestos en la superficie de la NP modulan la generación ROS. Hasta hoy se han descrito tres vías de generación de ROS por nanomateriales, las cuales involucran (i) grupos funcionales pro-oxidantes sobre el área de superficie reactiva de las NPs, (ii) ciclo redox activo en la superficie de las NPs debido al tipo de metal de transición e (iii) interacción NP-célula (Manke, Wang and Rojanasakul 2013, Wang et al. 2018, Mortezaee et al. 2019).

De las primeras ROS producidas por la interacción de las Mt-NPs-sistemas biológicos son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$) vía la reacción de Fenton (Valko et al. 2006). Mientras que, las reacciones de Haber-Weiss interactúan con iones metálicos oxidados y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) para producir $HO\cdot$ (Thannickal and Fanburg 2000, Sharifi et al. 2012).

Otro tipo de especies reactivas producidas son las de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), entre ellas los radicales libres (NO, dióxido de nitrógeno) o los no radicales (catión nitronio y peroxinitrito) (Chaverri, Cardenas and Chirino 2018). Las RNS pueden usar fácilmente S-nitrosotioles para modificar moléculas de señalización como cinasas y factores de transcripción. Diferentes enzimas en la respiración mitocondrial pueden ser inhibidas por las RNS lo que produce un agotamiento de ATP y una consecuente disminución de energía celular (Coleman 2001). La producción de ROS y RNS por las Mts-NP está mediada por diferentes factores, entre ellos, el tipo de síntesis, recubrimientos, tipos celulares, medios fisiológicos, duración de la exposición, entre otros.

Uno de los primeros organelos afectados por la interacción NP-célula es la membrana celular. Se ha reportado que después de esta interacción, se desarrollan vesículas endocíticas que se visualizan en el citoplasma Figura 7-A (1,2) y que tienden a liberar iones (3). Este proceso está ligado a alteraciones en la morfología,

fluidez y aumento en la permeabilidad celular (Abdal Dayem et al. 2017). La liberación de iones asociada a la generación de ROS y RNS puede provocar cito y genotoxicidad por lipoperoxidación de membranas, alteraciones en la mitocondria (daños al ADN y alteraciones oxidativas), proteínas (generación de aductos y disfunción enzimática) y en el núcleo (mutación genética) (Figura 7-B) (Fu et al. 2014).

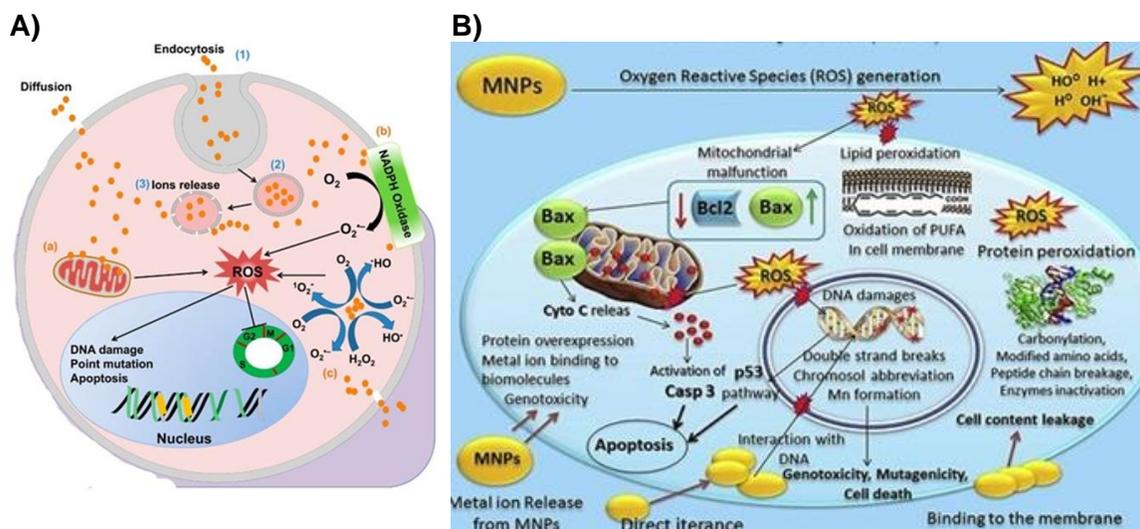


Figura 7. Mecanismos de generación de ROS por Mts-NPs.

A) Desarrollo de vesículas (1), endocitosis (2) y liberación de iones (3). **B)** Cito y genotoxicidad desarrollada por NPs. Tomado de y modificado de (Abdal Dayem et al. 2017, Fu et al. 2014, Mortezaee et al. 2019).

1.3.2 Mecanismos de sobrevivencia

El estrés oxidante se define como un desbalance en la producción de ROS y la habilidad de la célula para contrarrestarlo. Ante la generación de este, la célula cuenta con diferentes mecanismos de sobrevivencia, entre ellos los antioxidantes.

1.3.2.1 Antioxidantes

Las células cuentan con diversos mecanismos de protección, tales como enzimas antioxidantes y detoxificantes de fase I y II (Konigsberg 2007). Este sistema constituye la primera línea de defensa en contra de los radicales libres, ROS y RNS generados por interacciones con xenobióticos. En la fase I participan enzimas que

metabolizan carcinógenos y xenobióticos, principalmente la familia de los citocromos P450; estos llevan a cabo reacciones de óxido-reducción en donde introducen o exponen grupos funcionales en dichas moléculas. En la fase II participan enzimas que reducen la electrofilicidad de los metabolitos carcinógenos y xenobióticos modificados mediante su conjugación enzimática con ligandos endógenos (Konigsberg 2007). Entre estas se encuentran enzimas del metabolismo (glutación-s-transferasa, NADPH: quinona-oxidoreductasa-1, UDP-glucoronil-transferasa, sulfotransferasas, aflatoxina B1, peroxiredoxina 1, hidrolasa epóxido microsomal) y antioxidantes (catalasa, SOD, hemo oxigenada-1, glutación (GSH), glutación peroxidasa (GPx) y glutación reductasa (GR)).

1.3.2.1.1 Glutación

El GSH (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), un tiol no proteico abundante en las células de los mamíferos, se sintetiza en el citoplasma. El tiol del sulfhidrilo (SH) de las cisteínas participa en el metabolismo de xenobióticos, actuando como un agente reductor y antioxidante manteniendo la homeostasis redox (Franco and Cidlowski 2012). El glutamato-cisteína ligasa (GCL) o γ -glutamil-cisteína-sintetasa (γ -GCS) es la primera enzima de la ruta biosintética del GSH. El enlace peptídico entre el glutamato y la cisteína protege al GSH de la hidrólisis de las peptidasas intracelulares. La reducción del GSH depende del reciclaje de la forma oxidada, glutación disulfóxido (GSSH). El GSH es reciclado por medio de la GR que requiere de la actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PH) para proveer los equivalentes reductores necesarios (NADPH), como se muestra en la Figura 8. La formación del estado oxidado se produce por la interacción con radicales libres y la presencia de la enzima GR o cuando el GSH actúa como cofactor para la glutación peroxidasa (GPx) (Traverso et al. 2013, Franco and Cidlowski 2012). El aumento en la concentración de GSSG incrementa el coeficiente GSSG/GSH y es indicativo de la presencia de estrés oxidante.

El metabolismo del GSH está ampliamente ligado a la detoxificación de ROS/RNS llevada a cabo en dos reacciones. En la primera reacción se da la interacción no

enzimática con radicales ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} y NO^{\cdot}) y en la segunda reacción se proporciona un electrón para la reducción de peróxidos en una reacción catalizada por la GPx. Este mecanismo de defensa antioxidante puede evitar la acumulación de los radicales libres y evitar daños a macromoléculas (Franco and Cidlowski 2012).

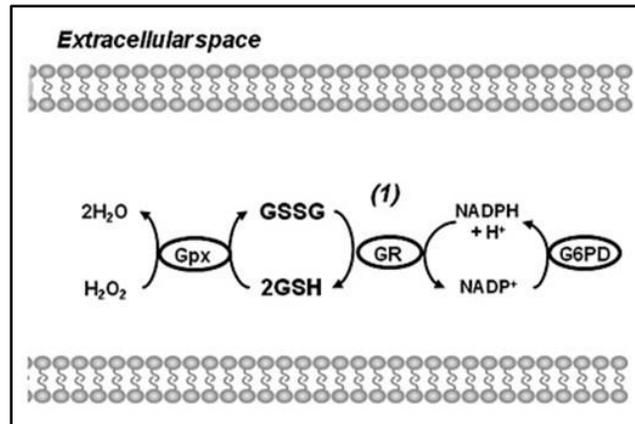


Figura 8. Metabolismo de las ROS por la vía del GSH.

En condiciones normales, los niveles de GSH mantienen un ambiente intracelular reducido. El flujo de salida de GSH sensibiliza a las células a estrés oxidante mientras que el transporte de GSSG puede servir como un mecanismo de protección. Después de la generación de estrés oxidante, el GSH elimina los peróxidos por acción de la GPx que genera GSSG como subproducto. El GSSG puede reducirse a GSH por el sistema GR/NADPH con la ayuda de la G6PD. Tomado y modificado de (Franco and Cidlowski 2012).

1.3.2.3 Metabolismo celular

Existen diferentes mecanismos en el interior de la célula que se activan o desactivan e incluso aceleran o disminuyen como respuesta a un estrés. El metabolismo celular, está conformado por un gran número de vías involucradas en el buen funcionamiento celular. Dentro de estas vías se encuentran la glucólisis y respiración mitocondrial.

1.3.2.3.1 Glucólisis y respiración celular

En los sistemas biológicos, la oxidación de la glucosa es la fuente principal de energía celular. Esta se lleva a cabo en el citoplasma (glucólisis) y en las membranas celulares y mitocondrias (respiración celular).

La glucólisis es un proceso en el cual una molécula de glucosa se escinde produciendo energía, en dos moléculas de tres carbonos de ácido pirúvico produciendo energía. Inicialmente se invierte energía por la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula de ATP, una por cada paso. En seguida se reduce una molécula de NAD⁺ a NADH y H⁺ almacenándose parte de la energía producida por la oxidación del gliceraldehído fosfato. En los pasos finales las moléculas de ADP toman energía del sistema fosforilándose a ATP.

La respiración celular se desarrolla en dos etapas, el ciclo de Krebs y transporte de electrones. En este proceso, las moléculas de tres carbonos de ácido pirúvico producido en la glucólisis son degradados a grupos acetilo de dos carbonos, los cuales posteriormente entran al ciclo de Krebs. En estas reacciones, el grupo acetilo de dos carbonos es oxidado a dióxido de carbono. Durante la oxidación de cada grupo acetilo, se reducen cuatro aceptores de electrones (tres NAD⁺ y un FAD) y se forma otra molécula de ATP. Durante el ciclo de Krebs los carbonos donados por el grupo acetilo se oxidan a dióxido de carbono y los electrones pasan a los transportadores de electrones. La coenzima A es el intermediario entre la oxidación del ácido pirúvico y el ciclo de Krebs. Se necesitan dos vueltas del ciclo para completar la oxidación de una molécula de glucosa. De forma que el rendimiento energético total en este ciclo para una molécula de glucosa es, dos moléculas de ATP, seis NADH y dos de FADH₂.

La etapa final de la respiración concluye con el transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria. A lo largo de este proceso, los electrones de alta energía transportados por el NADH de la glucólisis y el FADH₂ del ciclo de Krebs van cuesta abajo hasta el oxígeno. En la cadena de electrones, en sus tres etapas, se desprende una gran cantidad de energía que impulsa el bombeo de protones (H⁺) hacia el exterior de la matriz mitocondrial generando un gradiente electroquímico a través de la membrana interna. De forma que, cuando los electrones pasan a través del complejo ATP sintasa, a medida que vuelven a fluir a favor del gradiente electroquímico al interior de la matriz, la energía liberada se

utiliza para formar moléculas de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, (<http://www.curtisbiologia.com/node/90>).

1.3.3 Autofagia

La autofagia tiene un papel esencial en la diferenciación, desarrollo y en la respuesta celular al estrés. La muerte celular autofágica se define morfológicamente por la vacuolización masiva del citoplasma en ausencia de la condensación de la cromatina (Franco and Cidlowski 2012). Este proceso se inicia por la envoltura selectiva de componentes citoplasmáticos por un fagoforo que forma una estructura cerrada de doble membrana llamado autofagosoma. El fagosoma se fusiona posteriormente con el lisosoma para convertirse en un autolisosoma cuyo contenido es degradado por hidrolasas lisosomales (He and Klionsky 2009). Una de las funciones importantes de la autofagia es la eliminación de sustratos citosólicos ubiquitinados o proteínas propensas a agregarse mediante proteínas como p62/sequestroma 1 (SQSTM1) y LC3 II (Ou et al. 2016). La proteína p62 se une directamente a proteínas poli-ubiquitinadas a través del dominio asociado a ubiquitina y a LC3-II (proteína ligera asociada a microtúbulos 1 cadena ligera 3) llevando a la degradación por el autolisosoma (He and Klionsky 2009).

La maquinaria de la autofagia activada por nanomateriales es un intento de degradar lo que la célula percibe como extraño en el citoplasma (Stern, Adisheshaiah and Crist 2012). Se ha reportado la ubiquitinación de los nanomateriales (Figura 10-A) directa o indirectamente a través de la agregación de proteínas, sugiriendo que las células seleccionan a las NPs de forma similar a los patógenos (Calzolari et al. 2010). Durante este proceso, se produce la alteración de la señalización dependiente de estrés oxidante (estrés al retículo endoplasmático, daño mitocondrial) (1), supresión de la señalización de Akt-mTOR (2) y alteración de la autofagia relacionada a la expresión de gen/proteína (3) como se muestra en la Figura 9. En queratinocitos cultivados, la exposición a NPs genera la acumulación de autofagosomas y esto es considerado un mecanismo citotóxico (Wang et al. 2018).

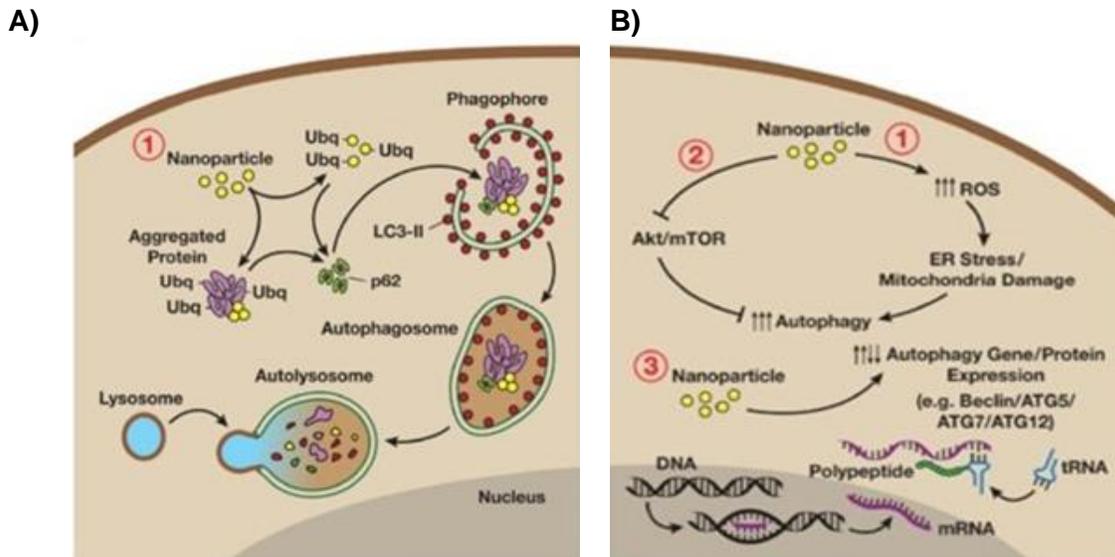


Figura 9. Autofagia inducida por NPs.

A) En el proceso de autofagia intervienen las proteínas p62/LC3 II similar a la vía de autofagia por patógenos. **B)** Alteración vías de señalización por autofagia. Tomado de (Stern et al. 2012)

1.3.4 Inflamación

Una vez que las Mt-NPs ingresan a los estratos profundos de la piel, éstas pueden transportarse por ganglios linfáticos y liberar iones metálicos que activan células TCD4⁺ específicas y respuestas mediadas por IL-7 (Huang, Wu and Aronstam 2010, Yoshioka et al. 2017) como se muestra en la Figura 10.

El NO es uno de los mediadores más importantes en el sistema inmune y su disfunción está ligada enfermedades del mismo tipo (Coleman 2001). La producción de NO por las Mt-NPs puede estar mediada por la óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial (eNOS) o inducible (iNOS) (Arancibia et al. 2016). Se ha reportado que las Mt-NPs estimulan la regulación positiva de ambos mediadores a través de macrófagos y la activación de vías de señalización asociadas a la inflamación como la proteína activada por mitógeno quinasas (PI3K) y el factor de transcripción kβ (NF-kβ). (Mortezaee et al. 2019, Nishanth et al. 2011, Suhail et al. 2015). Este último activado por estrés oxidante y relacionado a la inflamación crónica cuando su activación es persistente. Estas vías de señalización incrementan la producción de

citocinas, que son transportadas por el sistema circulatorio al sitio de la inflamación (Grivennikov, Greten and Karin 2010).

Algunos trabajos indican que la exposición a las Mt-NPs a bajas concentraciones no genera efectos inflamatorios debido a la forma de eliminación de estas por las células. Sin embargo, cuando las concentraciones son mayores, las respuestas inflamatorias, ya sea por acumulación de las NPs o no, están ligadas a la generación de ROS (Piktel et al. 2019). Muchos de los reportes indican que ciertos materiales tienen la capacidad de generar daño mitocondrial severo que conduce a la muerte celular sin activar las respuestas inflamatorias (Hayashi et al. 2013). Otros hacen la relación de las respuestas crónicas inflamatorias con la generación de cáncer (Park et al. 2009). Sin embargo, los efectos siguen siendo poco claros y asociados a las características fisicoquímicas de las NPs, además del tipo de exposición (aguda, crónica) al cual se encuentren sometidos los sistemas biológicos.

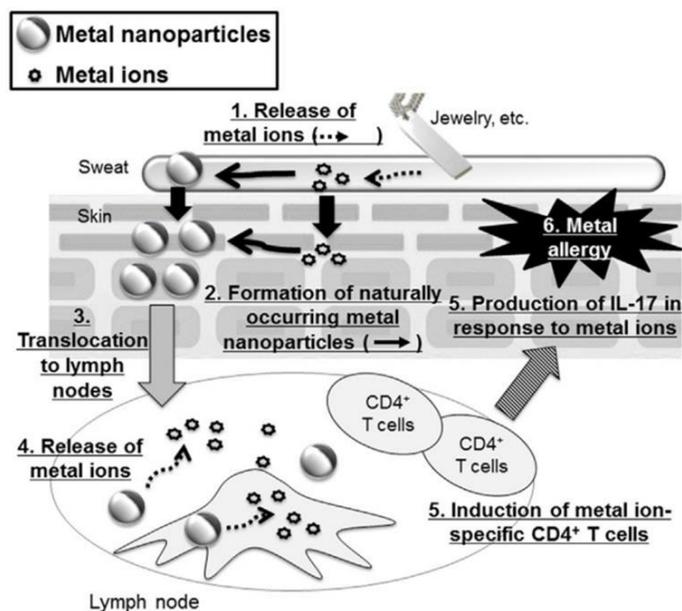


Figura 10. Respuestas inflamatorias de las Mt-NPs en piel. La exposición a las NP-Mt además de provocar respuestas inflamatorias puede desencadenar respuestas alérgicas. Tomado de (Yoshioka et al. 2017).

1.3.5 Senescencia

La senescencia se define como un estado celular de toma de decisiones, en donde se presentan alteraciones fenotípicas (incremento de tamaño) y metabólicas, detención del ciclo celular, alteraciones en el ADN, cambios en la heterocromatina, incremento en la enzima β -galactosidasa y secreción de citocinas. Las células senescentes son incapaces de mostrar todos los marcadores. La inducción a senescencia está asociada a la exposición a radiación UV/ γ , hiperoxia, estrés oncogénico, alteraciones de la autofagia, inhibición del proteosoma y estrés oxidante (Triana-Martinez, Gomez-Quiroz and Konigsberg 2012). Reportes recientes han demostrado que el estrés generado por las Mt-NPs son capaces de inducir el estado senescente en fibroblastos humanos (Li et al. 2019b). Una de las primeras propuestas para describir la senescencia fue la del acortamiento de telómeros. Este se evidencio en las células humanas normales cultivadas, las cuales mostraron una capacidad limitada para dividirse *Límite Hayflick* (Hayflick and Moorhead 1961). Este estado celular no se caracteriza por el típico desgaste a través del tiempo, como en el caso del envejecimiento.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Hasta el año 2013 se generaron al menos 1814 productos cosméticos que contienen NPs y que están disponibles al consumidor. Hoy en día no se cuenta con una regulación o vigilancia acerca de los posibles riesgos asociados a la piel.

Las Mt-NPs como TiO_2 , CeO_2 y Ag han sido ampliamente usadas en productos cosméticos. La mayoría de los estudios se han enfocado a evaluar la toxicidad de las Mt-NPs a concentraciones tóxicas ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$) sin evaluar otro tipo de eventos como la muerte celular o la alteración de la homeostasis. Ante la ausencia de esta, se ha considerado seguro el uso de las Mt-NPs.

Es necesario elaborar estudios para evaluar los posibles efectos de las Mt-NPs a concentraciones sub-tóxicas sobre la proliferación, balance proteostático, balance redox y metabolismo en queratinocitos humanos.

1.5 HIPÓTESIS

A concentraciones sub-tóxicas, las Mt-NPs de TiO_2 , CeO_2 y Ag afectarán la proliferación y homeostasis celular (balance proteostático, balance redox y metabolismo) que es importante para la sobrevivencia del queratinocito humano.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las alteraciones en la proliferación, balance proteostático, balance redox y metabolismo celular por la exposición sub-tóxica a las Mt-NPs de TiO₂, CeO₂ y Ag en un modelo celular de queratinocitos humanos.

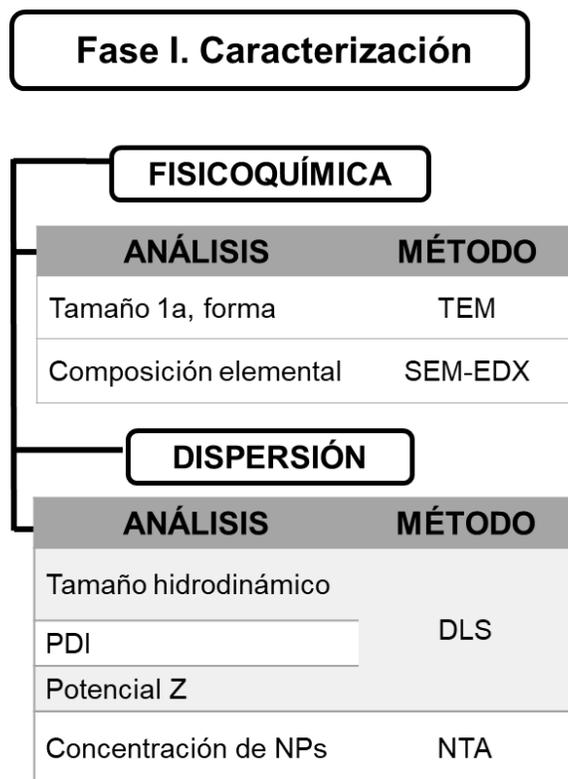
1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las Mt-NPs de TiO₂, CeO₂ y Ag.
2. Determinar los efectos en la proliferación y la citotoxicidad de las Mt-NPs TiO₂, CeO₂ y Ag sobre el cultivo celular de queratinocitos humanos.
3. Determinar si las Mt-NPs de TiO₂, CeO₂ y Ag alteran la proteostasis celular e inducen senescencia en el cultivo celular de queratinocitos humanos.
4. Determinar si las Mt-NPs de TiO₂, CeO₂ y Ag alteran el balance redox y el metabolismo celular en el cultivo de queratinocitos humanos.

2. MÉTODOS

El diseño experimental se realizó en dos fases. La Fase I corresponde a la caracterización fisicoquímica de las Mt-NPs y su dispersión (Figura 11-A). La Fase II corresponde a la evaluación de los efectos celulares por exposición a las Mt-NPs, (B). En ambos esquemas se muestran las técnicas realizadas.

A)



B)

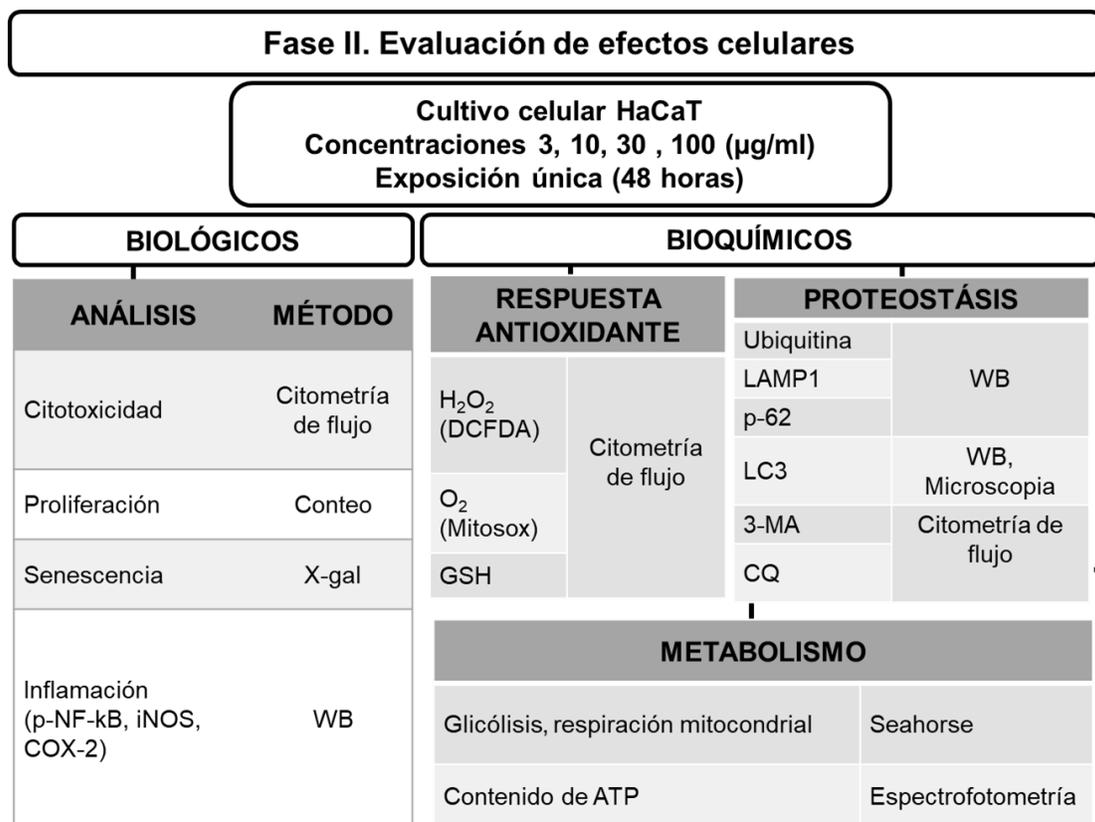


Figura 11. Diseño experimental.

A) Fase I, caracterización fisicoquímica de las Mt-NPs. **B)** Fase II, efectos celulares por exposición a las Mt-NPs.

2.1 FASE I. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LAS Mt-NPs. Microscopía de transmisión electrónica y microscopía electrónica de barrido

Las características de forma y tamaño fueron determinadas a través de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) y la composición elemental se determinó por Microscopía Electrónica de Barrido- Espectroscopia de Energía Dispersiva de rayos X (SEM-EDX, por sus siglas en inglés).

2.1.1 Principio

La determinación de tamaño y forma de las Mt-NPs se realizó por TEM. Este permite observar diferentes muestras en un rango menor al de la longitud de onda que

abarca la luz visible en el espectro electromagnético (de Ley de Abbe). Este tipo de microscopia permite dirigir una cantidad de electrones hacia la muestra que se desea aumentar. De forma que muchos de ellos colisionan con la muestra y otros la traspasan formando una imagen aumentada. Este fenómeno está en función al grosor y tipo de átomos de la muestra.

La determinación de la composición elemental se realizó por SEM-EDX. Este permite explorar la superficie de la muestra punto por punto. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz de luz concentrado de electrones. Estos electrones se dispersan en la muestra y son contados. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel, a medida que el haz de electrones barre la muestra se construye la imagen a observar. Por otra parte, los detectores de energía dispersiva detectan los rayos X emitidos por la muestra, lo que permite un análisis elemental. El uso de estos detectores produce un conjunto único de picos en su espectro de rayos X.

2.1.2 Procedimiento

Las Mt-NPs se obtuvieron de Meliorum Technologies. Estas fueron suspendidas en agua ultra pura estéril (Aqua Solutions) a una concentración de 1 mg/ml y fueron sonicadas en dos periodos de 5 minutos (Amplitud: rTiO₂ [15%], CeO₂ [22%] y Ag [30%]) con un sonicador Branson 400 W. La amplitud fue optimizada para cada material para obtener los tamaños más pequeños y estables por 48 horas.

Para caracterizar la morfología y el tamaño primario, 10 µg/ml de Mt-NPs fueron colocadas en una laminilla de carbón Lacey Formvar y fueron examinadas por TEM (JEOL, JEM-ARM200F). Se contaron al menos 200 NPs para generar la distribución de tamaño el cual fue calculado de los diámetros individuales de cada partícula. El análisis fue realizado con el Software Image J (NIH).

El mapeo elemental de las Mt-NPs fue elaborado a través de EDX en un microscopio AURIGA 3916-FE SEM que opero con un acelerador de voltaje de 120 kV a una resolución de 120 eV.

2.2 Análisis de seguimiento de nanopartículas

El tamaño hidrodinámico y la concentración de las Mt-NPs en agua fueron determinados por el Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés). Este utiliza la dispersión y el movimiento Browniano de las muestras suspendidas en líquido. Los datos son registrados por una cámara digital en tiempo real que obtiene la distribución de tamaño de las NPs. NTA usa la ecuación de Stokes-Einstein para calcular el tamaño hidrodinámico individual de cada NP. Una vez que el software calcula el coeficiente de dispersión de las nanopartículas (eje X, Y) lo extrapola convierte a un diámetro hidrodinámico equivalente a la de una esfera.

2.2.1 Principio

La técnica se caracteriza por hacer pasar un rayo láser a través de la cámara de la muestra. Las partículas que se encuentran en suspensión chocan con el haz para dispersar la luz, de tal manera que pueden verse a través de un microscopio. La cámara captura un archivo de video de las partículas en estado de movimiento Browniano. El software de NTA realiza un seguimiento de partículas individual y utiliza la ecuación Stokes-Einstein para calcular sus diámetros hidrodinámicos. La técnica proporciona mediciones de alta resolución de tamaño, concentración y agregación de las partículas. Mientras que un modo de fluorescencia proporciona resultados específicos para partículas marcadas. Esta técnica proporciona monitoreo en tiempo real de cambios sutiles en las características de las poblaciones de partículas, con una validación visual para confirmar el análisis.

2.2.2 Procedimiento

Realizamos la dispersión de las Mt-NPs anteriormente descritas. El ensamble de la cámara se siguió de acuerdo las instrucciones del equipo y una vez realizado este paso se inyectaron lentamente, con una jeringa, 5 ml de agua desionizada antes de pasar 1 ml de la solución de las Mt-NPs sobre la rejilla del microscopio. Nos aseguramos de que la cámara quedara saturada de la suspensión. Seleccionamos

el fluido y se enfocó cada muestra dependiendo del origen relacionado a las propiedades ópticas de cada material. El análisis fue realizado con el software NANOSIGHT NS300, MAN0545-01-EN-00.

2.3 Dispersión dinámica de luz

El tamaño y distribución de las NPs los determinamos midiendo los cambios aleatorios en la intensidad de luz de una suspensión de NPs.

2.3.1 Principio

El tamaño hidrodinámico de las NPs fue calculado por el movimiento Browniano, usando la Dispersión de Luz Dinámica (DLS, por sus siglas en inglés). Las partículas pequeñas tienen un movimiento más rápido que las partículas grandes. Estos movimientos son registrados en el tiempo. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad de movimiento Browniano y un tamaño promedio de partícula relacionado a la ecuación de Stokes-Einstein.

Cuando las NPs son puestas en un medio líquido, tienden a atraer cargas opuestas a las que estas presentan. Los iones (cationes o aniones) cerca de la superficie de la partícula muestran uniones fuertes y forman una *Capa Difusa* que generan un límite entre las demás capas formadas por otras partículas en suspensión. El *potencial ζ* , es la carga que la partícula adquiere en el medio, la cual depende del pH, fuerza iónica y la concentración de las NPs. La movilidad de estas partículas es medida por Electroforesis *Dopler Laser* (LDE, por sus siglas en inglés) el cual genera una medición entre la velocidad de las NPs en solución, campo eléctrico aplicado, viscosidad y constante dieléctrica (Berne and Pecora 2000).

2.3.2 Procedimiento

Las Mt-NPs se dispersaron como se describió previamente a una concentración de 1 mg/ml. Los índices de refracción usados fueron obtenidos de la compañía Malvern (https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/

booking/particlesize/sample_dispersion__refractive_index_guide) y cada uno de ellos fue dependiente del tipo de material. Se tomó 1 ml de solución y se colocó en una celda de poliestireno (1cmX1cmX 5cm).

2.4 Caracterización por dispersión

Las Mt-NPs fueron sometidas a las mismas condiciones de dispersión previamente descritas. Se agregó albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) a las concentraciones de 2, 5, 10 mg/ml y se sonicaron en dos periodos de 5 minutos cada uno con la misma amplitud con la cual se obtuvo el tamaño menor de cada NP. Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento. Se determinó la mejor estabilidad a través del tiempo por medio de la lectura en DLS. Finalmente, la suspensión se diluyó en medio de cultivo con 0.5% de suero fetal bovino (SFB, por sus siglas en inglés) para obtener las concentraciones finales de NPs. Usamos un Sonicador Ultrasonic Processor 100VAC-120 VAC @50/60 Hz 125 watts, 20 kHz.

2.5 FASE II. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CELULARES. Modelo celular

Se utilizó la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT. Son queratinocitos inmortalizados obtenidos histológicamente de piel sana de adulto. Son adherentes, crecen en colonias, presentan morfología redondeada no planar y muestran un alto índice metabólico. Su tiempo de duplicación es de 24 horas.

La línea celular HaCaT se creció en medio DMEM/F12 1:1 (Hyclone SH30023) suplementado con 10% de SFB (Atlanta Biologicals S11150), penicilina (200 U/ml) -estreptomicina (200 µg/ml) (Lonza 09-757F), 2 mM L-glutamina (HyClone SH30034) y se mantuvo a 37 °C en 5 % CO₂ y humedad atmosférica. Considerando que los métodos de administración de NPs definen la interacción partícula-célula y

la toxicidad, las Mt-NPs se mezclaron en medio de cultivo suplementado con 0.5% SFB antes de su administración a las células; 24 horas después de sembradas (cambio de medio). La BSA fue filtrada (ThermoFisher Scientific BP1600) (0.22 μ nylon) y añadió a una concentración final de 5 mg/ml para estabilizar el tamaño hidrodinámico y la dispersión de las Mt-NPs. Las imágenes de fase de contraste de las células fueron tomadas usando un objetivo Zeiss 20x/0.3 LD-A-Plan Ph1 en una cámara Moticam 580 (5.0 MP).

La cosecha de las células se realizó cuando estas alcanzaron una confluencia del 80%. Las células fueron lavadas con PBS antes de iniciar cualquier tratamiento. El tiempo de exposición fue de 48 horas.

2.6 Proliferación

Las células se cultivaron en platos de 12 pozos a la densidad de 2,659, 5,319 y 10,638 células/cm² (sugerido por *Cell Lines Service*). Después de 24 horas de la siembra, las células fueron tratadas con las Mt-NPs por el tiempo indicado. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con PBS y cosechadas con Tripsina (Hyclone SH30042) diluida en PBS. Se utilizó azul de tripano (0.2%) para diferenciar células vivas de células muertas. Las células fueron contabilizadas por un hemocitómetro en un microscopio de fase de contraste. Utilizamos un 80% de viabilidad para todos los experimentos.

2.7 Viabilidad celular

2.7.1 Liberación de lactato deshidrogenasa

La liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) se cuantifica en el medio de cultivo libre de células. Una vez que las membranas plasmáticas son permeadas/comprometidas por la exposición a xenobióticos, esta enzima se detecta.

2.7.1.1 Principio

La actividad de la LDH se considera una técnica no destructiva. La medición de esta enzima se realiza en dos pasos. Primero, la presencia de la LDH permite la conversión de lactato a piruvato con una reducción paralela de NADH/H⁺. En el segundo paso, el NADH/H⁺ mediante el catalizador diaforasa, transfiere el 2H⁺ a la sal de tetrazolio (cloruro de yodo-nitrotrifenil tetrazolio) que muestra una coloración amarillo pálido, reduciéndolo a formazán (color rojo) (Mosmann 1983). El incremento de la LDH indica daño celular irreversible y es proporcional a la cantidad de formazán cuantificado durante un periodo de tiempo específico (Fotakis and Timbrell 2006).

2.7.1.2 Procedimiento

Para la detección de la LDH las células fueron sembradas y expuestas a las concentraciones establecidas de NPs en los tiempos definidos. Una vez terminado el tiempo de exposición se utilizó el Kit comercial de Roche (*Cytotoxicity Detection Kit*). Se tomó 50 µl del medio de cultivo libre de células y se le añadió 50 µl del medio de trabajo (250 µl de catalizador y 11.25 µl de sal de tetrazolio). La reacción se incubo en obscuridad, temperatura ambiente y agitación por 30 minutos. La absorbancia fue determinada a 490 nm por un espectrofotómetro *Infinite M200 PRO Multimode Microplate Reader TECAN*.

2.7.2 Integridad de la membrana plasmática

La viabilidad celular fue determinada usando citometría de flujo a través de la detección del daño a la membrana plasmática con la tinción de yoduro de propidio (PI) (SIGMA-Aldrich).

2.7.2.1 Principio

El PI es un colorante catiónico impermeable a membranas celulares intactas. Cuando la célula está muerta o en proceso de muerte, el PI entra con facilidad

al interior de la célula y se une a los ácidos nucleicos intercalándose al ADN o ARN emitiendo una coloración roja fácilmente detectable.

2.7.2.2 Procedimiento

Las células tratadas con Mt-NPs fueron lavadas dos veces con PBS antes de ser teñidas con PI. Se les adiciono la concentración de 1 µg/ml de PI 15 minutos antes de ser leídas en el citómetro de flujo. Usamos un Citómetro Cytec Dxp10 (407 y 637nm). Se registraron 10 000 eventos (561 nm excitación, 615/25 nm emisión). Las células teñidas (+) o no (-) representan células muertas o vivas, respectivamente. Se usó el programa FlowJo 10.0. Se emplearon controles positivos con NaAsO₂ por 24 horas.

2.8 Determinación de senescencia

La senescencia fue detectada por medio de actividad de la β-galactosidasa mediante el marcaje con el colorante X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) óptimo a pH 6.

2.8.1 Principio

La actividad de la β-galactosidasa se deriva de un aumento de la actividad lisosomal. Las células que entran en senescencia muestran una coloración azul, por la interacción de la X-gal, que las diferencia de las otras. Todas las células tienen actividad de la β-galactosidasa positiva a pH 4-4.5 lo que no ocurre a pH=6, condición necesaria para que la tinción sea específica del mecanismo de senescencia.

2.8.2 Procedimiento

Las células se lavaron con PBS antes de ser fijadas con 3.5 % p/v de formaldehído/PBS por 3 minutos. Posterior a esto, las células fueron lavadas nuevamente en dos ocasiones más con PBS frío. A continuación, se les añadió el colorante X-gal (Promega V3941) bajo las instrucciones del fabricante. Se incubaron por 48 horas

en ausencia de CO₂. Finalmente se distinguieron las células positivas (azules) de las negativas (sin tinción) mediante un microscopio de campo claro.

2.9 Detección de interleucinas

Esta técnica permite la cuantificación y determinación simultánea de diferentes interleucinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, etc., con un rendimiento y eficacia alta debido a su especificidad.

2.9.1 Principio

Se utilizó el sistema de microesferas MAGPix® el cual se basa en la combinación de un inmunoensayo enzimático tipo sándwich (ELISA) y la detección por un sistema de imagen CCD (*Charge-Coupled Device*). Cada microesfera estuvo marcada en su interior con una proporción determinada de dos fluorocromos, además de una cubierta de anticuerpos específicos de captura para cada biomarcador. Las microesferas fueron analizadas en un procesador digital (MAGPIX® de Luminex Corp).

2.9.2 Procedimiento

Las muestras se homogenizaron y se centrifugaron a 3000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante fue diluido en una proporción de 1:15. El inmunoensayo se llevó a cabo bajo las especificaciones del fabricante. Antes del inmunoensayo se mezclaron las microesferas (controles y el estándar) y se preparó una curva de calibración. La placa se leyó en un procesador digital (MAGPIX®, Millipore) para cuantificar la concentración de cada biomarcador en la muestra.

2.10 Inmunodetección por Western blot

La identificación de proteínas se realizó por medio Western blot (WB) un método semicuantitativo. Este ensayo sigue varias etapas que pueden ser modificadas dependiendo el tipo de proteína de interés.

2.10.1 Principio

La técnica es utilizada para identificar proteínas específicas de una muestra compleja de proteínas. Básicamente las proteínas son separadas en un gel poliacrilamida, por medio de electroforesis en función de su peso molecular. Posterior a esto se identifica la proteína de interés en una membrana de PVDF, a través de la unión a anticuerpos específicos. Finalmente, la identificación de la proteína de interés marcada se revela por un marcaje específico.

2.10.2 Procedimiento

La extracción de proteína, electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio y el WB se realizó siguiendo el protocolo de Anandhan *et al.*, 2014. Los blots fueron bloqueados e incubados con los correspondientes anticuerpos según la casa comercial. p62 (1:1000) (EPR4844 #109012) y LAMP1 (1:1000) (H4A3 #25630) fueron adquiridos de ABCAM. Anti LC3B (1:1000) (L7543) fue obtenido de SIGMA-Aldrich. La peroxidasa acoplada a los anticuerpos secundarios (1:1000) se adquirió de Cell Signaling. El anticuerpo constitutivo usado fue anti β -actina (A2228, SIGMA-Aldrich). El análisis de densitometría se realizó con el software LI-COR Image Studio Lite Software 5.2.5.

2.11 Cambios en la granularidad celular

Los cambios en la granularidad celular se detectaron por citometría de flujo. Medimos el parámetro *Side Scatter Channel* (SSC) que registra la intensidad de luz proporcional a la cantidad de estructuras citosólicas, gránulos e inclusiones en la célula. También determinamos el *Forward Scatter Channel* (FSC), que registra el tamaño celular por medio de la intensidad de la señal relacionada con el índice de refracción de las células.

2.11.1 Principio

En la citometría de flujo, básicamente se hacen pasar las células en suspensión alineadas a través de un haz luminoso. La información recabada puede agruparse en dos tipos, la generada por la dispersión de luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula al ser excitados por un rayo luminoso. Estas señales detectadas se transforman en pulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por la computadora.

2.11.2 Procedimiento

Después de haber expuesto las células a las diferentes concentraciones de las Mt-NPs (30 µg/ml, 48 horas), se desechó el sobrenadante y las células fueron lavadas con PBS frío. Posterior a esto, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos.

Las células se incubaron con PI, 10 minutos antes de la lectura en el citómetro de flujo. Usamos un Citómetro Cytex Dxp10 (407 y 637nm).

2.12 Determinación de la actividad lisosomal

El rojo neutro (rojo de toluideno) es usado para determinar la viabilidad celular por el funcionamiento del lisosoma y endosoma. Este colorante es incorporado por los organelos de las células viables por transporte activo. Posteriormente se solubilizó y cuantificó espectrofotométricamente (Borenfreud y Puerner, 1985).

2.12.1 Principio

Es un colorante catiónico que ingresa a la célula a través de la membrana celular. Este se une por medio de enlaces hidrofóbicos electroestáticos a grupos aniónicos o fosfatos de la matriz lisosomal. Este tipo de enlaces generan una protonación que es causada por un pH bajo producto de los lisosomas. El grado de captación de este colorante está en función del mantenimiento de un pH bajo relacionado (Repetto, del Peso and Zurita 2008).

2.12.2 Procedimiento

Una vez terminado el tiempo de exposición de las Mt-NPs, se reemplazó el medio de exposición por medio de cultivo DMEM 0.5% de SFB con 0.33% de rojo neutro. Las células se incubaron por dos horas y se lavaron en dos ocasiones con PBS. Posteriormente el colorante retenido por las células viables se disolvió con una solución 50% de etanol, 49% de agua des ionizada y 1% de ácido acético durante 15 minutos en agitación constante. Terminado el tiempo se determinó por espectrofotometría la densidad óptica del extracto de rojo neutro a 540 nm.

2.13 Determinación de autofagia

La determinación de autofagia se realizó por medio de la expresión de proteínas (WB) p62, LAMP1 y LC3 descrito anteriormente. Además, infectamos a las células con GFP-LC3, 24 horas antes de ser expuestas a las Mt-NPs. Usamos microscopia confocal y de epifluorescencia para visualizar los efectos.

2.13.1 Principio

La microscopia confocal se basa en eliminar la luz que emiten las muestras, ya sea reflejada o fluorescente, las cuales proceden de planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores (Boyde and Jones 1996). La microscopia confocal permite determinar la localización de moléculas de interés en cortes de tejido de seres vivos o cultivo celular acoplados a fluoróforos, así como la localización celular de proteínas o partículas unidas a moléculas reporteras.

En la microscopia de fluorescencia la imagen usa iluminación de alta densidad para excitar moléculas fluorescentes de la muestra cuando una molécula absorbe fotones, los electrones son excitados a un nivel de energía más alto. Conforme los electrones se reflejan en el estado cero, se pierde la energía en forma de

vibraciones. Como resultado el espectro de emisión se mueve a longitudes de onda más largas.

2.13.2 Procedimiento

Las células fueron infectadas con adenovirus GFP-LC3 (5 MOI, multiplicidad de infección, 24 horas). Posterior a este tiempo, las células fueron lavadas y expuestas a Mt-NPs. Marcamos las células incubándolas con LysoTracker Deep Red (1 μ M ThermoFisher Scientific) por 15 minutos y las lavamos antes del análisis. La imagen fluorescente fue tomada con el Sistema Confocal Nikon A1R-Ti2 (500-530 [GFP]) o 663 nm [LysoTracker] o Microscopio de Fluorescencia Invertido Nikon Ti-2 (em cubes para GFP, mCherry/Texas RED [para LysoTracker] y CY7 [755 nm NPAg]). Las imágenes fueron adquiridas usando software NIS-Elements (Nikon).

2.14 Determinación de especies reactivas de oxígeno

Determinamos la generación de ROS citoplasmática (DCFDA) y mitocondrial (MitoSox) por la exposición a Mt-NPs, como se describe a continuación.

2.14.1 Principio

El diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFDA) entra pasivamente a las células. En su interior es desacetilada por enzimas inespecíficas y oxidada en la presencia de H₂O₂ y peróxidos orgánicos, produciendo una molécula fluorescente (Keston and Brandt 1965).

La sonda fluorescente catiónica MitoSox Red es un derivado del dihidroetidio que también entra pasivamente a las células. Este colorante es atraído a la mitocondria, donde es oxidado por el anión superóxido producido en el espacio intermembranal generando etidio. La cantidad de etidio que se intercala en el ADN mitocondrial es cuantificada por fluorescencia (Zhao et al. 2013a, Kaludercic, Deshwal and Di Lisa 2014).

2.14.2 Procedimiento

Después de la exposición a las Mt-NPs, las células fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas con DCFDA y MitoSox Red por 15 minutos antes de ser leídas. Usamos un Citómetro Cytex Dxp10 a 488, 561 y 637 nm, respectivamente y se registraron 10 000 eventos.

2.15 Cambios en el metabolismo celular

Utilizamos la técnica de *Seahorse XF Cell* para medir los cambios en el consumo de oxígeno (OCR) y la acidificación extracelular (ECAR) de células vivas. OCR y ECAR son indicadores de la respiración mitocondrial y la glucólisis. Esta técnica provee un panorama general de la afectación de la función metabólica después de ser expuestos los cultivos celulares a diferentes retos.

2.15.1 Principio

La prueba de *Seahorse XF Cell* detecta los cambios secuenciales del consumo de oxígeno y la acidificación extracelular.

Esta técnica usa moduladores de respiración como componentes blanco de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que revela sus parámetros de función. Los componentes como oligomicina (Olig), FCCP y una mezcla de retonona (Ret) y antimicina A (AntA), son serialmente inyectados para medir la producción de ATP, respiración máxima y respiración mitocondrial respectivamente. La fuga de protones y capacidad respiratoria disminuida son calculadas usando estos parámetros.

La glucólisis y la fosforilación oxidativa son las dos mejores vías de producción de energía. Primero se realiza una inyección saturada de glucosa, las células la catabolizan en el ciclo glucolítico y transforman glucosa a piruvato, produciendo ATP, NADH, agua y protones. La liberación de protones en el medio causa un incremento rápido en ECAR (glucólisis en condiciones basales). La segunda

inyección de Olig es un inhibidor de ATP sintetasa, esta inhibe la producción de ATP mitocondrial y cambia la producción de energía a glucólisis con el subsecuente incremento en ECAR (capacidad máxima glicolítica). La inyección final es 2-deoxi-glucosa (2-DG), un análogo de la glucosa, que inhibe la glucólisis a través de la unión competitiva a la glucosa hexoquinasa, la primera enzima en la vía glucolítica. La diferencia entre la capacidad glucolítica y la glucólisis define la reserva glucolítica (<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-analyzers/seahorse-xfe96-analyzer>).

2.15.2 Procedimiento

El consumo de oxígeno (OCR, pmol/min) y la acidificación celular (ECAR, mpH/min) fueron determinados usando el analizador XFe24 (*Seahorse Biosciences*) con algunas modificaciones (Anandhan et al. 2017). Posterior al tratamiento con las Mt-NPs las células fueron incubadas por 1 hora en HCO₃/4-(2-hydroxyethyl)-1-ácido piperazinaetanosulfónica (HEPES) libre de medio DMEM (Sigma D5030) suplementado con 10 mM glucosa (ThermoFisher Scientific D16500; glucosa libre de ECAR), 2 mM L-glutamina (Hyclone SH30034) y 1 mM piruvato (Hyclone SH30239) antes de las mediciones de OCR y ECAR.

El pH del DMEM fue ajustado a 7.4 con hidróxido de sodio (ThermoFisher Scientific S320). La concentración final para los inhibidores fue de 2 µM de oligomicina (MP *Biomedicals* 0215178605), 2 µM de CCCP (carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona, *Acros Organics* AC228131000), 0.5 µM de rotenona (SIGMA-Aldrich R8875) y 0.5 µM de antimicina A (SIGMA-Aldrich A8674).

2.16 Contenido de ATP

El *kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*, es un método usado para determinar el número de células con metabolismo activo en cultivo, basadas en la cuantificación de ATP.

2.16.1 Principio

La técnica consiste en la adición de un solo reactivo (*CellTiter-Glo® Reagent*) directamente al medio del cultivo celular suplementado con SFB. Las células son lavadas y es adicionada una mezcla de reacción que provoca lisis celular y la generación de una señal luminiscente que es proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional a la cantidad de células presentes en el cultivo.

2.16.2 Procedimiento

El contenido de ATP fue determinado usando la prueba luminiscente *CellTiter-Glo* (Promega). Se usaron mediciones luminiscentes de mono-luciferina oxigenasa que es generada por la presencia de Mg^{2+} , ATP celular y O_2 . La luminiscencia fue detectada en un microplato de *SpectraMax Paradigm* (*Molecular Devices*). Para probar si las Mt-NPs interfieren con la prueba de ATP, las Mt-NPs (30 $\mu g/ml$) fueron adicionadas a la curva estándar de ATP (500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000 nM). Las muestras fueron incubadas por 10 minutos con luciferasa en presencia o ausencia de Mg^{2+} y la prueba fue realizada como indica la casa comercial. No se identificaron interferencias por la presencia de las Mt-NPs.

2.17 Análisis estadístico

Se trabajaron replicas experimentales realizadas en días independientes. Los datos fueron analizados usando ANOVA de una vía con la apropiada prueba *post-hoc*, usando el software SIGMAPLOT/STAT y/o GraphPad Prism versión 6.0. La prueba de *t* (*t-test*) fue usada para comparar dos grupos cuando las Mt-NPs no podían ser categorizadas juntas debido a los posibles efectos. El análisis realizado para cada set está indicado en cada leyenda de la figura. Los datos indican las medias de \pm error estándar (EE) usando el mismo paquete para el análisis estadístico. La citometría de flujo e inmunoblots presentados muestran los resultados de experimentos representativos.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización fisicoquímica de las Mt-NPs

3.1.1 Obtención de tamaños nanométricos

Se obtuvieron Mt-NPs de TiO_2 en su isoforma rutilo (r), CeO_2 y Ag de la casa comercial Melorium Technologies, Inc. con especificaciones de tamaño < 10 nm. Sin embargo, los datos proporcionados por el fabricante no coincidieron con las imágenes tomadas por TEM. En la Figura 12 se observan las micrografías de agregados/aglomerados de hasta 0.2 micras.

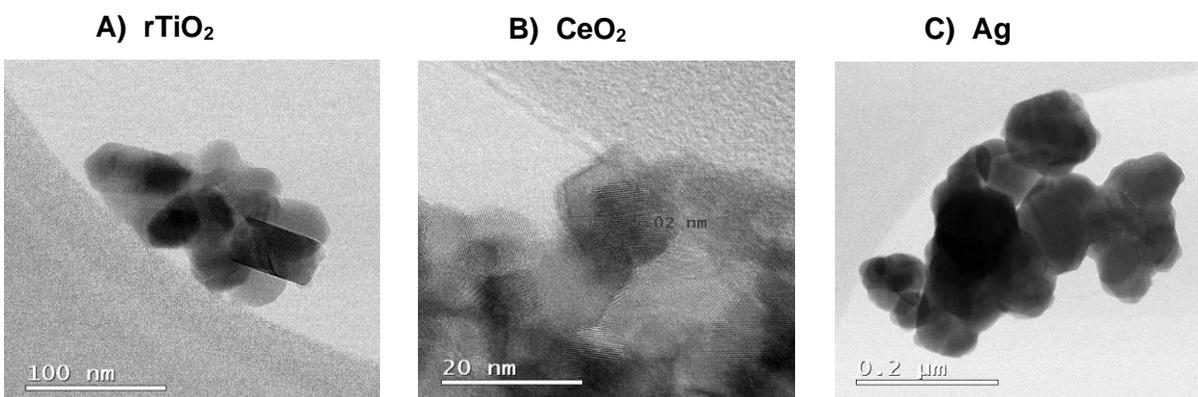


Figura 12. Micrografías tomadas por TEM. Se observa agregados de hasta 0.2 micras. **A)** NPs rTiO_2 , **B)** NPs CeO_2 y **C)** NPs Ag. Usamos TEM-JEOL, JEM-ARM200F.

La separación de agregados/aglomerados para la obtención tamaños nanométricos se llevó a cabo a través del desarrollo de un protocolo de dispersión que consistió en probar tiempos, amplitudes y potencias usando un sonicador *Ultrasonic Processor* 100VAC-120 VAC @50/60 Hz 125 watts, 20 kHz. Probamos 5 periodos de 5 minutos cada uno y registramos los tamaños hidrodinámicos, PDI e incremento de energía en Jules, (Figura 13). Se obtuvieron los tamaños más pequeños de las NPs rTiO_2 a 40% de amplitud durante dos periodos de 5 minutos. Los datos se resumieron en la Tabla que aparece en la figura y en rojo se marcaron los datos que se usaron para el resto de los experimentos. Una vez obtenidos los tamaños nanométricos de las partículas a trabajar, realizamos la caracterización fisicoquímica.

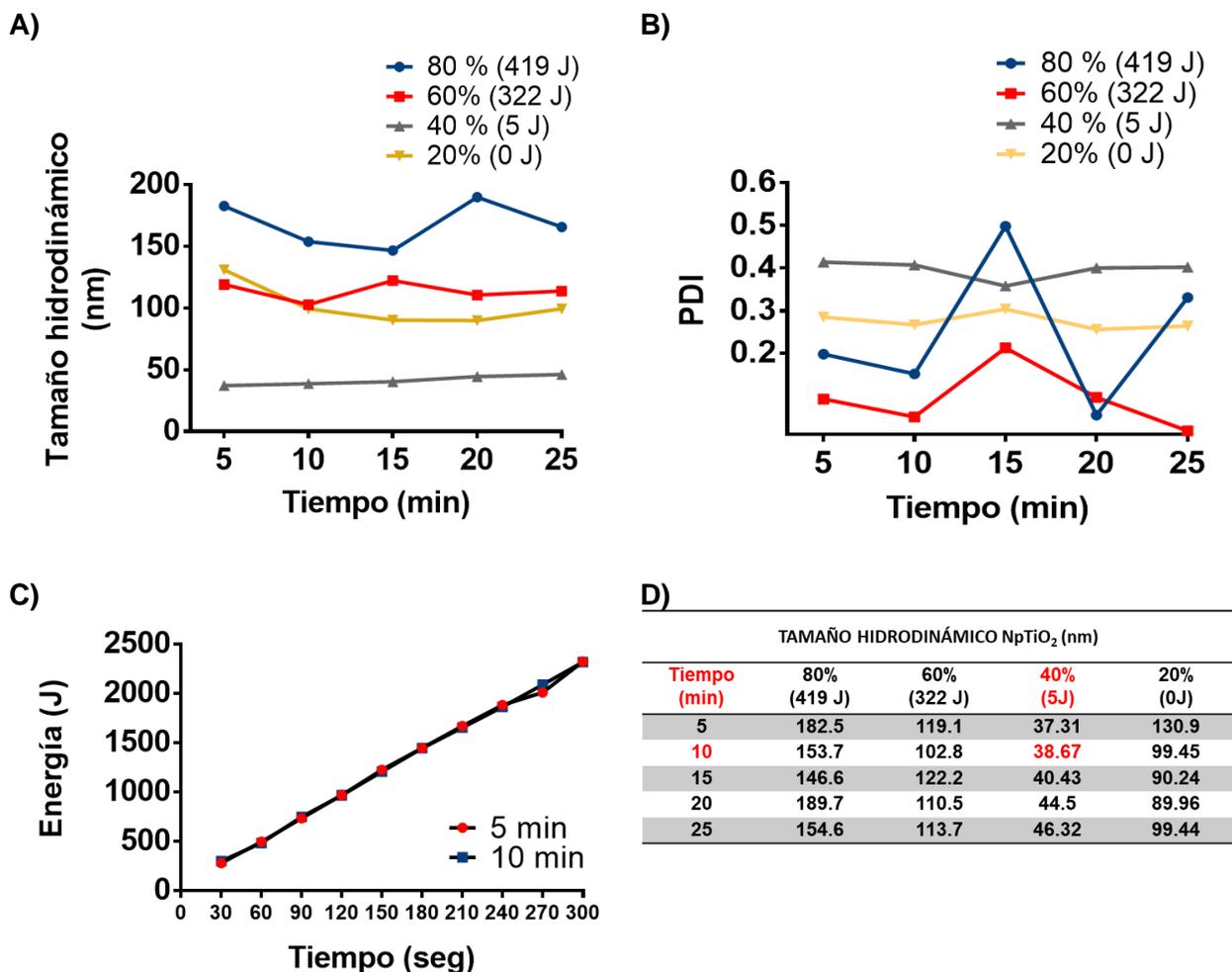


Figura 13. Tamaño hidrodinámico de las NPs rTiO₂.

La muestra se preparó como anteriormente se describió en la sección de material y métodos. El panel **A)** muestra los tamaños hidrodinámicos por amplitud en el tiempo (minutos), **B)** PDI por amplitud en el tiempo (minutos) y **C)** incremento de la energía en Jules en el tiempo en segundos. **D)** Tabla que resume las condiciones de los parámetros a utilizar. Los datos en rojo (tiempo y amplitud) fueron los usados durante toda la experimentación. n=3, datos analizados con GraphPad Prism versión 6.0

La Figura 14 corresponde a los datos obtenidos de las NPs CeO₂. Con estos resultados observamos que los tamaños más pequeños (nm) los obtuvimos a una amplitud de 60% durante dos periodos de 5 minutos.

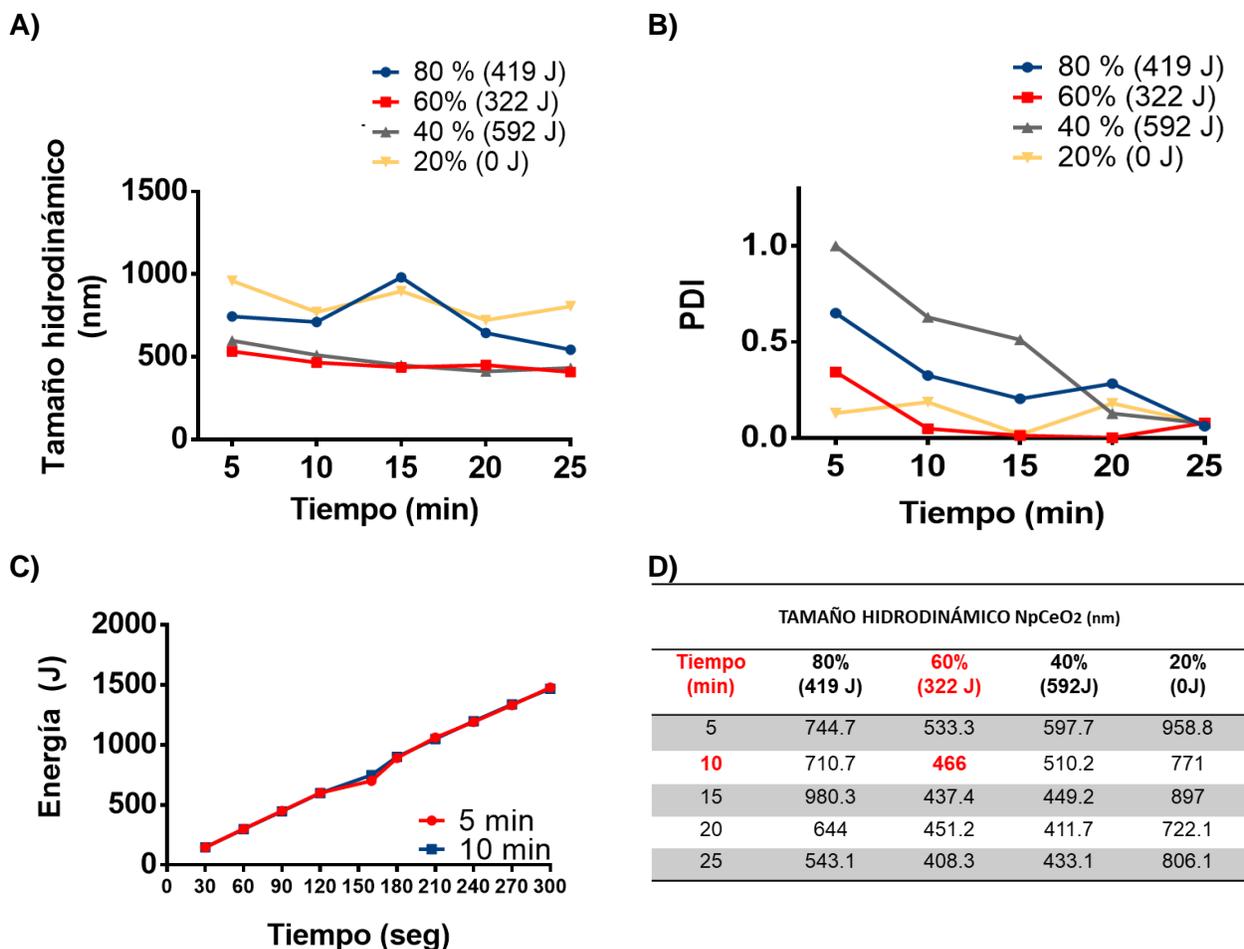


Figura 14. Tamaño hidrodinámico de las NPs CeO₂.

La muestra se preparó como se describió anteriormente. La gráfica en **A)** muestra los tamaños hidrodinámicos por amplitud en el tiempo (minutos), **B)** PDI por amplitud en el tiempo (minutos) e **C)** incremento de la energía en Jules en el tiempo en segundos. **D)** Tabla que resume las condiciones de los parámetros a utilizar. Los datos en rojo (tiempo y amplitud) fueron los usados durante toda la experimentación. n=3, datos analizados con GraphPad Prism versión 6.0.

La Figura 15 corresponde a los datos obtenidos con las NPs de Ag. Obtuvimos tamaños nanométricos usando una amplitud al 80% en dos periodos de 5 minutos.

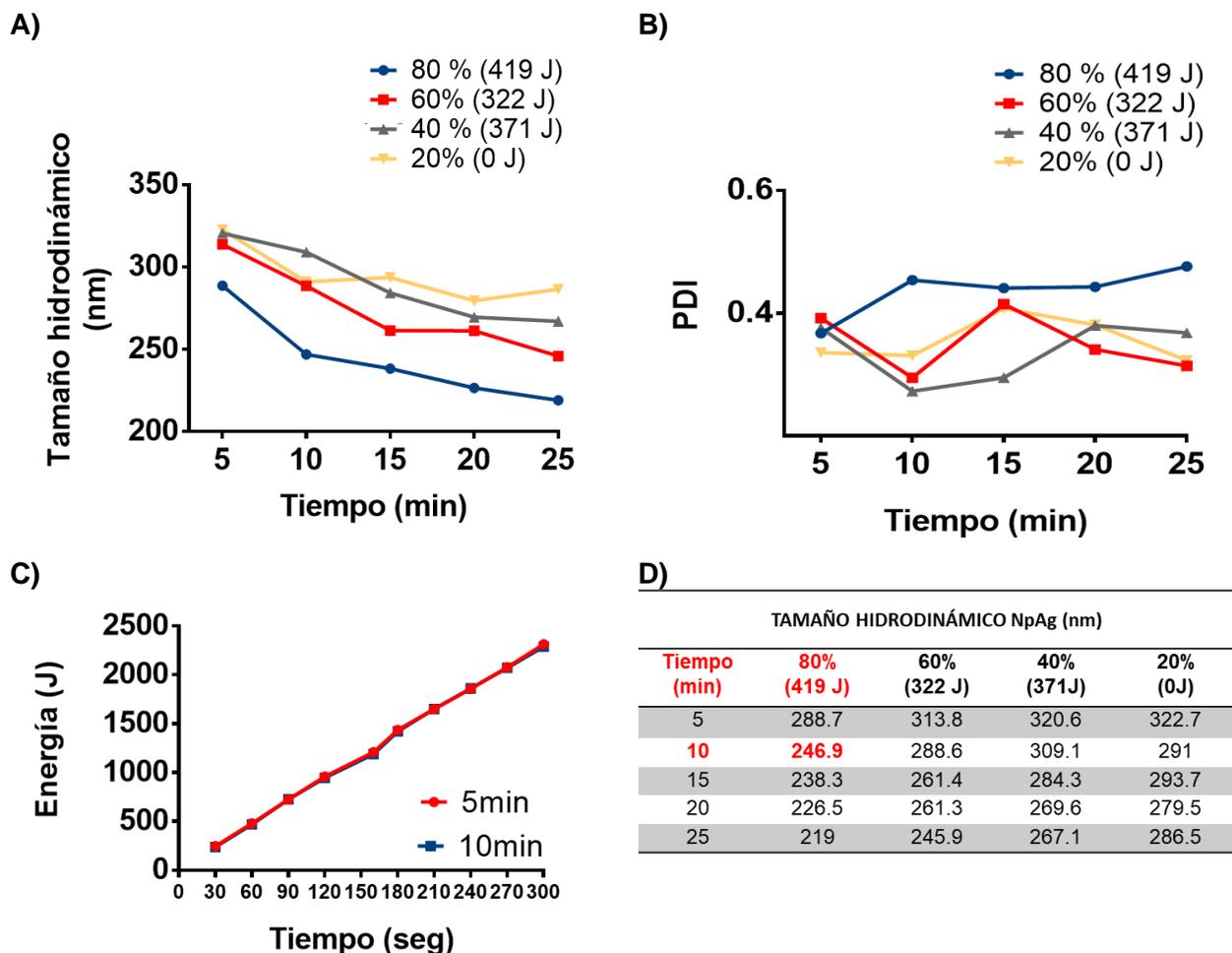


Figura 15. Tamaño hidrodinámico de las NPs de Ag.

La muestra se preparó como se describió anteriormente. La gráfica en **A)** muestra los tamaños hidrodinámicos por amplitud en el tiempo (minutos) y **B)** PDI por amplitud en el tiempo (minutos) y **C)** incremento de la energía en Jules en el tiempo en segundos. **D)** Tabla que resume las condiciones de los parámetros a utilizar. Los datos en rojo (tiempo y amplitud) fueron los usados durante toda la experimentación. n=3, datos analizados con GraphPad Prism versión 6.0.

3.1.2 Determinación de tamaño, forma y composición de las Mt-NPs

Mediante TEM observamos formas cilíndricas para las NPs de rTiO₂: 40 nm; cúbicas para las de CeO₂: 8 nm; y esféricas para las de Ag: 10 nm. Se realizó un conteo de 200 Mt-NPs para determinar las poblaciones presentes en las muestras. La composición elemental nos indicó que las Mt-NPs tienen un 99% de pureza, (Figura 16).

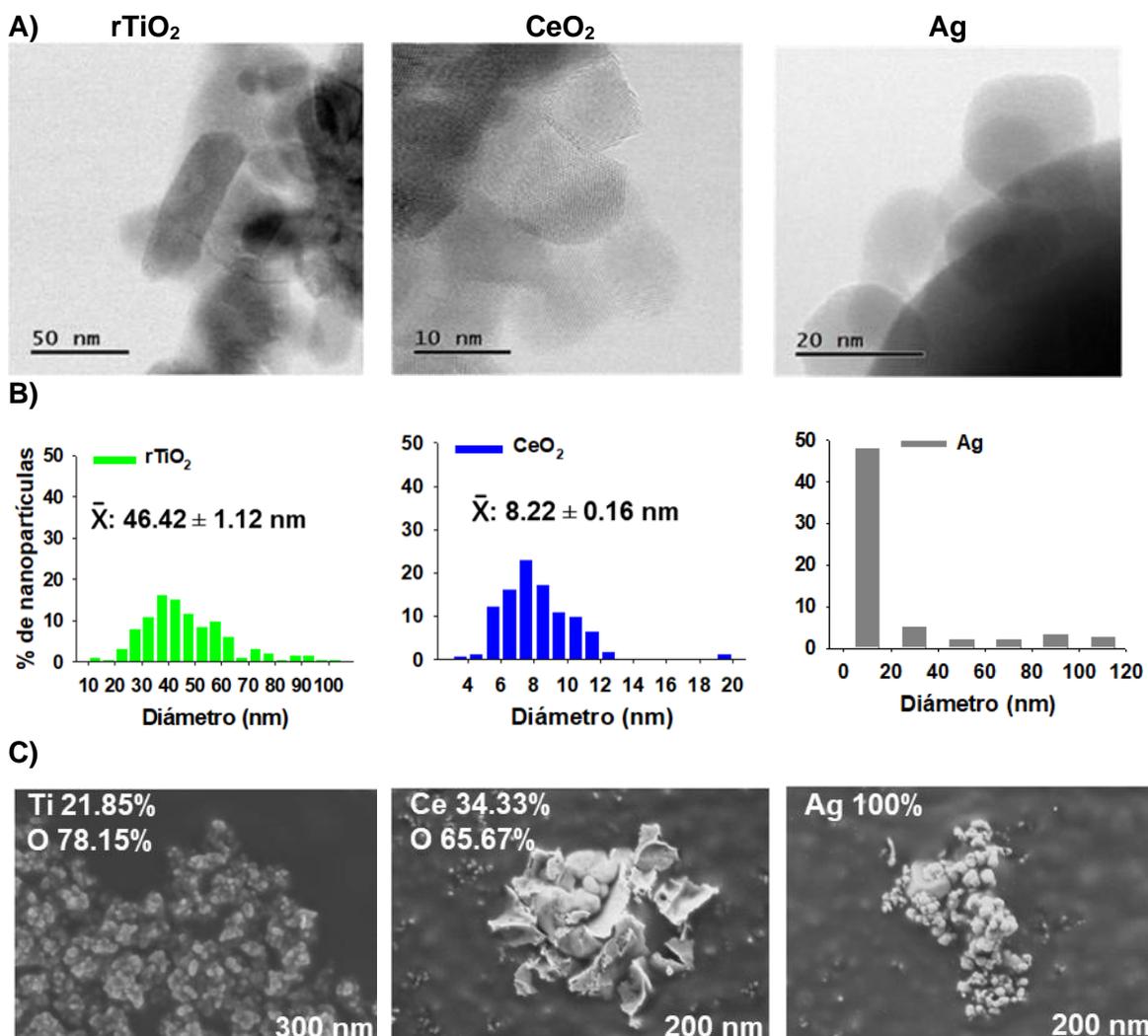


Figura 16. Caracterización fisicoquímica de las Mt-NPs.

A) Micrografías de Mt-NPs tomadas por TEM, **B)** Distribución de tamaños en seco representado en porcentajes, **C)** Composición elemental por SEM-EDX representada en porcentajes. Mt-NPs suspendidas en agua (1 mg/ml). TEM-JEOL, JEM-ARM200F.

Los porcentajes de pureza descritos en la Figura 16-C fueron determinados por histogramas obtenidos de SEM, (Figura 17). Cada pico representa una lectura específica del metal. Los elementos que no corresponden a la composición de las Mt-NPs provienen del agua y la rejilla en la cual fueron montadas las muestras.

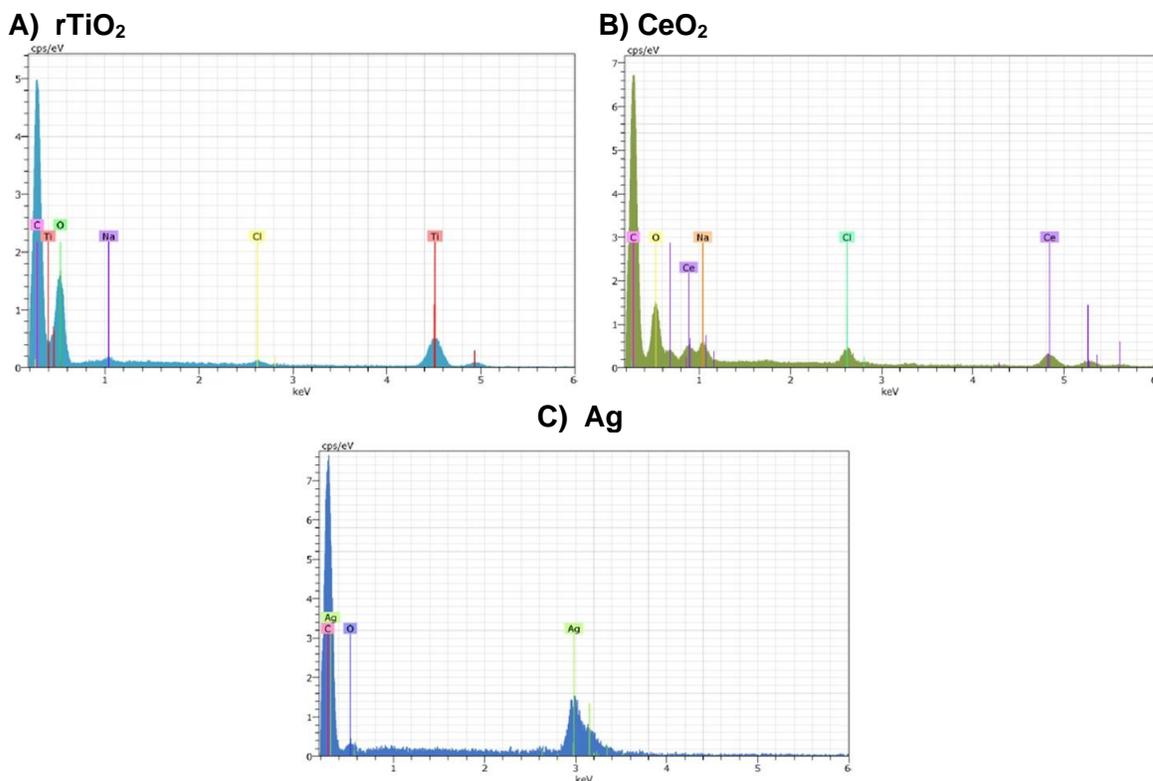


Figura 17. Microanálisis elemental SEM-EDX.

Las soluciones en agua de las Mt-NPs fueron colocadas en rejillas de carbón (10 μ l) y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas antes del análisis. Usamos AURIGA 3916-FE SEM, 120 kV a una resolución de 120 eV. Cada elemento detectado se representa por picos marcados en los gráficos.

3.1.3 Determinación de la concentración de las Mt-NPs en solución

Antes de determinar la concentración de las NPs en solución, se realizó la cinética de aglomeración de las Mt-NPs en agua (1 mg/ml) usando Zetasizer- Malvern. Cada material se comportó de diferente manera y que no existe estabilidad del material en agua (Figura 18).

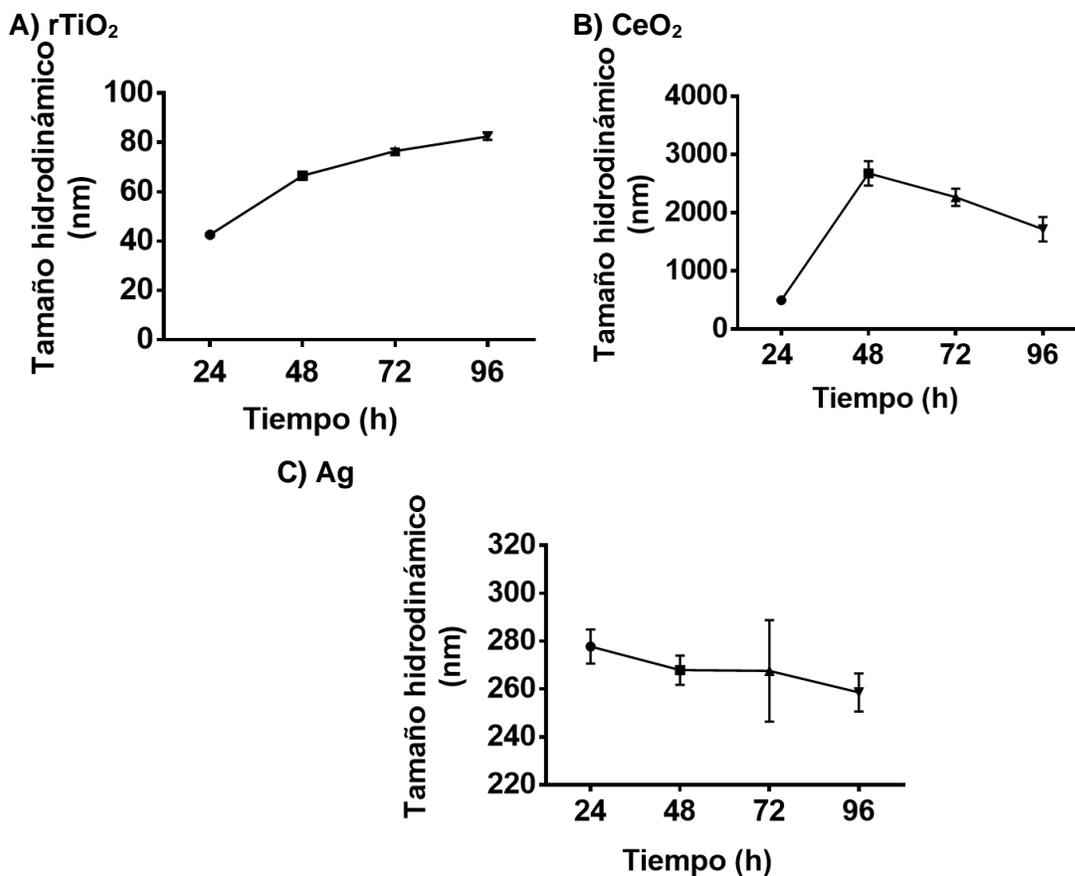


Figura 18. Cinética de las Mt-NPs en el tiempo. La solución de las Mt-NPs se preparó a 1 mg/ml. Se determinó el diámetro hidrodinámico a 24, 48, 72, 96 horas. Zetasizer 5.0 Malvern, n=3.

Posterior a la cinética en tiempo de los materiales en tiempo, se obtuvo la concentración de las partículas en solución por NTA (Tabla 4). La concentración de las NPs de rTiO₂ fue alrededor de 20 veces más el número de partículas con respecto a las de CeO₂ o Ag. El equipo tomó videos de 1 minuto, y de este se tomaron fotografías representativas que se muestran en la Figura 19. En este experimento y en posteriores asociados a los efectos celulares usamos un sonicador Branson 400 W con el cual igualamos la energía usada por medio de una equivalencia en la amplitud y energía. Las Mt-NPs fueron suspendidas en agua (30 µg/ml) y analizadas por NTA. Se muestran tres columnas que indican el tipo de NP, tamaño hidrodinámico (nm) y la concentración de partículas/ml.

Tabla 3. Concentración de las partículas por NTA.

Mt-NPs (agua)	Tamaño hidrodinámico NTA (nm)	Concentración (partículas/ml)
rTiO ₂	40.4	1.20e+09
CeO ₂	59.5	5.48e+07
Ag	89.9	7.27e+07

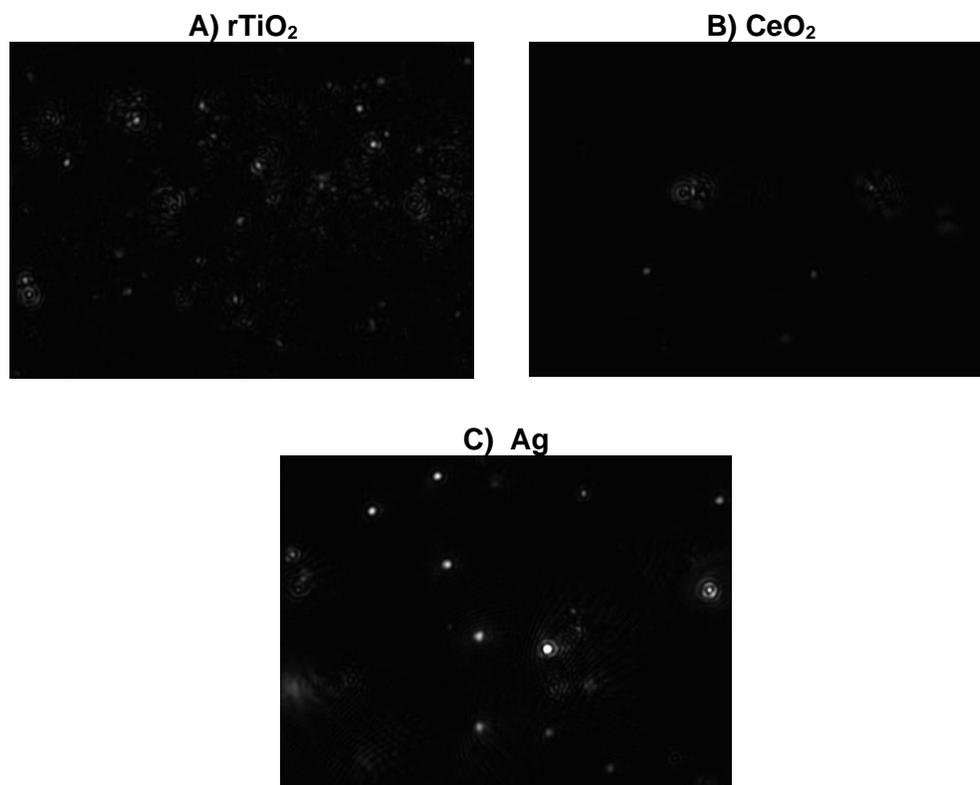


Figura 19. Fotografías representativas de las Mt-NPs en suspensión por NTA. Se preparó una suspensión de 30 µg/ml de las Mt-NPs. Las fotografías fueron tomadas en el segundo 35 del video. NANOSIGHT NS300, MAN0545-01-EN-00.

3.1.4 Caracterización de las Mt-NPs por dispersión

Se realizaron pruebas de dispersión de las Mt-NPs con diferentes concentraciones de BSA (2, 5, 10 mg/ml) disueltas en agua destilada (H₂O_d), incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente y sonicadas en dos periodos de 5 minutos cada uno. Posterior a ese tiempo se midió el PDI usando la amplitud establecida en

experimentos anteriores. Los resultados que se obtuvieron indican que con 5 mg/ml de BSA se obtuvieron los PDI más pequeños, que se refiere a una dispersión mono-dispersa. Los resultados se observan en la Tabla 5, los datos en rojo corresponden concentración usada en los experimentos posteriores.

Tabla 4. Protocolo de dispersión de las Mt-NPs.

A)					B)				
NP	Amplitud (%)	Concentración de BSA en H ₂ O (mg/ml)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	NP	Amplitud (%)	Concentración de BSA en H ₂ O _d (mg/ml)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI
rTiO ₂	40%	0	902.4	0.197	CeO ₂	60%	0	1367	0.508
		2	310.7	0.074			2	581.8	0.356
		5	319.6	0.08			5	602.9	0.292
		10	322.6	0.181			10	626.4	0.321

C)				
NP	Amplitud (%)	Concentración de BSA en H ₂ O _d (mg/ml)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI
Ag	80%	0	305.2	0.302
		2	361.2	0.316
		5	230.1	0.234
		10	900.5	0.826

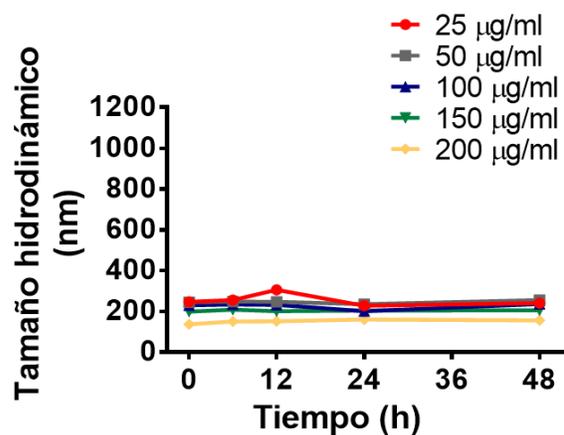
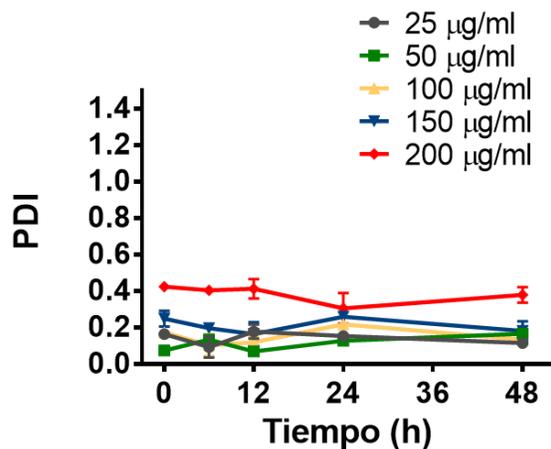
Una vez obtenidos estos valores, se determinó el tamaño hidrodinámico, PDI y potencial ζ en agua y en medio de cultivo. Las cargas obtenidas se mantuvieron en ambas soluciones. Sin embargo, el tamaño de las Mt-NPs y el PDI incrementaron en medio de cultivo, como se muestra en la Tabla 6. Se usaron 5 μ g/ml de BSA a 37°C y pH 7.4. Se empleó Zetasizer 5.0 Malvern.

Tabla 5. Caracterización de Mt-NPs en agua y medio de cultivo

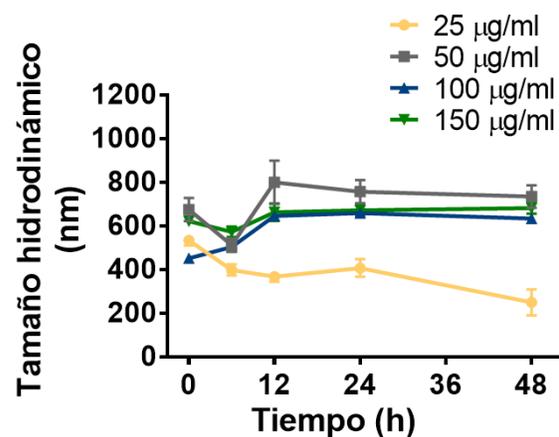
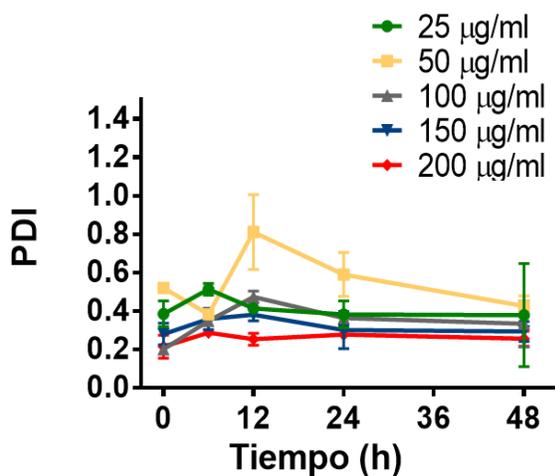
Suspensión	NP	Tamaño hidrodinámico	PDI	Potencial- ζ
Agua	rTiO ₂	42.7 ± 0.1	0.412	- 11.7 ± 2.7
	CeO ₂	445.9 ± 26.4	0.320	+ 35 ± 2.3
	Ag	300 ± 11.7	0.293	-16.1 ± 0.45
DMEM (BSA 5 μ g/ml)	rTiO ₂	136.9 ± 1.8	0.426	- 10.1 ± 1.47
	CeO ₂	602.7 ± 22.7	0.215	+ 13.8 ± 0.96
	Ag	112.2 ± 17.4	0.885	- 13.9 ± 0.76

A partir de la concentración de 5mg/ml de BSA se realizó la cinética de tiempo hasta 48 horas en medio de cultivo libre de células. Las concentraciones que inicialmente se propusieron para el proyecto fueron 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$. La estabilidad varió con cada material y cada concentración, sin embargo, las NPs de rTiO_2 mostraron un comportamiento más homogéneo, (Figura 20).

A) rTiO_2



B) CeO_2



C) Ag

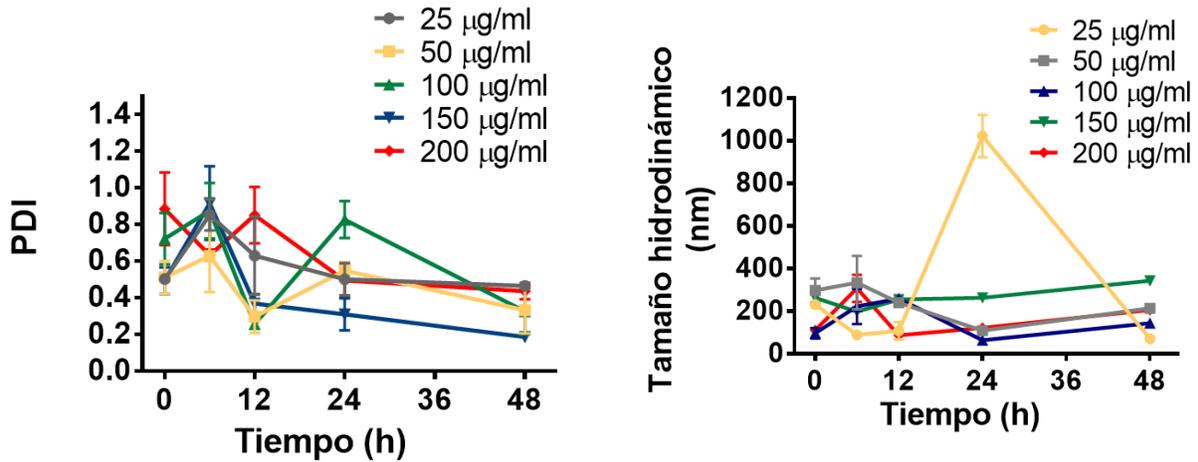


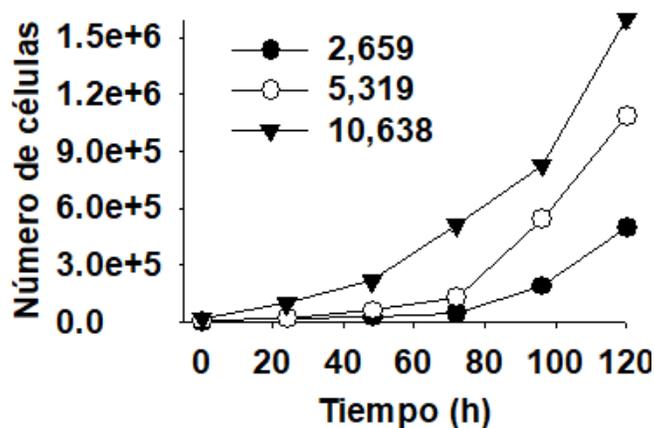
Figura 20. Cinética de las Mt-NPs en medio de cultivo.

Se empleó una solución de 5mg/ml de BSA y 5 concentraciones de las Mt-NPs, se registraron los datos cada 6 horas hasta las 48 horas. En las gráficas se muestra PDI y Z-average vs tiempo (horas). n=3, Zetasizer 5.0 Malvern.

3.2 Proliferación de las células HaCaT

Se sembraron diferentes densidades celulares (5,000, 10,000 y 20,000 células totales/pozo) durante 120 horas. Las células fueron contadas con azul de tripano y se realizó una gráfica de número de células vs tiempo en horas (Figura 21).

A)



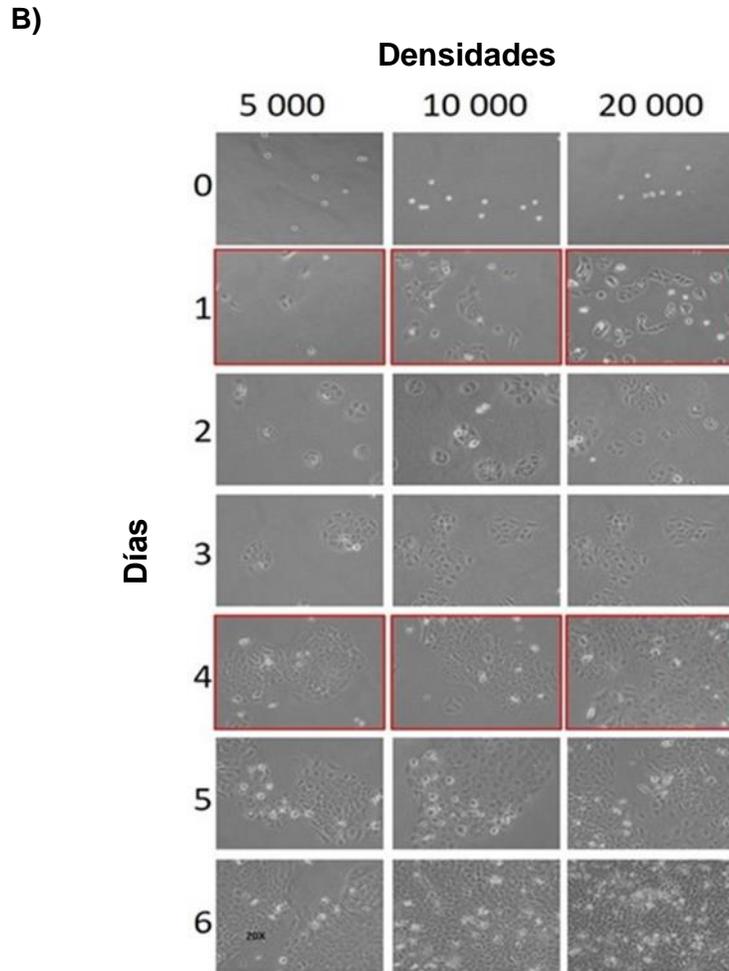


Figura 21. Proliferación de las células HaCaT.

A) Crecimiento exponencial de las células HaCaT. Los datos representan las medias de \pm EE de n=4 réplicas. **B)** Fotografías representativas, magnificación 20X. Los recuadros en rojo indican el día de exposición a Mt-NPs y evaluación de efectos.

3.3 Las Mt-NPs no afectan la viabilidad celular determinada por la liberación de LDH

Se realizó la prueba de viabilidad por la liberación de la enzima LDH. No se observaron cambios por la exposición a las diferentes concentraciones de las Mt-NPs (50, 100, 150 y 200 μ g/ml) en ningún tiempo (24, 48 y 72 horas); se empleó como control positivo TritónX-100 al 1% (Figura 22). Estos resultados negativos se pueden explicar a la interferencia de las Mt-NPs en la lectura de la prueba.

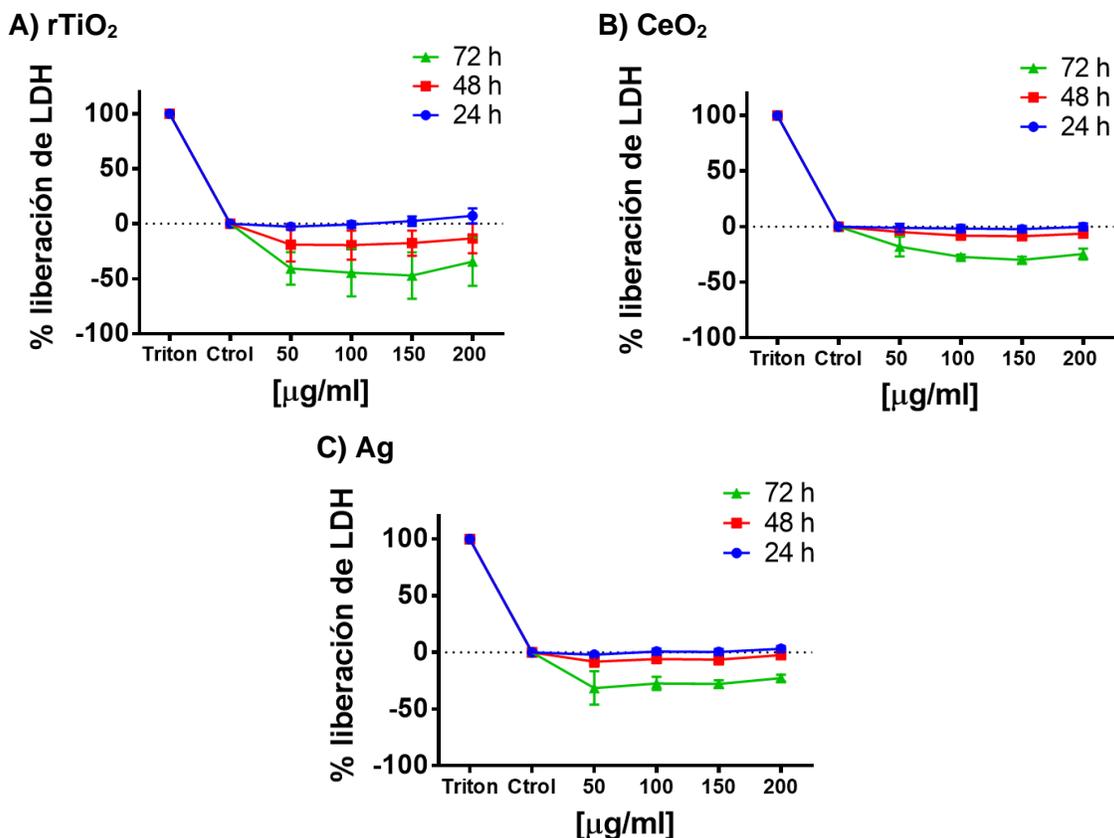


Figura 22. Viabilidad celular medida por la liberación de LDH. Los queratinocitos fueron expuestos a las Mt-NPs a 24, 48 y 72 horas. **A)** rTiO₂, **B)** CeO₂ y **C)** Ag. Los datos están reportados en porcentaje y se usó Triton X-100 (1%) como control positivo. Cada línea representa la media \pm EE de n=3 experimentos independientes por cuadruplicado.

3.4 Propiedades citotóxicas de las Mt-NPs en los queratinocitos

Posterior al primer experimento, decidimos disminuir las concentraciones de exposición de Mt-NPs debido a la saturación que estas mostraron, además del tiempo (48 horas), ya que hasta las 72 horas no se detectó ningún efecto. Los experimentos referentes a senescencia, detección de interleucinas y actividad lisosomal por rojo neutro fueron llevados a cabo con la concentración más baja de Mt-NPs (50 µg/ml) por 48 horas.

La integridad de la membrana celular se evaluó por la incorporación de PI por citometría de flujo, con cinco concentraciones (3, 10, 30 y 100 µg/ml) a 48 horas. Las células teñidas con PI fueron identificadas como positivas (+). Se empleó un

control positivo con arsenito de sodio (NaAsO_2 , $50 \mu\text{M}$). Las células se reportan como % de células viables $p \leq 0.001$ (Figura 23).

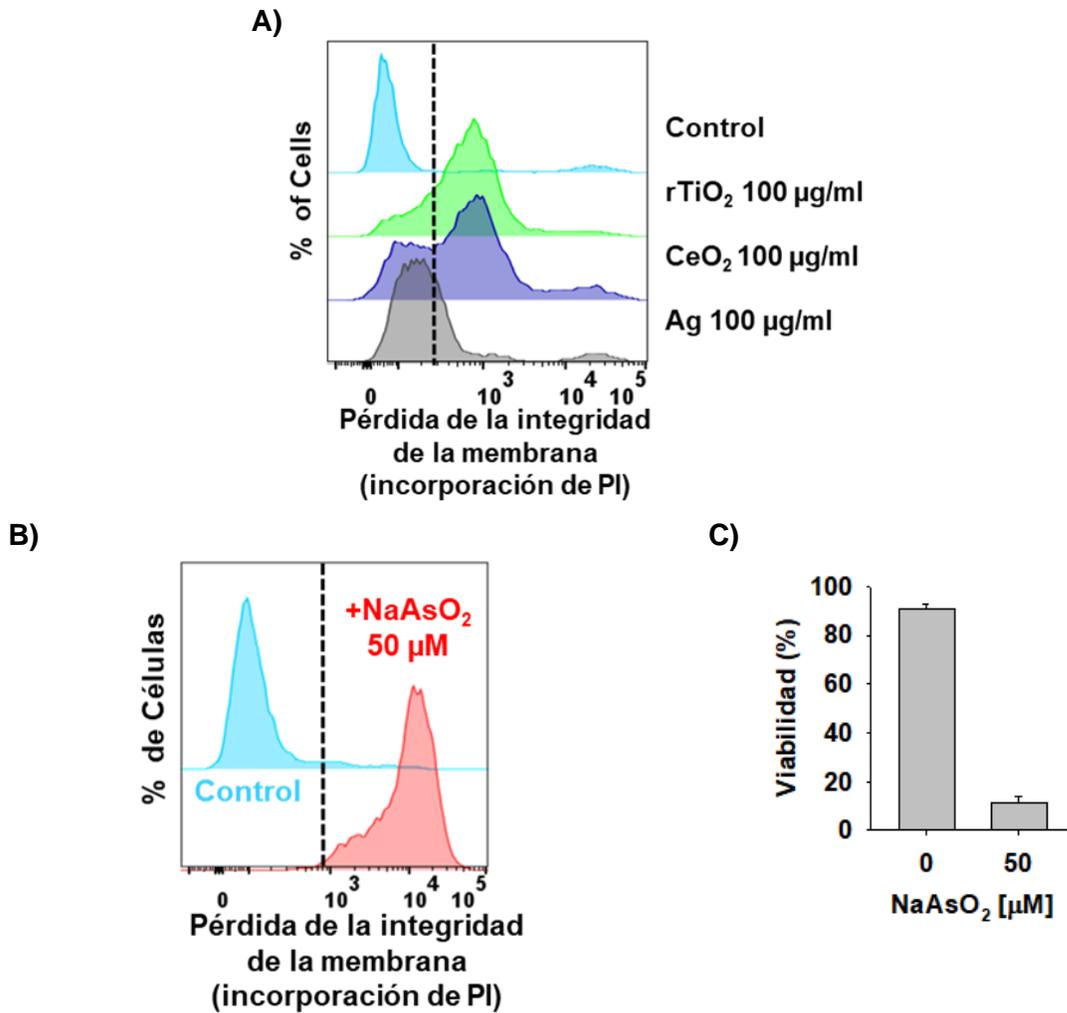


Figura 23. Propiedades citotóxicas de las NPs rTiO_2 , CeO_2 y Ag. Las células fueron tratadas con NaAsO_2 (24 horas). La viabilidad fue medida por la incorporación de PI. **A)** Cambios en la viabilidad celular (100 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas. El histograma y las gráficas en **B** y **C**) representan las células teñidas (+) o no (-) con PI tratadas con arsenito. La línea punteada indica la separación entre las células vivas y muertas. Las células fueron sembradas a 10,638 cel/cm^2 . $p < 0.05$: *t-test 50 μM vs 0 μM NaAsO_2 .

No se observaron cambios en la viabilidad de los queratinocitos expuestos a las Mt-NPs (0, 3, 10 y 30 $\mu\text{g/ml}$) por 48 horas. Las concentraciones sub-tóxicas se definieron como $\leq 30 \mu\text{g/ml}$. Se observó cambios marginales ($\sim 20\%$) en la

proliferación de los queratinocitos expuestos a $rTiO_2$ ($p=0.007$) y CeO_2 ($p=0.033$) pero no con Ag (hasta por 72 horas de exposición) (Figura 24).

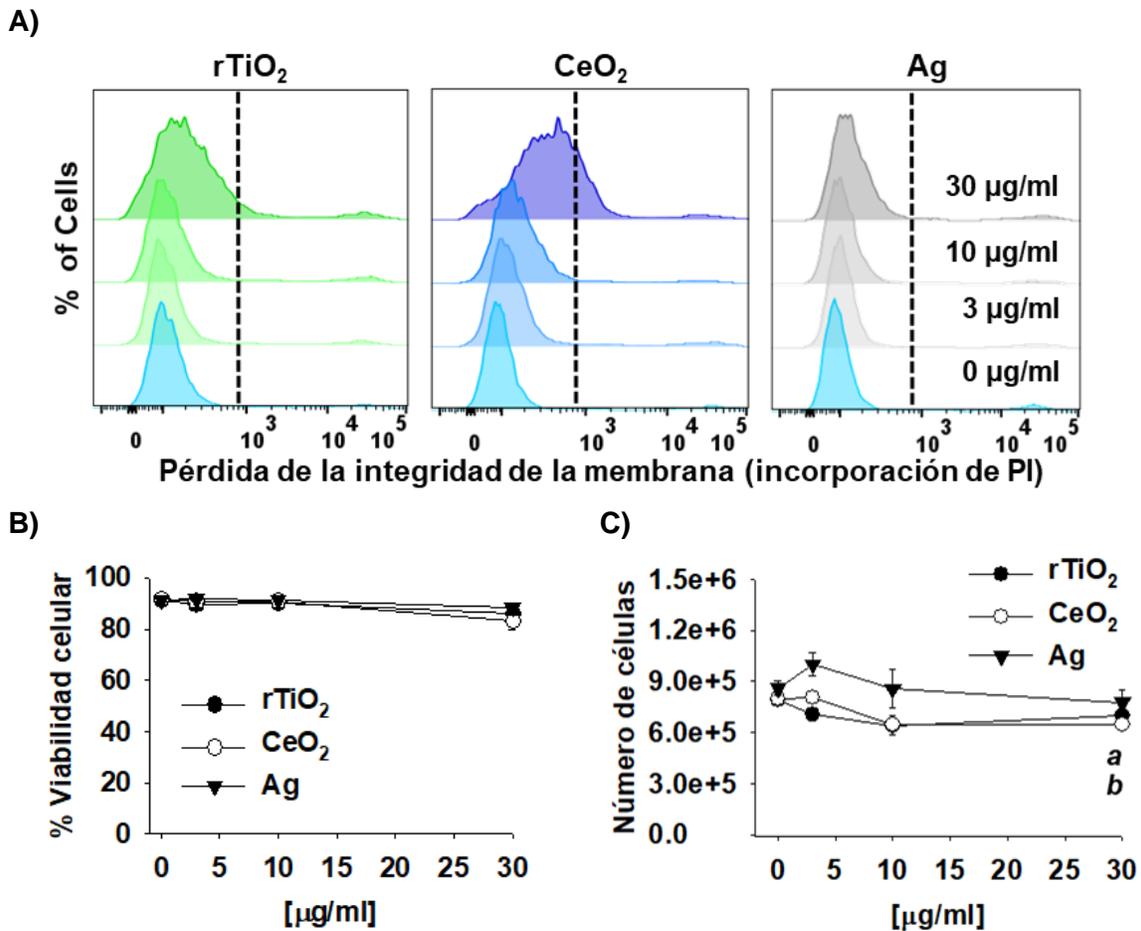


Figura 24. Citotoxicidad de las Mt-NPs a concentraciones sub-tóxicas. Las células fueron sembradas a una densidad de 10,638 cel/cm². Al siguiente día fueron tratadas con las Mt-NPs y el número total de células fue evaluado 72 horas después. Los datos en **A** y **B** corresponden a la viabilidad medida por la incorporación de PI. **C)** Efectos de las Mt-NPs sobre la proliferación. En **B** y **C** se representan las medias de \pm EE de $n \geq 3$ réplicas. $p < 0.05$: ANOVA de una vía: $rTiO_2$ (a) o CeO_2 (b) vs el control (0 $\mu\text{g/ml}$).

3.5 Las Mt-NPs no inducen senescencia

No se observaron cambios en la generación de senescencia con respecto al control con ninguna concentración o tiempo (50, 100, 150 ó 200 $\mu\text{g/ml}$ a 24, 48 ó 72 horas). Las fotografías que se muestran en la Figura 25 corresponden a la concentración

de 50 $\mu\text{g/ml}$ de las NPs a 48 horas, debido a que las concentraciones altas imposibilitaron la toma de fotografías debido a la saturación.

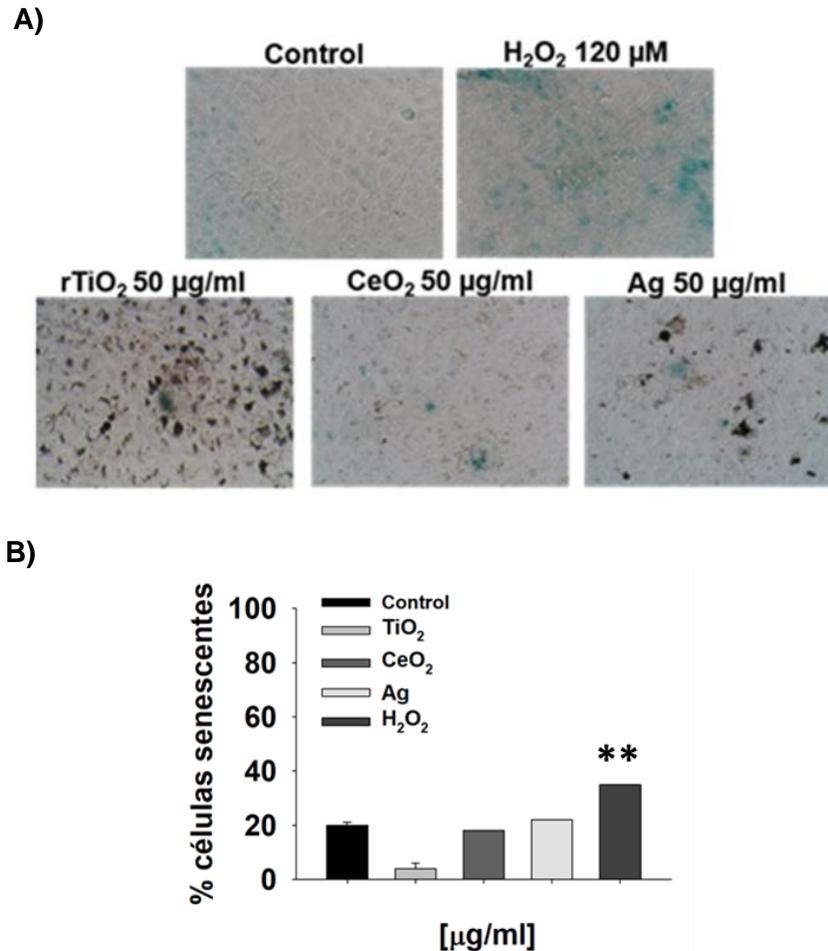


Figura 25. Las NPs de rTiO₂, CeO₂ y Ag no inducen senescencia.

A) Fotografías representativas de queratinocitos tratados con las NPs por 48 horas (magnificación 40X), la actividad de la β -galactosidasa fue evaluada usando el sustrato X-gal (color azul). **B)** Porcentaje de células senescentes positivas identificadas en **A**. Se usó como control positivo H₂O₂ (120 μM). Se representan las medias de $\pm\text{EE}$ de $n=3$ réplicas. ** $p \leq 0.001$: ANOVA de una vía y Bonferroni como prueba *post hoc*. Control vs control positivo.

3.6 Expresión de interleucinas por la exposición a las Mt-NPs

La concentración de citocinas (TNF α , INF γ , IL1- β , IL-1 β , IL-2 p40, IL-6 e IL-8) en el sobrenadante de las células expuestas a las tres NPs se evaluó como un indicador del efecto proinflamatorio inducido por la exposición a los tres tipos de NPs. Se observó un incremento de la IL-8 ($p \leq 0.05$) a las concentraciones de 100 y 150

$\mu\text{g/ml}$, además de en la IL-1 α ($p \leq 0.05$) a las concentraciones de 50, 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$, con las Mt-NPs de Ag a las 24 horas (Figura 26).

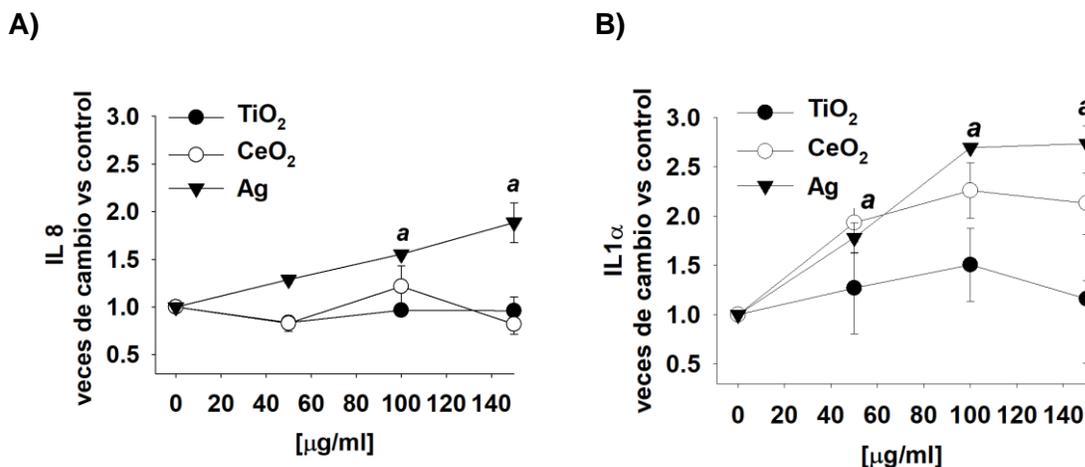


Figura 26. Incremento de IL-8 e IL-1 α por la exposición a las NPs de Ag. Las células fueron expuestas a las Mt-NPs (50-150 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas. El sobrenadante fue aislado para la detección del contenido de interleucinas usando MAGPix. **A)** Expresión de IL-8, **B)** expresión de interleucina IL-1 α . Los datos son presentados en veces de cambio respecto al control, como las medias \pm EE de $n=2$. $p \leq 0.05$: ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey; a (Ag) vs control (0 $\mu\text{g/ml}$).

3.7 Las Mt-NPs no cambian la expresión de proteínas asociadas a la inflamación

No se observaron cambios en las proteínas relacionadas a la inflamación (p-AMPK α , AMPK α , COX 2, p-NF- κ B, NF- κ B, GAPDH y Actina) después de haber expuesto a los queratinocitos a las Mt-NPs (30 $\mu\text{g/ml}$, 48 horas). En la Figura 27 se observan los controles positivos usados.

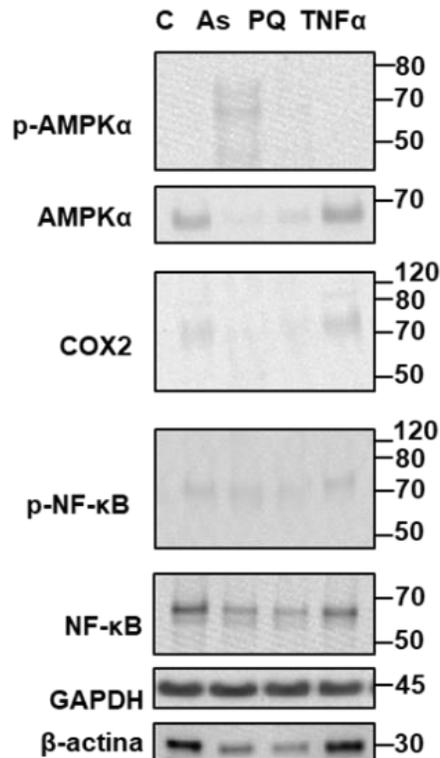


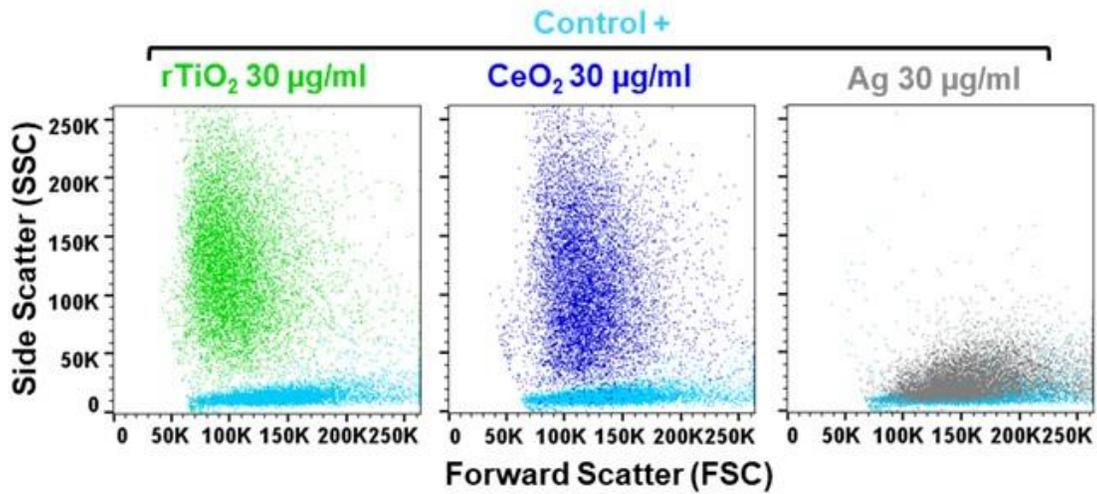
Figura 27. Las Mt-NPs no incrementan la expresión de proteínas asociadas a la inflamación.

Las células fueron tratadas con NaAsO₂ (10μM), PQ (1 mM) y TNFα (10 ng/ml) por 48 horas como controles positivos. Las células fueron expuestas a las Mt-NPs por 48 horas. No se detectaron cambios en la expresión de las proteínas p-AMPKα, AMPKα, COX 2, p-NF-κB, NF-κB, GAPDH o actina por medio de WB.

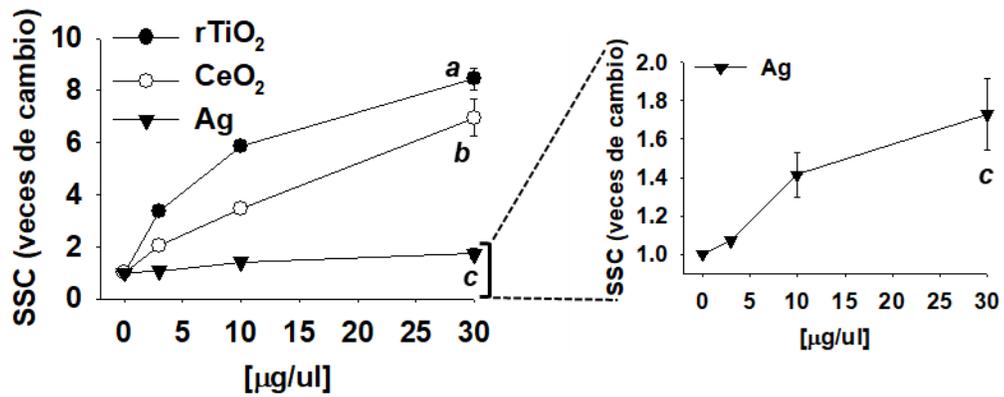
3.8 Cambios en el parámetro *Side Scatter Chanel* por captura de las Mt-NPs

Evaluamos la captura de las Mt-NPs a través de citometría de flujo. La Figura 28 muestra un incremento en SSC de las células tratadas con NPs de rTiO₂ (p=0.002) y CeO₂ (p=0.002) que con NPs Ag (p=0.002). Los cambios en SSC son indicativos del cambio en la granularidad o complejidad de la célula. El incremento fue exponencial de acuerdo con las concentraciones de las NPs a las cuales se expusieron los queratinocitos. Los cambios en SSC se observaron más pronunciados a las 12 horas de exposición, sin embargo, solo las NPs de rTiO₂ mostraron un incremento significativo en FSC (p=0.029), que representa el tamaño celular.

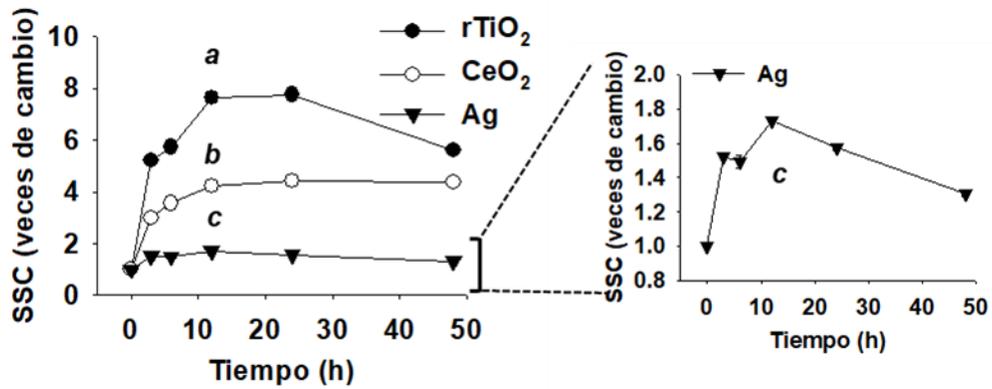
A)



B)



C)



D)

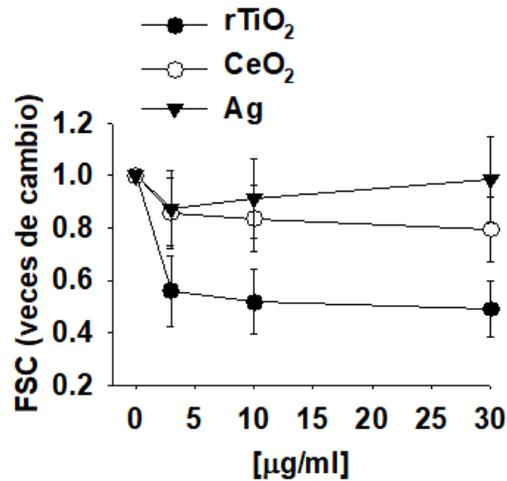


Figura 28. Cambios en SSC de los queratinocitos tratados con las Mt-NPs como una evaluación indirecta de su captura.

Las células fueron tratadas con Mt-NPs por 48 horas. **A)** Dot-plots de FSC vs SSC. **B y C)** Análisis de dosis y tiempo-respuesta de los cambios en SSC. Las gráficas de la derecha en **B y C** representan los mismos datos para NPs Ag que corresponden a la gráfica en la izquierda, pero magnificada para tener una mejor visualización de los cambios en SSC. **D)** Cambios en FSC de las células expuestas a Mt-NPs por 48 horas. Las gráficas en **B, C y D** son las medias de \pm EE de $n \geq 3$ réplicas. $p < 0.05$: ANOVA de una cola: rTiO₂ (a), CeO₂ (b) o Ag (c) NPs vs control (0 µg / ml en **B**, 0 h en **C**).

Algunos estudios han reportado la relación entre el incremento de la granularidad y el contenido lisosomal, sin embargo, en este estudio no se observó ese incremento cuantificado por la proteína 1 asociada a la membrana lisosomal (LAMP1) (Figura 29). En cambio, si se logró detectar un incremento en la actividad lisosomal evaluado por rojo neutro.

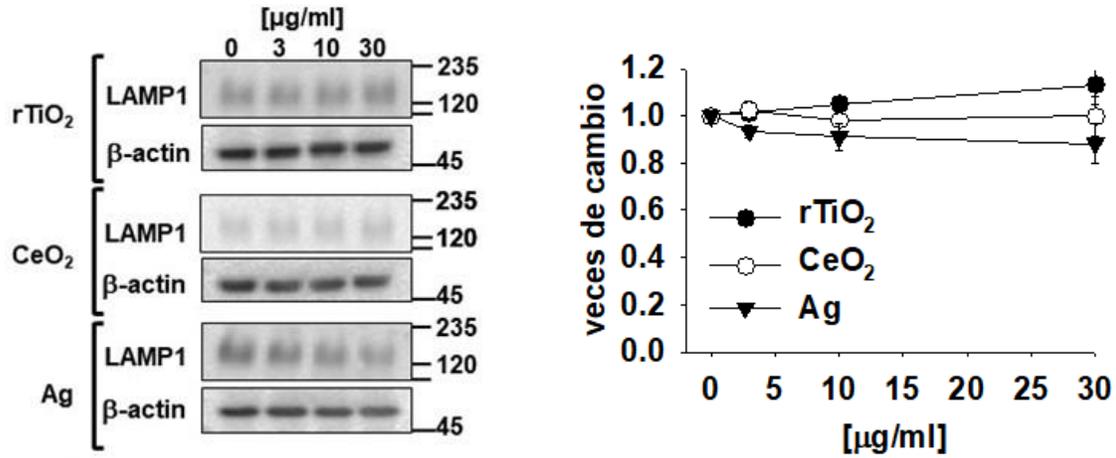
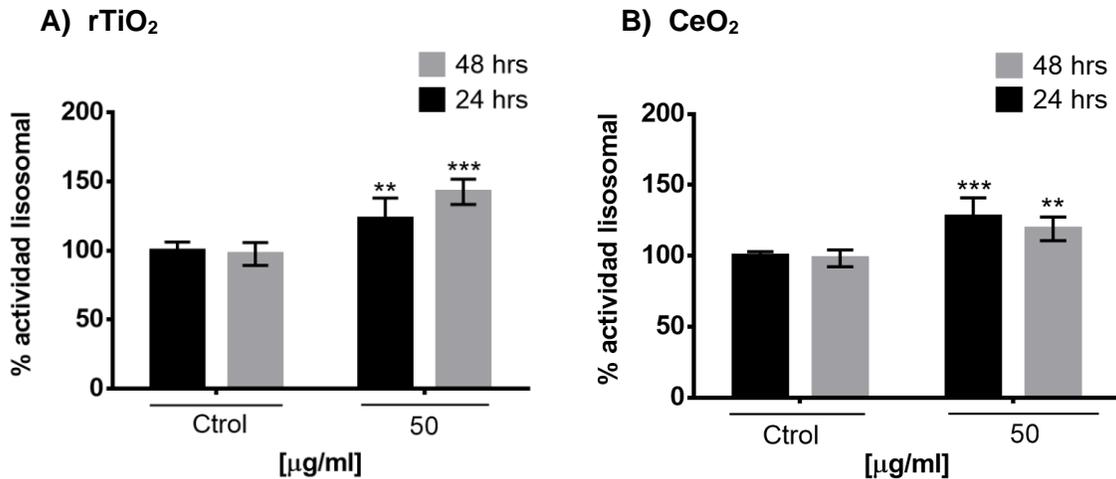


Figura 29. Cambios en los niveles de proteína LAMP1. Las células fueron expuestas a las Mt-NPs por 48 horas. Posterior a ese tiempo se detectó la proteína LAMP1 por medio de WB. La gráfica representa un análisis semicuantitativo de la intensidad de banda con respecto a los controles (veces de cambio) de la proteína LAMP1. Los datos representan las medias de $\pm EE$ de $n \geq 3$ réplicas. Kruskal-Wallis de una vía.

3.9 Las NPs $rTiO_2$ y CeO_2 incrementan la actividad lisosomal

La actividad lisosomal de las células expuestas a Mt-NPs, mostró comportamientos diferentes entre cada material. Observamos un incremento en la actividad lisosomal de las células tratadas con NPs $rTiO_2$ (24 horas) y CeO_2 (48 horas). No obstante, las células tratadas con NPs CeO_2 , mostraron un efecto inverso (tiempo) a las tratadas con $rTiO_2$. Las células tratadas con NPs Ag no mostraron cambios (Figura 30).



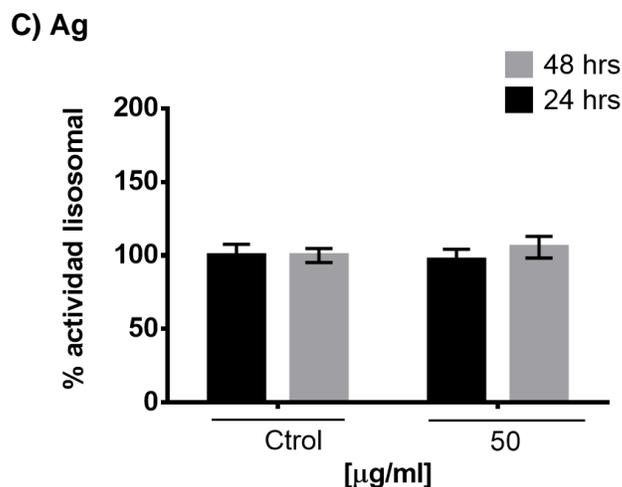


Figura 30. Actividad lisosomal de queratinocitos tratados con las Mt-NPs.

Las células fueron expuestas a 50 µg/ml de las Mt-NPs (24 y 48 horas), se usó como control positivo H₂O₂ (500 µM 48 horas). Las gráficas están expresadas en porcentaje. Cada barra representa la media ±EE de n=3 experimentos independientes por triplicado. **p<0.001, ***p<0.001): ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* Fisher's LSD: NPs vs Control.

3.10 La autofagia protege a los queratinocitos de la toxicidad de rTiO₂ y CeO₂

De acuerdo a los resultados anteriores, decidimos evaluar los mecanismos homeostáticos involucrados en los mecanismos de sobrevivencia de los queratinocitos expuestos a concentraciones sub-tóxicas de las Mt-NPs (< 30 µg/ml, 48 horas). La autofagia es un mecanismo que regula los daños en biomoléculas de forma que puede proteger a las células de la progresión a muerte celular.

En la Figura 31 se observa un incremento en la autofagia en las células expuestas a las NPs rTiO₂ (p= 0.017) y CeO₂ (p=0.025) mayor que con las NPs de Ag (p=0.05) el cual se evidencio por el incremento en el marcador del autofagosoma LC3-II. Esto también fue observado por la disminución recíproca de la proteína p-62.

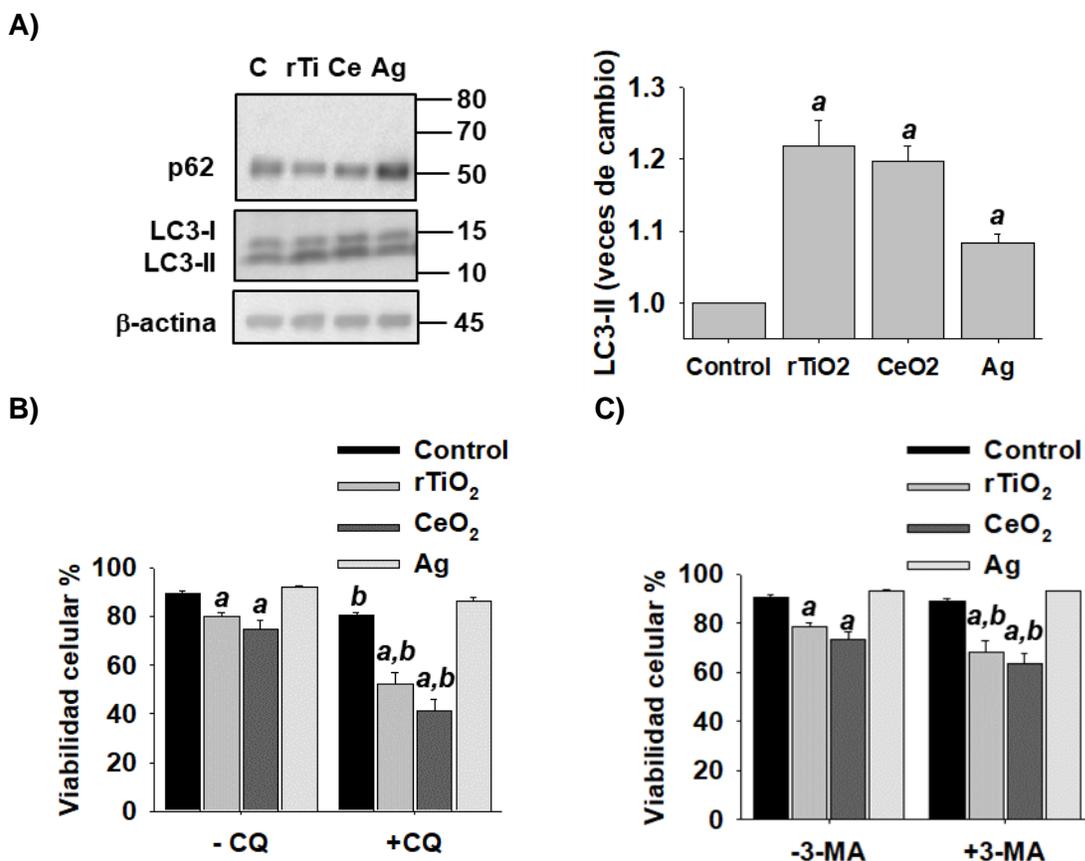


Figura 31. La autofagia protegió a los queratinocitos de la toxicidad de las NPs rTiO₂ y CeO₂.

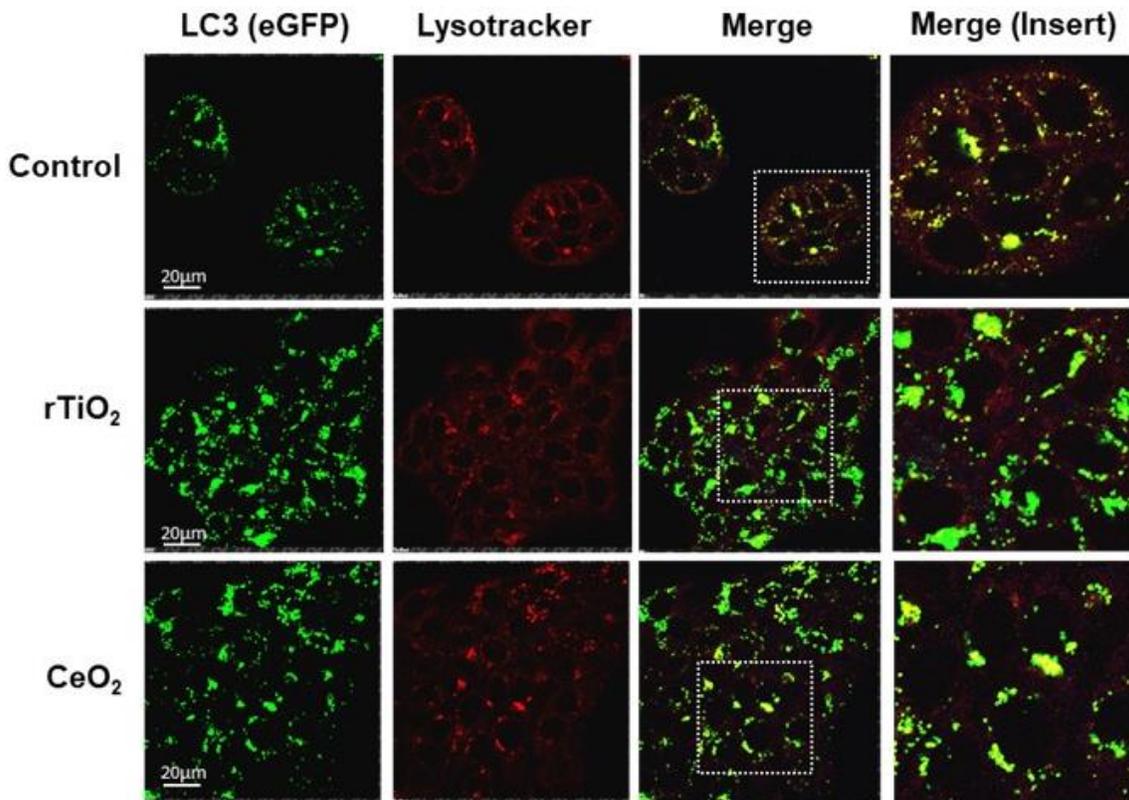
Las células fueron tratadas con las NPs (30µg/ml) por 48 horas. **A)** Niveles de p62, LC3-II y β-actina detectados por WB. Las barras representan el análisis semicuantitativo de una n=3 blots independientes para LC3-II y p-62. Los datos están expresados en veces de cambios vs el control. ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* Holm-Sidak, **B** y **C)** los queratinocitos fueron expuestos a las Mt-NPs en presencia o ausencia de 50 µM de CQ ó 5mM de 3-MA. La viabilidad celular fue medida como se explicó previamente. Los datos representan las medias de ±EE. (a) rTiO₂, CeO₂ o Ag vs control con su correspondiente categoría de +/- CQ o 3-MA; (b) +CQ vs -CQ o +3-MA vs -3-MA con su correspondiente categoría de Mt-NPs.

En la Figura 31 se demostró la inhibición del flujo de la autofagia con CQ y la inhibición de la formación del autofagosoma con 3-MA, un inhibidor de clase III fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). Se observó una disminución en la viabilidad de las células expuestas a las NPs rTiO₂ (p=0.05) y CeO₂ (p=0.05). Sin embargo, se observó que la inhibición de la autofagia no afectó la viabilidad de las de las células

tratadas con las NPs Ag. Esto sugiere que la autofagia es un mecanismo de supervivencia de los queratinocitos expuestos a las Mt-NPs de rTiO₂ y CeO₂.

En la Figura 32 se observa que la expresión de LC3-GFP se incrementó en las células tratadas con NPs de rTiO₂ y CeO₂. No se detectaron cambios en la fluorescencia con el LysoTracker. También se observaron cambios en la autofluorescencia de las células tratadas con las NPs de Ag (filtro 740 LP em). En el caso de las NPs de rTiO₂, se observó una ligera, pero significativa autofluorescencia a ≤ 450 nm (azul), similar a otras autofluorescencias previamente reportadas.

A)



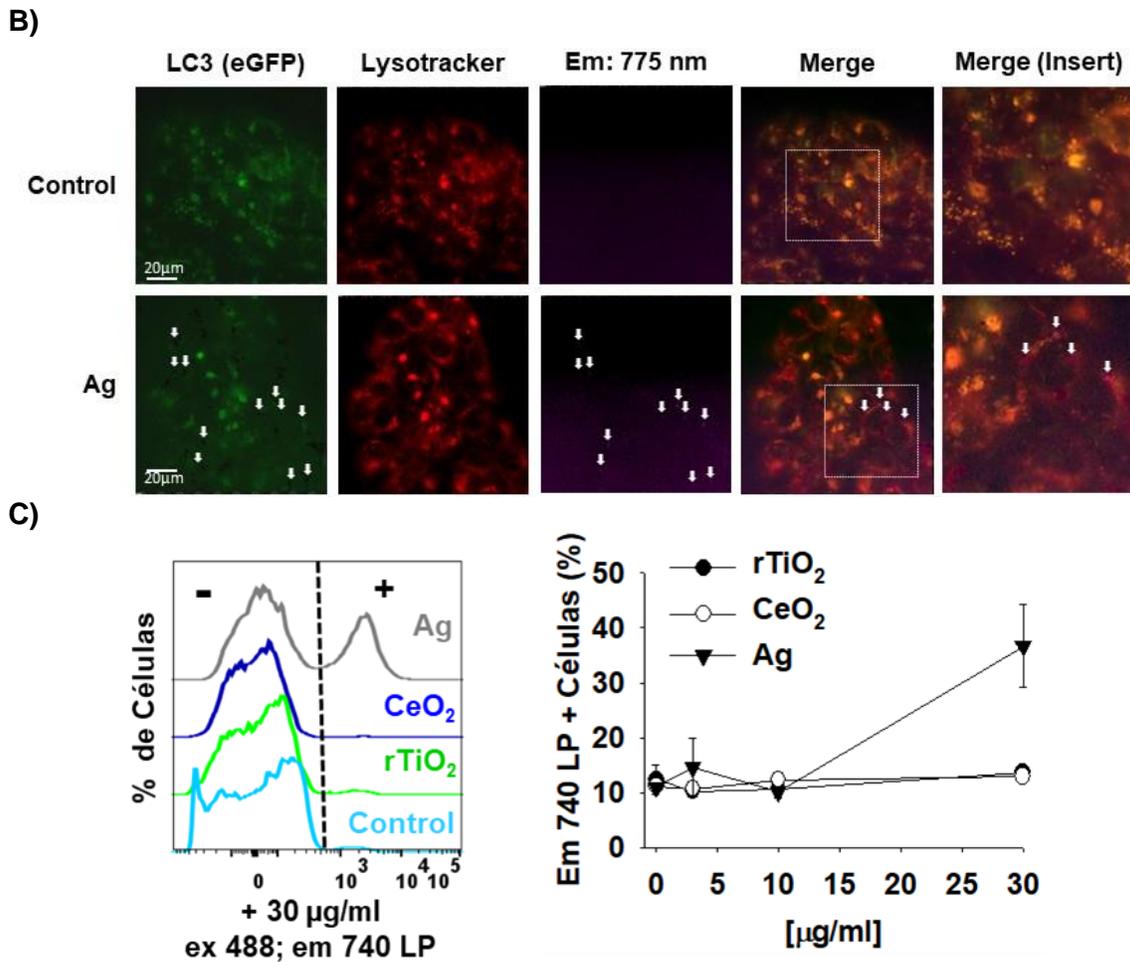


Figura 32. Formación del autofagosoma (eGFP-LC3-II *puncta*) en queratinocitos tratados con las Mt-NPs.

Las células expuestas a las Mt-NPs por 48 horas sobre expresaron eGFP-LC3. **A)** Fotografías de microscopía confocal para visualizar incrementos en la acumulación de LC3-II *puncta* en las células tratadas con las NPs de rTiO₂ y CeO₂. **B)** Microscopia de epifluorescencia de GFP-LC3-II en las células tratadas con las NPs de Ag. Los lisosomas fueron teñidos con *Lysotracker Deep Red*. Las flechas muestran la agregación de las NPs de Ag y su auto-fluorescencia a 775 nm. **C)** Cambios en la auto fluorescencia de las células tratadas con Mt-NPs (filtro 740 LP em). Los datos en las gráficas representan las medias de ±EE n=4 réplicas.

3.11 Caracterización intrínseca de la fluorescencia de las Mt-NPs

Se ha reportado que las Mt-NPs (particularmente de Ag) tienen propiedades intrínsecas de fluorescencia, que son determinadas por la agregación, tamaño e integración con ligandos (incluyendo biomoléculas en las células). En este estudio caracterizamos las propiedades de auto fluorescencia intrínsecas de los

queratinocitos tratados con las Mt-NPs y no se observó un alto grado de auto fluorescencia con las NPs de Ag mayor a 700 nm de emisión (infrarrojo) (Figura 33).

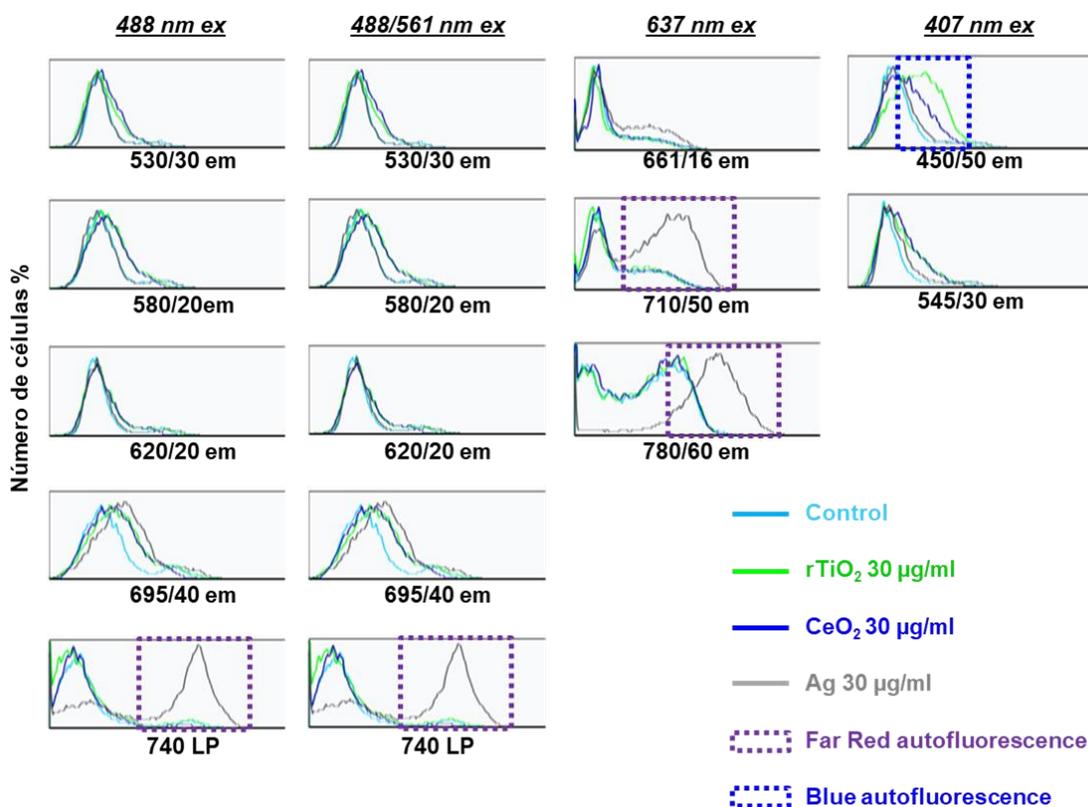


Figura 33. Histogramas que representan la auto fluorescencia de las células tratadas con las Mt-NPs.

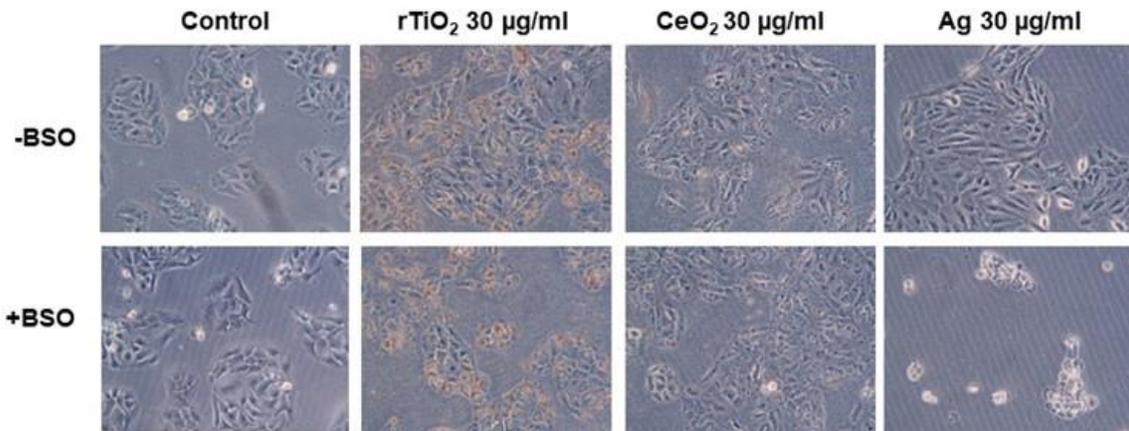
Las células fueron tratadas con las Mt-NPs (30 µg/ml, 48 horas) y excitadas a 488, 561, 637 y 407 nm. La emisión fue registrada de 10,000 células con los correspondientes filtros de emisión. Los cuadros con líneas punteadas indican los cambios mayores en la fluorescencia para las NPs de Ag (infrarrojo) y rTiO₂ (azul).

3.12 El GSH es esencial para la supervivencia de los queratinocitos expuestos a las NPs de Ag.

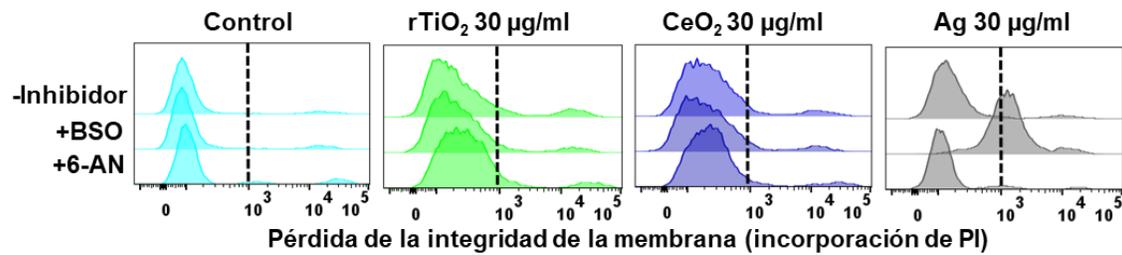
En la Figura 32 B observamos la emisión de fluorescencia en los agregados de las NPs de Ag en interior y exterior de la célula, lo que sugiere que la auto fluorescencia se genera dentro del ambiente celular. Algunos trabajos han reportado que la unión a cisteínas del GSH estabiliza las propiedades fluorescentes de las NPs de Ag (Tan,

Wan and Li 2013, Feng et al. 2019, Yuan et al. 2013) como un mecanismo de defensa a la toxicidad. En la Figura 34 se observa que cuando la síntesis de GSH fue inhibida con BSO, un inhibidor de la γ -glutamil-cisteína ligasa, las NPs de Ag inducen muerte celular ($p=0.05$). No se observaron efectos tóxicos ante las NPs de rTiO₂ o CeO₂.

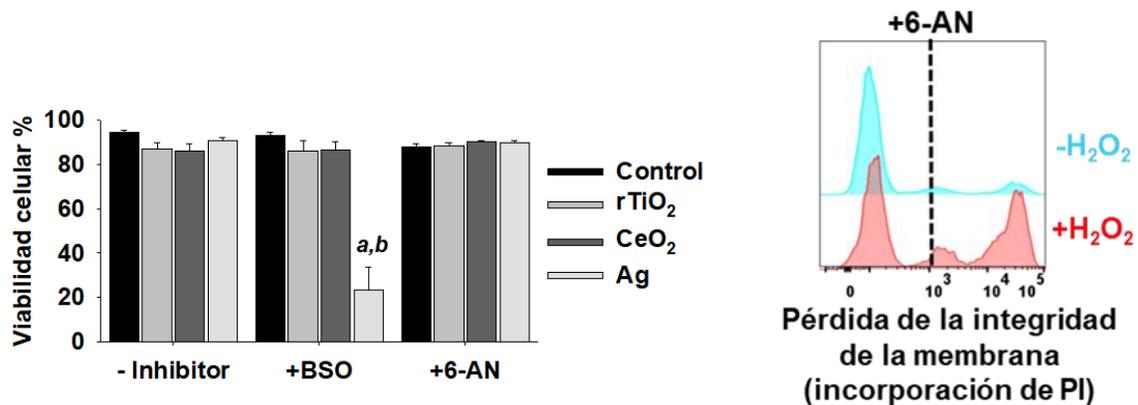
A)



B)



C)



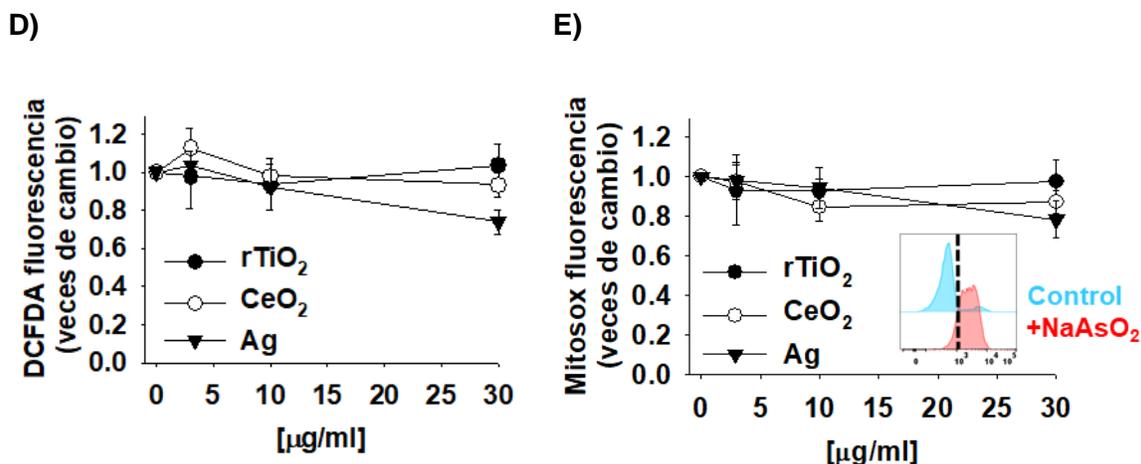


Figura 34. El metabolismo de GSH es esencial para la sobrevivencia de los queratinocitos expuestos a las NPs de Ag independiente de la generación de ROS. Las células fueron tratadas con las Mt-NPs por 48 horas. **A)** Imágenes representativas (40X) de los queratinocitos tratados con Mt-NPs en presencia o ausencia de BSO (500 μ M). **B)** Cambios en la viabilidad de las células tratadas en presencia o ausencia de BSO (500 μ M) y 6-AN (1 mM) fue determinada como se explicó previamente. **C)** Histogramas representativos de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática de células tratadas con H_2O_2 (24horas, 100 μ M) en presencia o ausencia de 6-AN (1 mM). Histogramas en **B** y **C** representan la distribución de las células teñidas (+) con PI. Los cambios en los niveles de ROS de las células tratadas con las Mt-NPs fueron medidas con DCFDA **D)** o Mitosox **(E)** y analizadas por citometría de flujo. Las gráficas representan los cambios en los valores de fluorescencia media correspondientes a los colorantes normalizados con respecto al control. El inserto en la figura **E** muestra un histograma representativo del incremento de la fluorescencia en Mitosox de las células tratadas con $NaAsO_2$ (24 horas, 10 μ M) vs control. La línea punteada indica la separación entre las células control (bajos niveles de ROS mitocondrial) y células tratadas con $NaAsO_2$ (altos niveles de ROS mitocondrial). Los datos son medias de \pm EE de $n \geq 3$ réplicas. $p < 0.05$ ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* Holm-Sidak: (a) Ag vs control con la correspondiente categoría de \pm BSO; (b) +BSO vs -BSO con NP Ag.

Previos estudios en diferentes tipos celulares incluyendo queratinocitos, demostraron que las NPs de Ag produjeron una disminución en la cantidad de GSH y esto se relacionó con el incremento en la formación de ROS (Ahlberg et al. 2016, Aueviriyavit, Phummiratch and Maniratanachote 2014, Yin et al. 2013, Kang et al. 2012). Sin embargo, en este estudio observamos que en algunas circunstancias, el GSH puede regular la generación de muerte celular independiente de la producción de ROS (Franco, Panayiotidis and Cidlowski 2007, Franco and Cidlowski 2012). La reducción de la acción de GSH en contra de las ROS depende del reciclaje de su

forma oxidada (GSSG). El GSH es reciclado mediante la GSH reductasa que requiere de la actividad de la G6PD para proveer la reducción necesaria a equivalentes de (NADPH) (Franco and Cidlowski 2009). Para determinar si la toxicidad inducida por las NPs de Ag, cuando la síntesis de GSH es suprimida por BSO, nosotros ligamos el estrés oxidante generado cuando inhibimos el reciclaje de GSH con 6-AN, un inhibidor competitivo de G6PD. El 6-AN no mostró efecto sobre la viabilidad de los queratinocitos expuestos a las Mt-NPs, pero mejoró la toxicidad mediada por peróxido. Los resultados demuestran que el GSH es esencial para la sobrevivencia de las células tratadas con las NPs de Ag, probablemente por la reducción de Ag pero no por ROS.

La producción de ROS en los queratinocitos tratados con las Mt-NPs también fue evaluada usando DCFDA (517-527 nm emisión) que permite detectar los incrementos de ROS en la célula entera y MitoSox (540-680nm emisión) que evalúa el estrés oxidante en la mitocondria. Sin embargo, no se detectaron incrementos en los niveles de ROS en las células tratadas con las Mt-NPs.

3.13 Las NPs de rTiO₂ y Ag alteran la bioenergética de los queratinocitos

La ECAR fue evaluada indirectamente por la glicolisis a través de la producción de lactato, un producto final que está relacionada al flujo de H⁺. Los queratinocitos fueron expuestos a 30 µg/ml de Mt-NPs por 24 horas. Los queratinocitos fueron privados de glucosa por 1 hora y después se les adicionó glucosa que desencadenó la glucólisis (+Glu) e incrementó ECAR que fue significativo para las células tratadas con NPs de rTiO₂ (p=0.025) y Ag (p=0.017). La inhibición de la ATPasa mitocondrial con oligomicina (+Olig) incrementó ECAR como una respuesta compensatoria para mantener la bioenergética celular, un fenómeno que se denomina capacidad glucolítica. Entonces, la reserva glucolítica es definida como la diferencia entre la glucólisis y la capacidad glucolítica. Mientras que las células tratadas con NPs de rTiO₂ y Ag también disminuyeron la capacidad glucolítica de los queratinocitos solo rTiO₂ (p=0.036) redujeron ligeramente la reserva glucolítica. En contraste, las NPs

de CeO_2 incrementaron la capacidad ($p=0.036$) y reserva ($p=0.008$) glucolítica de los queratinocitos.

En este estudio también se determinaron los efectos de las NPs sobre la función mitocondrial de los queratinocitos, esto a través de los cambios en el OCR. La generación de ATP vía la ATPasa mitocondrial está acoplada al OCR y la diferencia entre el OCR en la presencia y ausencia de +Olig puede ser ligada a los cambios en la producción de ATP. La OCR y la respiración acoplada a la producción de ATP fueron significativamente disminuidos por las NPs de rTiO_2 ($p=0.017$). Una vez que la producción de la ATPasa fue inhibida por Olig la adición de un protonóforo (cianuro de carbonilo m-clorofenilo hidrazina, +CCCP) desacopló el OCR de la producción de ATP maximizando la OCR. La diferencia entre el valor basal y máximo de OCR es definida como la capacidad de reserva mitocondrial. Las NPs de rTiO_2 ($p=0.017$) y Ag ($p=0.025$) disminuyeron la capacidad de reserva mitocondrial. En cuanto a la fuga de protones, la diferencia entre el OCR independiente de la formación de ATP (+Olig) y OCR independiente de la actividad de la cadena de transporte de electrones (cuando el complejo I y II son inhibidos por la rotenona y antimicina A [+Ret +Ant A]) fue también reducido por las NPs de rTiO_2 ($p=0.017$) y Ag ($p=0.025$).

Nuestros resultados sugieren que las NPs de rTiO_2 y Ag disminuyeron la glucólisis y la función mitocondrial en los queratinocitos. En la Figura 35 se comparan ECAR y OCR y se observa que los niveles energéticos de los queratinocitos tratados con las NPs de rTiO_2 y Ag disminuyen, y los cambios para los queratinocitos tratados con las NPs de rTiO_2 fueron más notorios. Para evidenciar mejor estos cambios se cuantificó la cantidad de ATP generada, sin embargo, no observamos cambios después de la exposición a las tres Mt-NPs.

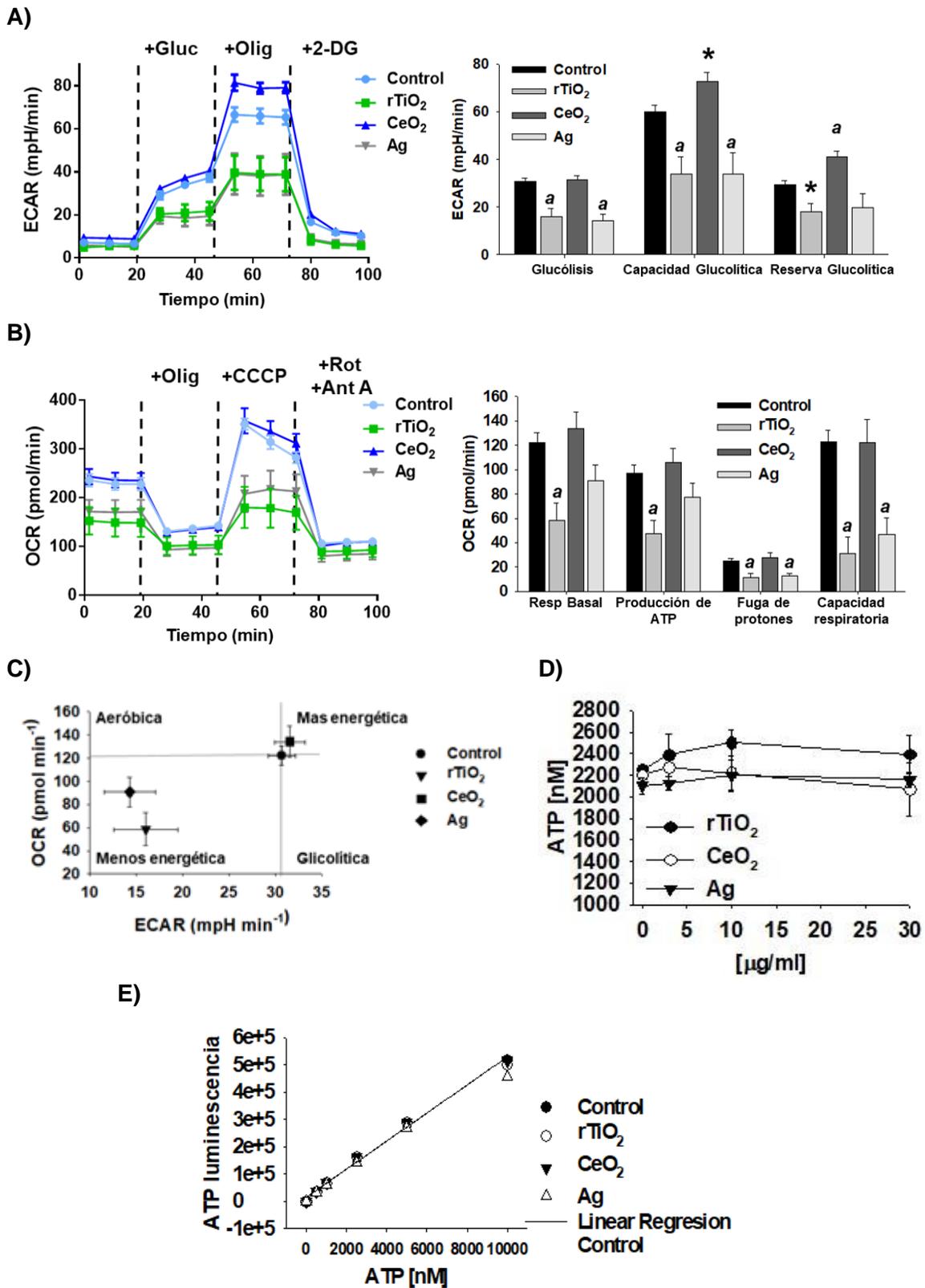


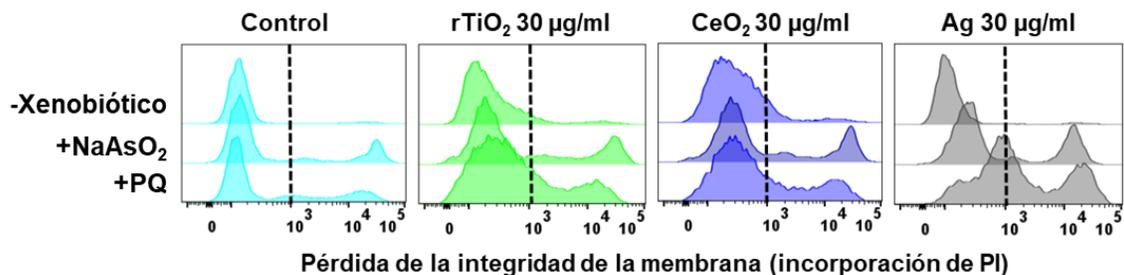
Figura 35. Efectos de las Mt-NPs en la bioenergética de los queratinocitos. Las células fueron tratadas con 30 $\mu\text{g/ml}$ de Mt-NPs por 24 horas. **A)** La glucólisis, capacidad glucolítica y reserva glucolítica fueron evaluados por cambios en ECAR. **B)** La

respiración mitocondrial basal, producción de ATP, fuga de protones y capacidad de reserva fueron evaluados por cambios en el OCR. La glucólisis (+Glu) fue inhibida por 2-deoxiglucosa (2-DG) y la actividad mitocondrial fue modulada por la oligomicina (+Olig, inhibidor de ATPasa), CCCP (+ ionóforo), rotenona y antimicina A (ETC inhibidores, +Rot + Anti A). **C)** Perfil bioenergético de las células tratadas con NPs comparadas con cambios en OCR (respiración) vs ECAR (glucólisis). **D)** Cambios en los niveles de ATP de las células tratadas con las Mt-NPs. **E)** Ensayo de interferencia con las tres Mt-NPs usando el ensayo de detección de ATP. Las gráficas presentan las medias de \pm EE de n=4 réplicas. $p < 0.05$ ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Holm-Sidak o Student-Newman-Keuls: (a) Mt-NPs vs control. $p < 0.05$ t-test: *CeO₂ vs control.

3.14 Las Mt-NPs modulan la sensibilidad de los queratinocitos a xenobióticos

Las NPs han sido ampliamente utilizadas en la cosmética como filtros inorgánicos. Muchos estudios han demostrado que las NPs de TiO₂ y Ag sensibilizan a los queratinocitos a la fototoxicidad inducida por radiación UV (anatasa/rutilo) (Tyagi et al. 2016, Xue et al. 2016, Fenoglio et al. 2013, Xue et al. 2011). Sin embargo, son pocos los estudios sobre el efecto potencial de las Mt-NPs en la toxicidad de compuestos químicos sobre células de piel. En la Figura 36 se muestra que las NPs rTiO₂, CeO₂ y Ag incrementan la toxicidad de los queratinocitos. Las NPs de Ag también mostraron una toxicidad sinérgica en las células expuestas a PQ. Los resultados muestran que las tres NPs modulan significativamente la toxicidad de los xenobióticos sobre las células de piel.

A)



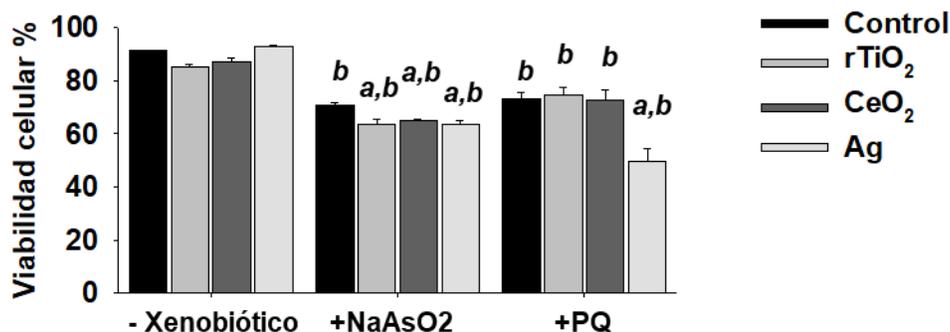


Figura 36. Efectos de las Mt-NPs en la sobrevivencia de los queratinocitos expuestos a xenobióticos.

(A) Las células fueron expuestas a 30 $\mu\text{g/ml}$ de las Mt-NPs por 48 horas en la presencia o ausencia de NaAsO_2 (20 μM) o PQ (1 mM). Los histogramas representan la distribución de las células teñidas (+) o no (-) con PI. Las líneas punteadas indican la separación entre las células vivas (PI-) y muertas (PI+). Los datos representan las medias $\pm\text{EE}$ de $n=4$ réplicas. $p<0.05$ ANOVA de dos vías y la prueba *post hoc* de Holm-Sidak (a) rTiO_2 , CeO_2 o Ag NPs vs control con la correspondiente categoría de $\pm\text{NaAsO}_2$ o PQ; (b) + NaAsO_2 o +PQ vs control con la correspondiente categoría de Mt-NPs.

En la Figura 37 se resume que en este estudio se identificaron los mecanismos homeostáticos involucrados en la sobrevivencia de los queratinocitos expuestos a concentración sub-tóxicas de Mt-NPs usadas en los productos cosméticos (rTiO_2 , CeO_2 y Ag). Mientras que la autofagia protegió a los queratinocitos en contra de las NPs de rTiO_2 y CeO_2 , la homeostasis del glutatión fue esencial para la sobrevivencia de las células expuestas a las NPs de Ag independiente de la formación de ROS. Las NPs de rTiO_2 y Ag también redujeron el metabolismo de los queratinocitos. Finalmente, reportamos que las Mt-NPs incrementan la sensibilidad de los queratinocitos a la exposición de xenobióticos como arsenito y paraquat.

Los resultados demuestran por primera vez la contribución diferencial de la autofagia, metabolismo y balance redox en la sobrevivencia celular y el incremento del riesgo a la toxicidad cuando los queratinocitos son expuestos a las Mt-NPs y se enfrentan a otro reto más, como los xenobióticos ambientales.

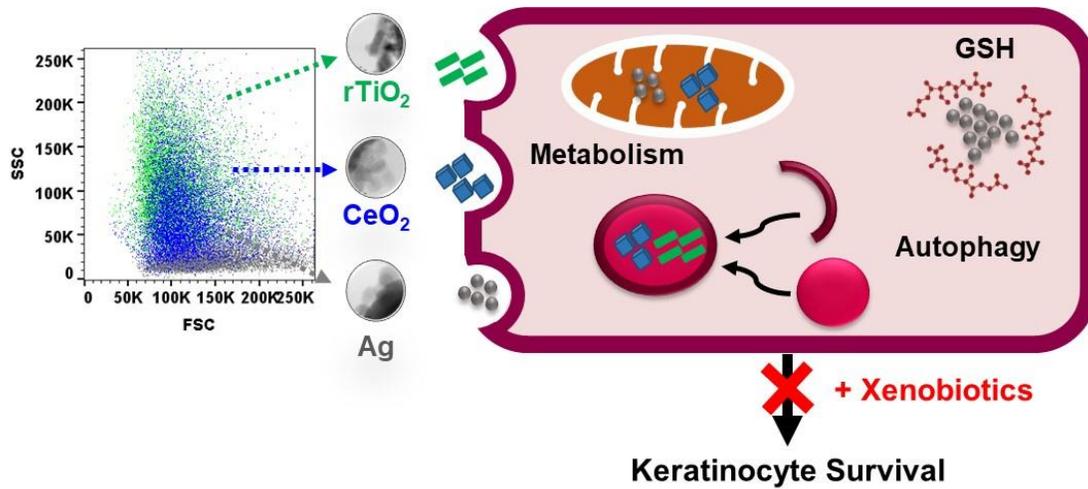


Figura 37. Mecanismos de supervivencia de queratinocitos expuestos a Mt-NPs y su susceptibilidad a la exposición de xenobióticos.

4. DISCUSIÓN

A partir del surgimiento de la nanotecnología se han incrementado considerablemente los estudios que hacen referencia a la toxicidad de las nanopartículas en los cosméticos. En estos, es común el uso de Mt-NPs debido a que proveen solubilidad, transparencia, color, durabilidad y sirven como protectores a los UV; además, tienen efectos antibacteriales y antioxidantes (Niska et al. 2018, Shokri 2017, Raj et al. 2012). Un gran número de reportes han evaluado la toxicidad de las Mt-NPs en queratinocitos (Crosera et al. 2015, Carrola et al. 2016), y ante la ausencia de toxicidad (muerte celular) las Mt-NPs han sido consideradas seguras para su uso en los cosméticos. En este trabajo demostramos que en ausencia de toxicidad, los queratinocitos sobreviven en respuesta a exposiciones sub-tóxicas de Mt-NPs dependientes de la activación de procesos homeostáticos. Específicamente, demostramos que cuando la autofagia protege a los queratinocitos de las NPs de rTiO₂ y CeO₂, la homeostasis de GSH, pero no el daño oxidante, es esencial para la sobrevivencia de las células expuestas a las NPs de Ag. Además, los queratinocitos tratados con las NPs de rTiO₂ y Ag mostraron un fenotipo menos energético. Finalmente, también demostramos la sensibilidad que los queratinocitos adquieren después de ser expuestos a Mt-NPs y posteriormente a xenobióticos ambientales.

Muchas de las NPs usadas en pruebas de toxicidad son utilizadas tal cual son adquiridas, e incluso muchos estudios toman lo reportado por los proveedores. En teoría, los métodos de síntesis de cada material reflejan su estabilidad, manteniendo sus características fisicoquímicas a través del tiempo, incluyendo su tamaño nanométrico (Singh et al. 2019). Algunos materiales poseen una alta energía libre de superficie capaz de facilitar la agregación de estos (Kocjan, Logar and Shen 2017). En el presente estudio, observamos aglomerados/agregados de hasta 200 nm por medio de microscopia de transmisión electrónica. Por ello, diseñamos un protocolo de dispersión, que incluyó cambios en amplitud, energía y tiempo para cada material, y que nos permitió la obtención de tamaños < 100 nm. Este protocolo fue seguido durante toda la experimentación bajo las mismas condiciones.

4.1 Características fisicoquímicas de las Mt-NPs

Las características fisicoquímicas de las NPs (forma y tamaño) determinan su toxicidad y son consideradas cuando se interpretan los efectos tóxicos en la célula. Estudios previos han reportado correlaciones inversas entre la toxicidad y el tamaño y la captación de las NPs de TiO₂ y Ag, donde tamaños ≤ 50 nm son tóxicas, mientras que aquellas ≥ 100 nm son inocuas y muestran tasas bajas de captación. Otros estudios demuestran que nanorods de CeO₂ (5-8 nm) son tóxicos mientras que cubos octaédricos del mismo material (11-16 nm) son inocuos en macrófagos. De manera similar, las NPs tipo rod de Ag tienen una mayor la tasa de permeabilidad a través de la piel (Tak et al. 2015). Mientras que, las NPs que se emplearon en este trabajo tienen diferente tamaño en seco e hidrodinámico (40-90 nm) sugiriendo que ni la absorción ni la forma deberían ser un factor en los efectos tóxicos.

En este estudio evaluamos los cambios en SSC como una medida indirecta de la captura de las Mt-NPs (Ibuki and Toyooka 2012, Zucker et al. 2013, Njoroge, Yourick and Principato 2018, Park et al. 2017, Zucker and Daniel 2012, Toduka, Toyooka and Ibuki 2012, Suzuki, Toyooka and Ibuki 2007) y observamos una relación dosis-dependiente entre los cambios en SSC y la exposición a las Mt-NPs. En relación con esto, el perfil cinético de captura de las tres NPs fue similar, mostrando el pico de cambio a las 12 horas. No pudimos generar una comparación directa de los cambios en SSC entre las diferentes Mt-NPs debido a que los parámetros de *light scatter* están directamente relacionados a las propiedades intrínsecas refractivas de cada metal. Las NPs de rTiO₂ y CeO₂ muestran 20 veces más el índice refractivo que las NPs Ag (~ 2 vs ~ 0.1) (Krogman, Druffel and Sunkara 2005, Nobbmann and Morfesis 2009, Yabe and Sato 2003), sin embargo, la dependencia de la dosis y la cinética sugirieron que hay un grado similar de captación entre las tres Mt-NPs usadas.

Algunas biomoléculas (principalmente proteínas) en sistemas biológicos y medio de cultivo son unidas o absorbidas por las NPs generando coronas (Kumar and Dixit 2017, Cho et al. 2013, Rezaei et al. 2019, Mourdikoudis, Pallares and Thanh 2018).

La corona puede regular la agregación/dispersión de las NPs (Durán et al. 2015, Barbalinardo et al. 2018, Runa et al. 2017). En SFB, la albúmina es la proteína más abundante (85% del total de proteínas contenidas y una concentración de 45-50 mg/ml en suero) alcanzando una concentración de 5 mg/ml cuando el medio de cultivo estaba suplementado al 10% de SFB. Cuando las NPs son incubadas en medio de cultivo o en fluidos biológicos, la albúmina, es la primera en formar coronas alrededor de las NPs (incluyendo las de TiO₂, CeO₂ y Ag) (Hansen and Thünemann 2015, Treuel et al. 2010, Shannahan et al. 2013), sin embargo, otras proteínas presentes en suero también pueden unirse a las NPs. La BSA ha sido utilizado para estabilizar la dispersión de las NPs (Zook et al. 2011, Ji et al. 2010) y en este estudio, para las exposiciones de los cultivos celulares redujimos la cantidad de SFB a una concentración media de 0.5% y suplementamos con 5 mg/ml de BSA para homogenizar la unión de ésta con las NPs y generar una suspensión estable. La BSA no afectó la captura de las NPs probada por los cambios en SSC (los datos no se muestran).

Es posible que la BSA haya interferido en las lecturas de diámetro hidrodinámico e índice de polidispersión obtenidos por el Zetasizer, debido a la fluorescencia intrínseca que esta genera (Hlady and Andrade 1988). Asimismo, la variaciones obtenidas en las lecturas de las NPs en agua y en medio de cultivo, suplementado o no con SFB y BSA, dependió de las suposiciones que el equipo hace para generar los resultados (Filipe, Hawe and Jiskoot 2010). Debido a que el equipo requiere de valores de índices de refracción previamente calculados (tanto del BSA, NPs y soluciones de dispersión) por la misma empresa Malvern.com u otros laboratorios (<https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2274>, <http://www.materials-talks.com/blog/2016/09/15/nta-or-dls/>). Ha sido reportado que los datos generados por técnicas de alta sensibilidad pueden ser alterados por la fluorescencia emitida por las NPs en medio de cultivo u otros vehículos que también pueden interferir en las lecturas (Ong et al. 2014). Por lo anterior, decidimos trabajar con NTA ya que en esta técnica no se requieren valores de índice de refracción para generar los valores, lo que permite que se genere información que se registra en tiempo real. Sin embargo, solo pudimos obtener los datos en la matriz de agua.

4.2 Efectos citotóxicos de las Mt-NPs

Constantemente se ha reportado que las propiedades fisicoquímicas de las NPs pueden interferir con las pruebas usadas para determinar los efectos biológicos (Ong et al. 2014). Diferentes enfoques han sido empleados para probar la toxicidad de las NPs y algunos de los más comunes son los basados en la reducción de tetrazolio (MTT, MTS y WST8) o rezasurina (Alamar blue) compuestos involucrados en la vía NADH-dependiente de la reacción redox catalizada por oxidorreductasas celulares (Riss et al. 2004). Sin embargo, las Mt-NPs, incluyendo las de TiO₂ y Ag han mostrado interferencias con estas pruebas (Ong et al. 2014, Wang, Yu and Wickliffe 2011, Kong et al. 2011, Liang et al. 2015, Almutary and Sanderson 2016). Por otro lado, se decidió cuantificar los cambios en la viabilidad por medio de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática cuya detección no depende de las propiedades bioquímicas de la célula. Sin embargo, se ha demostrado que las Mt-NPs interfieren con la prueba de la liberación de la LDH (Liang et al. 2015, Han et al. 2011), y en efecto, observamos la interferencia de las Mt-NPs de estudio con las pruebas de MTT (los datos no se muestran) y LDH. Así, en este estudio, evaluamos la pérdida de la integridad de la membrana plasmática por citometría de flujo a través de PI. La fluorescencia de los compuestos usados (PI, DCFDA y Mitosox) y las pruebas bioquímicas probadas (ATP) no mostraron interferencia por las Mt-NPs. Desafortunadamente, las propiedades de fluorescencia o el potencial de interferencia de los ensayos realizados en las células casi nunca son reportadas en la literatura, por lo que creemos que debe de hacerse énfasis al evaluar la “seguridad” de estos compuestos en aplicaciones cosméticas.

Estudios previos han reportaron distintos efectos de las Mt-NPs sobre la proliferación de los queratinocitos. Algunos reportan que el uso de las NPs de Ag y CeO₂ incrementan la proliferación y cicatrización de las heridas (Liu et al. 2010, Chigurupati et al. 2013), mientras que otros indican que el TiO₂ no afecta o disminuye el crecimiento de los queratinocitos (Zanette et al. 2011). En el presente estudio observamos una ligera disminución en la proliferación ante la exposición a las NPs de rTiO₂ y CeO₂, pero no se observaron efectos con las NPs de Ag. Esos

efectos no fueron relacionados a la senescencia celular evaluada por cambios en la actividad de la β -galactosidasa. Creemos que una exposición más larga a Mt-NPs podría inducir efectos más marcados en la proliferación o senescencia de los queratinocitos, sin embargo, esto no fue estudiado a fondo en este trabajo. Curiosamente, estudios recientes han demostrado que las NPs de CeO₂ protegen en contra de la radiación UV al inducir senescencia en fibroblastos de piel (Li et al. 2019b).

Se ha reportado que la funcionalización de fullerenos con aminoácidos los hace capaces de incrementar la expresión de ciertas interleucinas proinflamatorias en queratinocitos epidérmicos humanos (Rouse et al. 2006). En este estudio determinamos los niveles de interleucinas por el método MAGPix con las concentraciones iniciales de las Mt-NPs (50-150 μ g/ml). Únicamente las NPs de Ag mostraron diferencias respecto al control. Sin embargo, los datos requieren ser confirmados para establecer los cambios generados por las Mt-NPs. Finalmente, incluimos controles positivos de proteínas relacionadas a la inflamación, aunque no observamos cambios en su expresión.

4.3 La autofagia como protector de citotoxicidad ante Mt-NPs

Se ha reportado que las Mt-NPs son capaces de inducir autofagia (Mohammadinejad et al. 2019); sin embargo, estudios previos en células HaCaT no reportaron la relación de la autofagia con la sobrevivencia celular (Lopes et al. 2016, Zhao et al. 2013b). En otros estudios se analizó la relación directa de la protección de las NPs Ag en diferentes líneas celulares (Li et al. 2019a, Lin et al. 2018, Fageria et al. 2017, Zhu et al. 2017, Wu et al. 2016, Ong et al. 2014). Son pocos los estudios que han caracterizado el rol exacto que juega la autofagia en la sobrevivencia de las células expuestas a concentraciones sub-tóxicas de Mt-NPs, además de aquellos que abordan la comparación de diferentes Mt-NPs en queratinocitos. Nuestros resultados demostraron que la autofagia es un mecanismo de sobrevivencia de los queratinocitos expuestos a NPs rTiO₂ y CeO₂, pero no sucede

lo mismo con las NPs de Ag. Estos datos fueron corroborados con el incremento en la actividad lisosomal determinada por la prueba de rojo neutro. La autofagia ha sido previamente reportada como un mecanismo protector en contra de la toxicidad de NPs de TiO₂ y Ag a través de la vía de generación de estrés oxidante (Fageria et al. 2017, Wu et al. 2016, Zhang et al. 2016), sin embargo, ni las ROS ni el estrés oxidante participaron en la toxicidad de rTiO₂ y CeO₂.

4.4 El GSH es importante en la sobrevivencia celular ante las NPs de Ag

La homeostasis celular redox está caracterizada por mantener un balance entre la generación de ROS y la habilidad de las células para neutralizarlas a través de antioxidantes y/o de reparación de los posibles daños oxidantes. Se ha reportado que las NPs Ag tienen la capacidad de liberar Ag (Ag⁰ [elemental] e iones de Ag⁺) dentro de las células, lo que provoca la citotoxicidad (Kittler et al. 2010, Wang et al. 2015). El GSH es la mejor defensa antioxidante en las células, y se sabe que los tioles, contenidos en biomoléculas como residuos de cisteína tienen una alta afinidad por la plata (Ag⁰, Ag⁺ o NPs). El GSH ha sido usado para estabilizar a NPs de Ag (Yuan et al. 2013, Tan et al. 2013, Balavandy et al. 2014) debido a que estas tienen una alta capacidad de unirse a las cisteínas del GSH, además, el GSH parece mejorar las propiedades fluorescentes de las NPs de Ag (Feng et al. 2019, Yuan et al. 2013, Tan et al. 2013). En este estudio observamos una fluorescencia alta (farr-red a infrarrojo) en las células que tenían NPs, pero no autofluorescencia por las mismas NPs de Ag, lo que sugiere que la fluorescencia se genera en el ambiente intracelular, probablemente por la unión a los tioles. De acuerdo con la inhibición de la síntesis del GSH, pero no al reciclaje de éste promovido por las NPs de Ag, demostró que el GSH, pero no la generación de ROS, son esenciales para la sobrevivencia de las células tratadas con las NPs de Ag probablemente por reducción de las mismas. Estos resultados sugieren que los cambios en la autofluorescencia de las NPs de Ag permiten identificar las alteraciones en el estado redox dentro de las células vivas, pero esto requiere de un análisis más profundo.

Contradictoriamente, existen estudios que reportan incrementos en la generación de ROS por la exposición a NPs de TiO₂ (Wright et al. 2017, Lopes et al. 2016, Gao et al. 2015, Fujita et al. 2009). Mientras que, las NPs de CeO₂ han sido ampliamente reportadas debido a sus efectos antioxidantes (Chigurupati et al. 2013). Por ejemplo, las NPs de CeO₂ (100 µg/ml, 48 horas) protegen a los queratinocitos del daño oxidante producido por la depleción de GSH (Singh et al. 2016). Se ha observado un incremento en ROS solo a concentraciones altas de NPs de CeO₂ (~200 µg/ml) (Horie et al. 2011), y se han observado relaciones entre las ROS/estrés oxidante y la autofagia inducida por Mt-NPs, donde la inducción de autofagia depende de ROS (Zhu et al. 2017), o la autofagia regula el daño inducido por las Mt-NPs (Fageria et al. 2017, Wu et al. 2016, Zhang et al. 2016). Sin embargo, a niveles sub-tóxicos de exposición (30 µg/ml, 48 horas) ninguna de las Mt-NPs probadas aumentó los niveles de ROS en el citosol o en la mitocondria.

4.5 Alteración en el metabolismo energético por las Mt-NPs

Células altamente proliferativas, como los queratinocitos, muestran tasas altas de metabolismo necesarias para el mantenimiento de energía y para la biosíntesis de biomoléculas (Viticchiè et al. 2015). Se ha demostrado que el metabolismo central del carbono a través de la glucólisis es importante para una respuesta a infecciones en queratinocitos. Aunado a esto, se ha reportado que los xenobióticos pueden inducir un estrés metabólico en los queratinocitos (Xiao et al. 2016) y que las NPs de Ag alteran el metabolismo celular *in vitro* e *in vivo* (Lee et al. 2015, Chen et al. 2014, Jarak et al. 2017). En los queratinocitos, las NPs de Ag han mostrado la depleción de la energía, además de alteraciones en el metabolismo mitocondrial (Carrola et al. 2016, Tucci et al. 2013). En este estudio utilizamos el análisis del flujo metabólico y demostramos que las NPs de rTiO₂ y Ag disminuyen la glucólisis y la función mitocondrial en los queratinocitos. Si bien este fenotipo energético no resultó en la disminución del contenido total de ATP, sugiere que el estrés del estatus metabólico puede promover la sensibilidad de las células a insultos secundarios como por ejemplo a xenobióticos.

4.6 Incremento en la sensibilidad de los queratinocitos a xenobióticos por Mt-NPs

Los resultados anteriormente descritos, demuestran que los queratinocitos expuestos a concentraciones sub-tóxicas de Mt-NPs se encuentran en un estado de “estrés”, condición en donde la sobrevivencia depende de la activación de mecanismos homeostáticos. Las NPs que han sido usadas en los cosméticos son filtros inorgánicos en contra de la radiación UV (Schneider and Lim 2018, Palanki et al. 2015, Arora et al. 2015). Sin embargo, varios reportes indican que el TiO₂ y la Ag sensibilizan a los queratinocitos al efecto fototóxico de la radiación UV (anatasa/rutilo) (Horie et al. 2016, Xue et al. 2010, Tyagi et al. 2016, Xue et al. 2016, Fenoglio et al. 2013, Yin et al. 2012, Xue et al. 2011). A pesar de ello, se ha realizado poca investigación en relación a los posibles efectos de las Mt-NPs sobre la toxicidad de productos químicos no UV o xenobióticos en células de la piel. El arsénico es un contaminante ambiental que su consumo o exposición puede generar cáncer de piel (Karagas et al. 2015). Las NPs de TiO₂ incrementan la genotoxicidad del arsénico en células híbridas de cáncer humano-hámster (AL) (Wang et al. 2017), y en este estudio encontramos que las NPs de TiO₂, CeO₂ y Ag incrementan la toxicidad del arsénico. Se ha reportado que pesticidas como el PQ ejercen toxicidad sobre la piel (Zhou et al. 2013, Black et al. 2008, Srikrishna, Riviere and Monteiro-Riviere 1992) y las NPs de Ag también incrementan la toxicidad en células expuestas a PQ. Nuestros resultados revelan que las Mt-NPs pueden modular significativamente la toxicidad de xenobióticos en células de la piel.

Nuestros resultados demuestran una contribución de la autofagia y la homeostasis del GSH en la sobrevivencia de los queratinocitos expuestos a concentraciones sub-tóxicas de Mt-NPs y un marcado incremento en la susceptibilidad de los queratinocitos expuestos a Mt-NPs después de su exposición a xenobióticos. Los resultados obtenidos muestran que incluso en ausencia de estrés oxidante (incrementos en los niveles de ROS) o depleción de energía (ATP), los queratinocitos expuestos a Mt-NPs presentan en un ambiente de estrés metabólico-redox, y que los xenobióticos los perturban aún más promoviendo la toxicidad

celular. Finalmente, proponemos que la evaluación de los potenciales efectos tóxicos de las Mt-NPs usadas en la cosmética y en otras aplicaciones, sean redefinidas para la determinación no solo de su capacidad de inducir muerte celular, sino también el potencial para sensibilizar a las células de la piel a efectos tóxicos de xenobióticos capaces de perjudicar los mecanismos homeostáticos involucrados en la sobrevivencia celular.

5. CONCLUSIONES

- Las Mt-NPs $r\text{TiO}_2$, CeO_2 no mostraron citotoxicidad a concentraciones < 30 $\mu\text{g/ml}$ en células HaCaT y las Mt-NPs de $r\text{TiO}_2$ y CeO_2 disminuyeron ligeramente la proliferación.
- Las NPs de $r\text{TiO}_2$ y CeO_2 alteraron la proteostasis de los queratinocitos, evaluada por la autofagia. Las tres Mt-NPs no indujeron senescencia en el cultivo de células HaCaT.
- El balance redox, determinado por la homeostasis del GSH es esencial para la sobrevivencia de las células HaCaT expuestas a las NPs Ag y es independiente de la formación de ROS.
- El metabolismo celular de los queratinocitos fue disminuido por la exposición a las NPs de $r\text{TiO}_2$ y Ag. Las tres Mt-NPs incrementaron la sensibilidad celular a la exposición de xenobióticos, como el arsénico y PQ.

6. PERSPECTIVAS

- Evaluar detalladamente las características fisicoquímicas de cada nanomaterial, para descartar posibles interferencias asociados a los medios utilizados en la evaluación de los efectos tóxicos.
- Evaluar la generación de estrés oxidante por cada material a tiempos cortos.
- Indagar posibles mecanismos de inflamación activados por cada material y que pueden estar asociados a la autofagia.
- Esclarecer cual es el mecanismo celular por el cual se sensibilizan los queratinocitos ante xenobióticos como el arsénico y PQ.

7. REFERENCIAS

- Abdal Dayem, A., M. K. Hossain, S. B. Lee, K. Kim, S. K. Saha, G.-M. Yang, H. Y. Choi & S.-G. Cho (2017) The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 18, 120.
- Ahlberg, S., F. Rancan, M. Epple, K. Loza, D. Höppe, J. Lademann, A. Vogt, B. Kleuser, C. Gerecke & M. C. Meinke (2016) Comparison of different methods to study effects of silver nanoparticles on the pro- and antioxidant status of human keratinocytes and fibroblasts. *Methods*, 109, 55-63.
- Almutary, A. & B. J. S. Sanderson (2016) The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. *International Journal of Toxicology*, 35, 454-462.
- Anandhan, A., S. Lei, R. Levytsky, A. Pappa, M. I. Panayiotidis, R. L. Cerny, O. Khalimonchuk, R. Powers & R. Franco (2017) Glucose Metabolism and AMPK Signaling Regulate Dopaminergic Cell Death Induced by Gene (α -Synuclein)-Environment (Paraquat) Interactions. *Molecular neurobiology*, 54, 3825-3842.
- Arancibia, S., A. Barrientos, J. Torrejón, A. Escobar & C. J. Beltrán (2016) Copper oxide nanoparticles recruit macrophages and modulate nitric oxide, proinflammatory cytokines and PGE2 production through arginase activation. *Nanomedicine*, 11, 1237-1251.
- Arora, S., N. Tyagi, A. Bhardwaj, L. Rusu, R. Palanki, K. Vig, S. R. Singh, A. P. Singh, S. Palanki, M. E. Miller, J. E. Carter & S. Singh (2015) Silver nanoparticles protect human keratinocytes against UVB radiation-induced DNA damage and apoptosis: potential for prevention of skin carcinogenesis. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 11, 1265-1275.
- Aueviriyavit, S., D. Phummiratch & R. Maniratanachote (2014) Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells – Induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles. *Toxicology Letters*, 224, 73-83.
- Balavandy, S. K., K. Shameli, D. R. B. A. Biak & Z. Z. Abidin (2014) Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathione mediated by green method. *Chemistry Central journal*, 8, 11-11.
- Barbalinardo, M., F. Caicci, M. Cavallini & D. Gentili (2018) Protein Corona Mediated Uptake and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Mouse Embryonic Fibroblast. *Small*, 14, 1801219.
- Behzadi, S., V. Serpooshan, W. Tao, M. A. Hamaly, M. Y. Alkawareek, E. C. Dreaden, D. Brown, A. M. Alkilany, O. C. Farokhzad & M. Mahmoudi (2017) Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society reviews*, 46, 4218-4244.
- Berne, B. J. & R. Pecora. 2000. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation.
- Black, A. T., J. P. Gray, M. P. Shakarjian, D. L. Laskin, D. E. Heck & J. D. Laskin (2008) Increased oxidative stress and antioxidant expression in mouse keratinocytes following exposure to paraquat. *Toxicology and applied pharmacology*, 231, 384-392.

- Boyde, A. & S. J. Jones (1996) Scanning electron microscopy of bone: Instrument, specimen, and issues. *Microscopy Research and Technique*, 33, 92-120.
- Calzolari, L., F. Franchini, D. Gilliland & F. Rossi (2010) Protein–Nanoparticle Interaction: Identification of the Ubiquitin–Gold Nanoparticle Interaction Site. *Nano Letters*, 10, 3101-3105.
- Carrola, J., V. Bastos, I. Jarak, R. Oliveira-Silva, E. Malheiro, A. L. Daniel-da-Silva, H. Oliveira, C. Santos, A. M. Gil & I. F. Duarte (2016) Metabolomics of silver nanoparticles toxicity in HaCaT cells: structure–activity relationships and role of ionic silver and oxidative stress. *Nanotoxicology*, 10, 1105-1117.
- Coleman, J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1, 1397-1406.
- Crosera, M., A. Prodi, M. Mauro, M. Pelin, C. Florio, F. Bellomo, G. Adami, P. Apostoli, G. De Palma, M. Bovenzi, M. Campanini & F. L. Filon (2015) Titanium Dioxide Nanoparticle Penetration into the Skin and Effects on HaCaT Cells. *International journal of environmental research and public health*, 12, 9282-9297.
- Cui, Y., H. Liu, M. Zhou, Y. Duan, N. Li, X. Gong, R. Hu, M. Hong & F. Hong (2011) Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96A, 221-229.
- Czajkowska-Kośnik, A., M. Szekalska & K. Winnicka (2019) Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 71, 156-166.
- Chaverri, J., N. Cardenas & Y. Chirino (2018) El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno. Aspectos básicos e importancia biológica. *Educación Química*, 17, 443.
- Chen, R.-J., Y.-H. Lee, Y.-L. Yeh, Y.-J. Wang & B. Wang, Jr. (2016) The Roles of Autophagy and the Inflammasome during Environmental Stress-Triggered Skin Inflammation. *International journal of molecular sciences*, 17, 2063.
- Chen, X. & H. J. Schluesener (2008) Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*, 176, 1-12.
- Chen, Y., Z. Wang, M. Xu, X. Wang, R. Liu, Q. Liu, Z. Zhang, T. Xia, J. Zhao, G. Jiang, Y. Xu & S. Liu (2014) Nanosilver Incurs an Adaptive Shunt of Energy Metabolism Mode to Glycolysis in Tumor and Nontumor Cells. *ACS Nano*, 8, 5813-5825.
- Chigurupati, S., M. R. Mughal, E. Okun, S. Das, A. Kumar, M. McCaffery, S. Seal & M. P. Mattson (2013) Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 34, 2194-2201.
- Cho, E. J., H. Holback, K. C. Liu, S. A. Abouelmagd, J. Park & Y. Yeo (2013) Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 2093-2110.
- Choi, H. S., W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. Itty Ipe, M. G. Bawendi & J. V. Frangioni (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nature biotechnology*, 25, 1165-1170.
- Chueh William, C. & M. Haile Sossina (2010) A thermochemical study of ceria: exploiting an old material for new modes of energy conversion and CO₂ mitigation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368, 3269-3294.

- Durán, N., C. P. Silveira, M. Durán & D. S. T. Martinez (2015) Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *Journal of nanobiotechnology*, 13, 55-55.
- Fageria, L., V. Pareek, R. V. Dilip, A. Bhargava, S. S. Pasha, I. R. Laskar, H. Saini, S. Dash, R. Chowdhury & J. Panwar (2017) Biosynthesized Protein-Capped Silver Nanoparticles Induce ROS-Dependent Proapoptotic Signals and Prosurvival Autophagy in Cancer Cells. *ACS omega*, 2, 1489-1504.
- Feng, T., Y. Chen, B. Feng, J. Yan & J. Di (2019) Fluorescence red-shift of gold-silver nanoclusters upon interaction with cysteine and its application. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 206, 97-103.
- Fenoglio, I., J. Ponti, E. Alloa, M. Ghiazza, I. Corazzari, R. Capomaccio, D. Rembges, S. Oliaro-Bosso & F. Rossi (2013) Singlet oxygen plays a key role in the toxicity and DNA damage caused by nanometric TiO₂ in human keratinocytes. *Nanoscale*, 5, 6567-6576.
- Filipe, P., J. N. Silva, R. Silva, J. L. Cirne de Castro, M. Marques Gomes, L. C. Alves, R. Santus & T. Pinheiro (2009) Stratum Corneum Is an Effective Barrier to TiO₂ and ZnO Nanoparticle Percutaneous Absorption. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22, 266-275.
- Filipe, V., A. Hawe & W. Jiskoot (2010) Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27, 796-810.
- Firooz, A., S. Nafisi & H. I. Maibach (2015) Novel drug delivery strategies for improving econazole antifungal action. *International Journal of Pharmaceutics*, 495, 599-607.
- Foss Hansen, S., L. R. Heggelund, P. Revilla Besora, A. Mackevica, A. Boldrin & A. Baun (2016) Nanoproducts – what is actually available to European consumers? *Environmental Science: Nano*, 3, 169-180.
- Fotakis, G. & J. A. Timbrell (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177.
- Franco, R. & J. A. Cidlowski (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death And Differentiation*, 16, 1303.
- Franco, R. & J. A. Cidlowski (2012) Glutathione efflux and cell death. *Antioxidants & redox signaling*, 17, 1694-1713.
- Franco, R., M. I. Panayiotidis & J. A. Cidlowski (2007) Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. *The Journal of biological chemistry*, 282, 30452-30465.
- Fu, P. P., Q. Xia, H.-M. Hwang, P. C. Ray & H. Yu (2014) Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 64-75.
- Fujita, K., M. Horie, H. Kato, S. Endoh, M. Suzuki, A. Nakamura, A. Miyauchi, K. Yamamoto, S. Kinugasa, K. Nishio, Y. Yoshida, H. Iwahashi & J. Nakanishi (2009) Effects of ultrafine TiO₂ particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: Involvement of extracellular matrix and cell adhesion. *Toxicology Letters*, 191, 109-117.
- Gajbhiye, S. & S. Sakharwade. 2016. *Silver Nanoparticles in Cosmetics*.

- Gao, X., Y. Wang, S. Peng, B. Yue, C. Fan, W. Chen & X. Li (2015) Comparative toxicities of bismuth oxybromide and titanium dioxide exposure on human skin keratinocyte cells. *Chemosphere*, 135, 83-93.
- Gasque Silva, L. (2013) Arsénico, el elemento inclasificable. *Educación Química*, 24, 495-500.
- Godic, A., B. Poljšak, M. Adamic & R. Dahmane (2014) The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 860479-860479.
- Grant, C. A., P. C. Twigg, R. Baker & D. J. Tobin (2015) Tattoo ink nanoparticles in skin tissue and fibroblasts. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6, 1183-1191.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten & M. Karin (2010) Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140, 883-899.
- Gupta, S. M. & M. Tripathi (2011) A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Science Bulletin*, 56, 1639.
- Han, X., R. Gelein, N. Corson, P. Wade-Mercer, J. Jiang, P. Biswas, J. N. Finkelstein, A. Elder & G. Oberdörster (2011) Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*, 287, 99-104.
- Hansen, U. & A. F. Thünemann (2015) Characterization of Silver Nanoparticles in Cell Culture Medium Containing Fetal Bovine Serum. *Langmuir*, 31, 6842-6852.
- Hayashi, Y., L.-H. Heckmann, V. Simonsen & J. J. Scott-Fordsmand (2013) Time-course profiling of molecular stress responses to silver nanoparticles in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 219-226.
- Hayflick, L. & P. S. Moorhead (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621.
- He, C. & D. J. Klionsky (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, 67-93.
- Hlady, V. & J. D. Andrade (1988) Fluorescence emission from adsorbed bovine serum albumin and albumin-bound 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate studied by TIRF. *Colloids and Surfaces*, 32, 359-369.
- Hodges, G. J. & J. M. Johnson (2009) Adrenergic control of the human cutaneous circulation. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34, 829-839.
- Hofmeister, H., G. L. Tan & M. Dubiel (2005) Shape and Internal Structure of Silver Nanoparticles Embedded in Glass. *Journal of Materials Research*, 20, 1551-1562.
- Høgsberg, T., K. Hutton Carlsen & J. Serup (2013) High prevalence of minor symptoms in tattoos among a young population tattooed with carbon black and organic pigments. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 27, 846-852.
- Høgsberg, T., K. Loeschner, D. Löf & J. Serup (2011) Tattoo inks in general usage contain nanoparticles. *British Journal of Dermatology*, 165, 1210-1218.
- Horie, M., K. Nishio, H. Kato, K. Fujita, S. Endoh, A. Nakamura, A. Miyauchi, S. Kinugasa, K. Yamamoto, E. Niki, Y. Yoshida, Y. Hagihara & H. Iwahashi (2011) Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. *The Journal of Biochemistry*, 150, 461-471.
- Horie, M., S. Sugino, H. Kato, Y. Tabei, A. Nakamura & Y. Yoshida (2016) Does photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles correspond to photo-cytotoxicity? Cellular uptake of

- TiO₂ nanoparticles is important in their photo-cytotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26, 284-294.
- Huang, H.-W., C.-H. Lee & H.-S. Yu (2019) Arsenic-Induced Carcinogenesis and Immune Dysregulation. *International journal of environmental research and public health*, 16, 2746.
- Huang, Y.-W., C.-h. Wu & R. S. Aronstam (2010) Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. *Materials*, 3, 4842-4859.
- Ibuki, Y. & T. Toyooka. 2012. Nanoparticle Uptake Measured by Flow Cytometry. In *Nanotoxicity: Methods and Protocols*, ed. J. Reineke, 157-166. Totowa, NJ: Humana Press.
- Jarak, I., J. Carrola, A. S. Barros, A. M. Gil, M. d. L. Pereira, M. L. Corvo & I. F. Duarte (2017) From the Cover: Metabolism Modulation in Different Organs by Silver Nanoparticles: An NMR Metabolomics Study of a Mouse Model. *Toxicological Sciences*, 159, 422-435.
- Jeevanandam, J., A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne & M. K. Danquah (2018) Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9, 1050-1074.
- Ji, Z., X. Jin, S. George, T. Xia, H. Meng, X. Wang, E. Suarez, H. Zhang, E. M. V. Hoek, H. Godwin, A. E. Nel & J. I. Zink (2010) Dispersion and Stability Optimization of TiO₂ Nanoparticles in Cell Culture Media. *Environmental Science & Technology*, 44, 7309-7314.
- Jiang, J., G. Oberdörster, A. Elder, R. Gelein, P. Mercer & P. Biswas (2008) Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase? *Nanotoxicology*, 2, 33-42.
- Journey, W. S. & R. H. Goldman (2014) Occupational handling of nickel nanoparticles: A case report. *American Journal of Industrial Medicine*, 57, 1073-1076.
- Kaludercic, N., S. Deshwal & F. Di Lisa (2014) Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Frontiers in physiology*, 5, 285-285.
- Kang, S. J., Y. J. Lee, E.-K. Lee & M.-K. Kwak (2012) Silver nanoparticles-mediated G2/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2-GSH signaling. *Toxicology Letters*, 211, 334-341.
- Karagas, M. R., A. Gossai, B. Pierce & H. Ahsan (2015) Drinking Water Arsenic Contamination, Skin Lesions, and Malignancies: A Systematic Review of the Global Evidence. *Current environmental health reports*, 2, 52-68.
- Kaul, S., N. Gulati, D. Verma, S. Mukherjee & U. Nagaich (2018) Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. *Journal of Pharmaceutics*, 2018, 19.
- Keston, A. S. & R. Brandt (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry*, 11, 1-5.
- Kezic, S. & J. B. Nielsen (2009) Absorption of chemicals through compromised skin. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 82, 677-688.
- Khalandi, B., N. Asadi, M. Milani, S. Davaran, A. J. N. Abadi, E. Abasi & A. Akbarzadeh (2017) A Review on Potential Role of Silver Nanoparticles and Possible Mechanisms of their Actions on Bacteria. *Drug Res (Stuttg)*, 11, 70-76.
- Kim, K. E., D. Cho & H. J. Park (2016) Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sciences*, 152, 126-134.

- Kittler, S., C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller & M. Epple (2010) Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chemistry of Materials*, 22, 4548-4554.
- Kocjan, A., M. Logar & Z. Shen (2017) The agglomeration, coalescence and sliding of nanoparticles, leading to the rapid sintering of zirconia nanoceramics. *Scientific Reports*, 7, 2541.
- Kokura, S., O. Handa, T. Takagi, T. Ishikawa, Y. Naito & T. Yoshikawa. 2010. *Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics*.
- Kong, B., J. H. Seog, L. M. Graham & S. B. Lee (2011) Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)*, 6, 929-941.
- Konigsberg, M. (2007) Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 26.
- Korsvik, C., S. Patil, S. Seal & W. T. Self (2007) Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chemical Communications*, 1056-1058.
- Krogman, K. C., T. Druffel & M. K. Sunkara (2005) Anti-reflective optical coatings incorporating nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, S338-S343.
- Krutmann, J., A. Bouloc, G. Sore, B. A. Bernard & T. Passeron (2017) The skin aging exposome. *Journal of Dermatological Science*, 85, 152-161.
- Kumar, A. & C. K. Dixit. 2017. 3 - Methods for characterization of nanoparticles. In *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, eds. S. Nimesh, R. Chandra & N. Gupta, 43-58. Woodhead Publishing.
- Larese Filon, F., M. Mauro, G. Adami, M. Bovenzi & M. Crosera (2015) Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72, 310-322.
- Lee, C.-H., W.-T. Liao & H.-S. Yu (2011) Aberrant immune responses in arsenical skin cancers. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 27, 396-401.
- Lee, M. J., S. J. Lee, S. J. Yun, J.-Y. Jang, H. Kang, K. Kim, I.-H. Choi & S. Park (2015) Silver nanoparticles affect glucose metabolism in hepatoma cells through production of reactive oxygen species. *International journal of nanomedicine*, 11, 55-68.
- Li, L., L. Li, X. Zhou, Y. Yu, Z. Li, D. Zuo & Y. Wu (2019a) Silver nanoparticles induce protective autophagy via Ca²⁺/CaMKK β /AMPK/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and rat brains. *Nanotoxicology*, 13, 369-391.
- Li, Y., X. Hou, C. Yang, Y. Pang, X. Li, G. Jiang & Y. Liu (2019b) Photoprotection of Cerium Oxide Nanoparticles against UVA radiation-induced Senescence of Human Skin Fibroblasts due to their Antioxidant Properties. *Scientific Reports*, 9, 2595.
- Liang, L., M. Cui, M. Zhang, P. Zheng, Z. Deng, S. Gao, X. Wang, X. Zhang, C. Wang, Y. Liu & L. Xie (2015) Nanoparticles' interference in the evaluation of in vitro toxicity of silver nanoparticles. *RSC Advances*, 5, 67327-67334.
- Lin, J., Y. Liu, H. Wu, Z. Huang, J. Ma, C. Guo, F. Gao, P. Jin, P. Wei, Y. Zhang, L. Liu, R. Zhang, L. Qiu, N. Gu & L. Wen (2018) Key Role of TFEB Nucleus Translocation for Silver Nanoparticle-Induced Cytoprotective Autophagy. *Small*, 14, 1703711.

- Liu, X., P.-y. Lee, C.-m. Ho, V. C. H. Lui, Y. Chen, C.-m. Che, P. K. H. Tam & K. K. Y. Wong (2010) Silver Nanoparticles Mediate Differential Responses in Keratinocytes and Fibroblasts during Skin Wound Healing. *ChemMedChem*, 5, 468-475.
- Lopes, V. R., V. Loitto, J.-N. Audinot, N. Bayat, A. C. Gutleb & S. Cristobal (2016) Dose-dependent autophagic effect of titanium dioxide nanoparticles in human HaCaT cells at non-cytotoxic levels. *Journal of Nanobiotechnology*, 14, 22.
- Madan, K. & S. Nanda (2018) Nanotechnology Driven Cosmetic Products: Commercial and Regulatory Milestones. *Applied Clinical Research, Clinical Trials and Regulatory Affairs*, 5, 112-121.
- Manke, A., L. Wang & Y. Rojanasakul (2013) Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed research international*, 2013, 942916.
- McCarley, K. D. & A. L. Bunge (2001) Pharmacokinetic models of dermal absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 1699-1719.
- Mohammadinejad, R., M. A. Moosavi, S. Tavakol, D. Ö. Vardar, A. Hosseini, M. Rahmati, L. Dini, S. Hussain, A. Mandegary & D. J. Klionsky (2019) Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy*, 15, 4-33.
- Moll, R., M. Divo & L. Langbein (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology*, 129, 705-733.
- Mortezaee, K., M. Najafi, H. Samadian, H. Barabadi, A. Azarnezhad & A. Ahmadi (2019) Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: A comprehensive review. *Chemico-Biological Interactions*, 312, 108814.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Mourdikoudis, S., R. M. Pallares & N. T. K. Thanh (2018) Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10, 12871-12934.
- Nafisi, S. & H. I. Maibach. 2017. Chapter 22 - Nanotechnology in Cosmetics. In *Cosmetic Science and Technology*, eds. K. Sakamoto, R. Y. Lochhead, H. I. Maibach & Y. Yamashita, 337-369. Amsterdam: Elsevier.
- Nanda, S. & K. Madan (2018) Nanotechnology Driven Cosmetic Products: Commercial and Regulatory Milestones. *Applied Clinical Research, Clinical Trials and Regulatory Affairs*, 05.
- Nassiri-Kashani, M., R. Namdar, S. Nafisi & H. I. Maibach (2016) Improved Voriconazole Topical Delivery by Nanoparticles (Minireview). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 50, 76-79.
- Nishanth, R. P., R. G. Jyotsna, J. J. Schlager, S. M. Hussain & P. Reddanna (2011) Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NFκB signaling pathway. *Nanotoxicology*, 5, 502-516.
- Niska, K., E. Zielinska, M. W. Radomski & I. Inkielewicz-Stepniak (2018) Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. *Chemico-Biological Interactions*, 295, 38-51.

- Njoroge, J. M., J. J. Yourick & M. A. Principato (2018) A flow cytometric analysis of macrophage- nanoparticle interactions in vitro: induction of altered Toll-like receptor expression. *International journal of nanomedicine*, 13, 8365-8378.
- Nobbmann, U. & A. Morfesis (2009) Light scattering and nanoparticles. *Materials Today*, 12, 52-54.
- Oberdörster, G., A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, H. Yang & A. r. f. t. I. R. F. R. S. I. N. T. S. W. Group (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 8.
- Oberdörster, G., V. Stone & K. Donaldson (2007) Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1, 2-25.
- Oh, N. & J.-H. Park (2014) Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International journal of nanomedicine*, 9 Suppl 1, 51-63.
- Olivares, C. & F. Solano (2009) New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22, 750-760.
- Omary, M. B., N.-O. Ku, P. Strnad & S. Hanada (2009) Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *The Journal of clinical investigation*, 119, 1794-1805.
- Ong, K. J., T. J. MacCormack, R. J. Clark, J. D. Ede, V. A. Ortega, L. C. Felix, M. K. M. Dang, G. Ma, H. Fenniri, J. G. C. Veinot & G. G. Goss (2014) Widespread nanoparticle-assay interference: implications for nanotoxicity testing. *PloS one*, 9, e90650-e90650.
- Ou, L., B. Song, H. Liang, J. Liu, X. Feng, B. Deng, T. Sun & L. Shao (2016) Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Particle and fibre toxicology*, 13, 57-57.
- Palanki, R., S. Arora, N. Tyagi, L. Rusu, A. P. Singh, S. Palanki, J. E. Carter & S. Singh (2015) Size is an essential parameter in governing the UVB-protective efficacy of silver nanoparticles in human keratinocytes. *BMC cancer*, 15, 636-636.
- Park, E.-J., J. Yoon, K. Choi, J. Yi & K. Park (2009) Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology*, 260, 37-46.
- Park, J., M. K. Ha, N. Yang & T. H. Yoon (2017) Flow Cytometry-Based Quantification of Cellular Au Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 89, 2449-2456.
- Piktel, E., U. Wnorowska, M. Cieśluk, P. Deptula, K. Pogoda, I. Misztalewska-Turkowicz, P. Paprocka, K. Niemirowicz-Laskowska, A. Z. Wilczewska, P. A. Janmey & R. Bucki (2019) Inhibition of inflammatory response in human keratinocytes by magnetic nanoparticles functionalized with PBP10 peptide derived from the PIP2-binding site of human plasma gelsolin. *Journal of nanobiotechnology*, 17, 22-22.
- Pincelli, C. & A. Marconi (2010) Keratinocyte stem cells: Friends and foes. *Journal of Cellular Physiology*, 225, 310-315.
- Powers Christina, M., R. Badireddy Appala, T. Ryde Ian, J. Seidler Frederic & A. Slotkin Theodore (2011) Silver Nanoparticles Compromise Neurodevelopment in PC12

- Cells: Critical Contributions of Silver Ion, Particle Size, Coating, and Composition. *Environmental Health Perspectives*, 119, 37-44.
- Price, E. W. (1975) The mechanism of lymphatic obstruction in endemic elephantiasis of the lower legs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 69, 177-181.
- Price, E. W. & W. J. Henderson (1978) The elemental content of lymphatic tissues of barefooted people in Ethiopia, with reference to endemic elephantiasis of the lower legs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 132-136.
- Prow, T. W., J. E. Grice, L. L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E. M. T. Wurm, C. Yoong, T. A. Robertson, H. P. Soyer & M. S. Roberts (2011) Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 470-491.
- Pulido-Reyes, G., F. Leganes, F. Fernandez-Pinas & R. Rosal (2017) Bio-nano interface and environment: A critical review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36, 3181-3193.
- Rahman, M. M., J. C. Ng & R. Naidu (2009) Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts on humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 31, 189-200.
- Raj, S., S. Jose, U. S. Sumod & M. Sabitha (2012) Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4, 186-193.
- Ramot, Y., R. Paus, S. Tiede & A. Zlotogorski (2009) Endocrine controls of keratin expression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 31, 389-399.
- Repetto, G., A. del Peso & J. L. Zurita (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3, 1125.
- Rezaei, G., S. M. Daghighi, I. Haririan, I. Yousefi, M. Raoufi, F. Rezaee & R. Dinarvand (2019) Protein corona variation in nanoparticles revisited: A dynamic grouping strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 179, 505-516.
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella & L. Minor. 2004. *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Roberts, M. S. & K. A. Walters. 2007. Human skin morphology and dermal absorption. 1-16.
- Robertson, T., W. Sanchez & M. Roberts (2010) Are Commercially Available Nanoparticles Safe When Applied to the Skin? *Journal of biomedical nanotechnology*, 6, 452-68.
- Rouse, J. G., J. Yang, A. R. Barron & N. A. Monteiro-Riviere (2006) Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology in Vitro*, 20, 1313-1320.
- Runa, S., M. Lakadamyali, M. L. Kemp & C. K. Payne (2017) TiO₂ Nanoparticle-Induced Oxidation of the Plasma Membrane: Importance of the Protein Corona. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121, 8619-8625.
- Sabella, S., R. P. Carney, V. Brunetti, M. A. Malvindi, N. Al-Juffali, G. Vecchio, S. M. Janes, O. M. Bakr, R. Cingolani, F. Stellacci & P. P. Pompa (2014) A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*, 6, 7052-7061.

- Safwat, M. A., G. M. Soliman, D. Sayed & M. A. Attia (2018) Fluorouracil-Loaded Gold Nanoparticles for the Treatment of Skin Cancer: Development, in Vitro Characterization, and in Vivo Evaluation in a Mouse Skin Cancer Xenograft Model. *Molecular Pharmaceutics*, 15, 2194-2205.
- Samiee, S. & E. Goharshadi. 2012. *Effects of different precursors on size and optical properties of ceria nanoparticles prepared by microwave-assisted method.*
- Sandjeu, Y. & M. Haftek (2009) Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 60 Suppl 4, 23-30.
- Sarria, V., S. Parra, Á. Rincón, C. Pulgarin & R. Torres-Palma (2005) NEW ELECTROCHEMICAL AND PHOTOCHEMICAL SYSTEMS FOR WATER AND WASTEWATER TREATMENT. *Revista Colombiana de Química*, 34, 161-173.
- Schiaffino, M. V. (2010) Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42, 1094-1104.
- Schneider, S. L. & H. W. Lim (2018) A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 0.
- Seiffert, K. & R. D. Granstein (2006) Neuroendocrine Regulation of Skin Dendritic Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1088, 195-206.
- Shakeel, M., F. Jabeen, S. Shabbir, M. Asghar, S. Khan & A. Chaudhry (2015) Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. *Biological Trace Element Research*, 172.
- Shannahan, J. H., X. Lai, P. C. Ke, R. Podila, J. M. Brown & F. A. Witzmann (2013) Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media. *PloS one*, 8, e74001-e74001.
- Sharifi, S., S. Behzadi, S. Laurent, M. L. Forrest, P. Stroeve & M. Mahmoudi (2012) Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society reviews*, 41, 2323-2343.
- Shi, H., R. Magaye, V. Castranova & J. Zhao (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology*, 10, 15-15.
- Shokri, J. (2017) Nanocosmetics: benefits and risks. *BiolImpacts : BI*, 7, 207-208.
- Singh, K., A. Raghav, P. K. Jha & S. Satapathi (2019) Effect of size and charge asymmetry on aggregation kinetics of oppositely charged nanoparticles. *Scientific Reports*, 9, 3762.
- Singh, R., A. S. Karakoti, W. Self, S. Seal & S. Singh (2016) Redox-Sensitive Cerium Oxide Nanoparticles Protect Human Keratinocytes from Oxidative Stress Induced by Glutathione Depletion. *Langmuir*, 32, 12202-12211.
- Srikrishna, V., J. E. Riviere & N. A. Monteiro-Riviere (1992) Cutaneous toxicity and absorption of paraquat in porcine skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115, 89-97.
- Stern, S. T., P. P. Adisheshaiah & R. M. Crist (2012) Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and fibre toxicology*, 9, 20-20.
- Suhail, M., A. Ali, S. Mathew, M. Shah, S. Harakeh, S. Ahmad, Z. Kazmi, M. Alhamdan, A. Chaudhary, G. Damanhoury & I. Qadri (2015) Nanomaterial Induced Immune Responses and Cytotoxicity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 15, 1-18.

- Suzuki, H., T. Toyooka & Y. Ibuki (2007) Simple and Easy Method to Evaluate Uptake Potential of Nanoparticles in Mammalian Cells Using a Flow Cytometric Light Scatter Analysis. *Environmental Science & Technology*, 41, 3018-3024.
- Szaciłowski, K., W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek, M. Brindell & G. Stochel (2005) Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *Chem Rev*, 105, 2647-94.
- Tak, Y. K., S. Pal, P. K. Naoghare, S. Rangasamy & J. M. Song (2015) Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Scientific reports*, 5, 16908-16908.
- Tan, L., A. Wan & H. Li (2013) Conjugating S-Nitrosothiols with Glutathione Stabilized Silver Sulfide Quantum Dots for Controlled Nitric Oxide Release and Near-Infrared Fluorescence Imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5, 11163-11171.
- Tarnuzzer, R. W., J. Colon, S. Patil & S. Seal (2005) Vacancy Engineered Ceria Nanostructures for Protection from Radiation-Induced Cellular Damage. *Nano Letters*, 5, 2573-2577.
- Thannickal, V. J. & B. L. Fanburg (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, L1005-L1028.
- Toduka, Y., T. Toyooka & Y. Ibuki (2012) Flow Cytometric Evaluation of Nanoparticles Using Side-Scattered Light and Reactive Oxygen Species-Mediated Fluorescence—Correlation with Genotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 46, 7629-7636.
- Traverso, N., R. Ricciarelli, M. Nitti, B. Marengo, A. L. Furfaro, M. A. Pronzato, U. M. Marinari & C. Domenicotti (2013) Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 972913-972913.
- Treuel, L., M. Malissek, J. S. Gebauer & R. Zellner (2010) The Influence of Surface Composition of Nanoparticles on their Interactions with Serum Albumin. *ChemPhysChem*, 11, 3093-3099.
- Triana-Martinez, F., L. Gomez-Quiroz & M. Konigsberg (2012) El flujo de la información y la proteostásis. Consecuencias fisiológicas. *Revista de educación Bioquímica*, 31, 136-144.
- Tucci, P., G. Porta, M. Agostini, D. Dinsdale, I. Iavicoli, K. Cain, A. Finazzi-Agró, G. Melino & A. Willis (2013) Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes. *Cell death & disease*, 4, e549-e549.
- Tungsanga, K., S. Chusilp, S. Israsena & V. Sitprija (1983) Paraquat poisoning: evidence of systemic toxicity after dermal exposure. *Postgraduate Medical Journal*, 59, 338.
- Tyagi, N., S. K. Srivastava, S. Arora, Y. Omar, Z. M. Ijaz, A. Al-Ghadhban, S. K. Deshmukh, J. E. Carter, A. P. Singh & S. Singh (2016) Comparative analysis of the relative potential of silver, Zinc-oxide and titanium-dioxide nanoparticles against UVB-induced DNA damage for the prevention of skin carcinogenesis. *Cancer Letters*, 383, 53-61.
- Vale, J. A., T. J. Meredith & B. M. Buckley (1987) Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Human Toxicology*, 6, 41-47.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic & M. Mazur (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.

- Vance, M. E., T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, Jr., D. Rejeski & M. S. Hull (2015) Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6, 1769-1780.
- Viticchiè, G., M. Agostini, A. M. Lena, M. Mancini, H. Zhou, L. Zolla, D. Dinsdale, G. Saintigny, G. Melino & E. Candi (2015) p63 supports aerobic respiration through hexokinase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 11577-11582.
- Wang, J., G. Zhou, C. Chen, H. Yu, T. Wang, Y. Ma, G. Jia, Y. Gao, B. Li, J. Sun, Y. Li, F. Jiao, Y. Zhao & Z. Chai (2007) Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*, 168, 176-85.
- Wang, L., T. Zhang, P. Li, W. Huang, J. Tang, P. Wang, J. Liu, Q. Yuan, R. Bai, B. Li, K. Zhang, Y. Zhao & C. Chen (2015) Use of Synchrotron Radiation-Analytical Techniques To Reveal Chemical Origin of Silver-Nanoparticle Cytotoxicity. *ACS Nano*, 9, 6532-6547.
- Wang, M., X. Lai, L. Shao & L. Li (2018) Evaluation of immunoresponses and cytotoxicity from skin exposure to metallic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 4445-4459.
- Wang, S., H. Yu & J. K. Wickliffe (2011) Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology in Vitro*, 25, 2147-2151.
- Wang, X., Y. Liu, J. Wang, Y. Nie, S. Chen, T. K. Hei, Z. Deng, L. Wu, G. Zhao & A. Xu (2017) Amplification of arsenic genotoxicity by TiO₂ nanoparticles in mammalian cells: new insights from physicochemical interactions and mitochondria. *Nanotoxicology*, 11, 978-995.
- Wright, C., A. K. V. Iyer, L. Wang, N. Wu, J. S. Yakisich, Y. Rojanasakul & N. Azad (2017) Effects of titanium dioxide nanoparticles on human keratinocytes. *Drug and chemical toxicology*, 40, 90-100.
- Wu, H., J. Lin, P. Liu, Z. Huang, P. Zhao, H. Jin, J. Ma, L. Wen & N. Gu (2016) Reactive oxygen species acts as executor in radiation enhancement and autophagy inducing by AgNPs. *Biomaterials*, 101, 1-9.
- Xiao, W., E. H. Sarsour, B. A. Wagner, C. M. Doskey, G. R. Buettner, F. E. Domann & P. C. Goswami (2016) Succinate dehydrogenase activity regulates PCB3-quinone-induced metabolic oxidative stress and toxicity in HaCaT human keratinocytes. *Archives of toxicology*, 90, 319-332.
- Xiao Wen, L., X. Zhi Ping, G. Jeffrey, V. Z. Andrei, S. R. Michael & L. Xin (2013) Penetration of Nanoparticles into Human Skin. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 6353-6366.
- Xu, C. & X. Qu (2014) Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *Npg Asia Materials*, 6, e90.
- Xue, C., X. Li, G. Liu & W. Liu (2016) Evaluation of Mitochondrial Respiratory Chain on the Generation of Reactive Oxygen Species and Cytotoxicity in HaCaT Cells Induced by Nanosized Titanium Dioxide Under UVA Irradiation. *International Journal of Toxicology*, 35, 644-653.
- Xue, C., W. Liu, J. Wu, X. Yang & H. Xu (2011) Chemoprotective effect of N-acetylcysteine (NAC) on cellular oxidative damages and apoptosis induced by nano titanium dioxide under UVA irradiation. *Toxicology in Vitro*, 25, 110-116.

- Xue, C., J. Wu, F. Lan, W. Liu, X. Yang, F. Zeng & H. Xu (2010) Nano Titanium Dioxide Induces the Generation of ROS and Potential Damage in HaCaT Cells Under UVA Irradiation. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 10, 8500-7.
- Yabe, S. & T. Sato (2003) Cerium Oxide for Sunscreen Cosmetics. *Journal of Solid State Chemistry*, 171, 7-11.
- Ye, B., M. A. Kirk, W. Chen, A. Oaks, J. Rest, A. Yacout & J. F. Stubbins (2011) TEM investigation of irradiation damage in single crystal CeO₂. *Journal of Nuclear Materials*, 414, 251-256.
- Yin, J.-J., J. Liu, M. Ehrenshaft, J. E. Roberts, P. P. Fu, R. P. Mason & B. Zhao (2012) Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes--generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and applied pharmacology*, 263, 81-88.
- Yin, N., Q. Liu, J. Liu, B. He, L. Cui, Z. Li, Z. Yun, G. Qu, S. Liu, Q. Zhou & G. Jiang (2013) Silver Nanoparticle Exposure Attenuates the Viability of Rat Cerebellum Granule Cells through Apoptosis Coupled to Oxidative Stress. *Small*, 9, 1831-1841.
- Yoshioka, Y., E. Kuroda, T. Hirai, Y. Tsutsumi & K. J. Ishii (2017) Allergic Responses Induced by the Immunomodulatory Effects of Nanomaterials upon Skin Exposure. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Yuan, X., Y. Tay, X. Dou, Z. Luo, D. T. Leong & J. Xie (2013) Glutathione-Protected Silver Nanoclusters as Cysteine-Selective Fluorometric and Colorimetric Probe. *Analytical Chemistry*, 85, 1913-1919.
- Zanette, C., M. Pelin, M. Crosera, G. Adami, M. Bovenzi, F. F. Larese & C. Florio (2011) Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicology in Vitro*, 25, 1053-1060.
- Zhang, L. W., W. W. Yu, V. L. Colvin & N. A. Monteiro-Riviere (2008) Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 228, 200-11.
- Zhang, X., H. Yin, Z. Li, T. Zhang & Z. Yang (2016) Nano-TiO₂ induces autophagy to protect against cell death through antioxidative mechanism in podocytes. *Cell Biology and Toxicology*, 32, 513-527.
- Zhao, B. S., G. Zhang, S. Zeng, C. He & P. R. Chen (2013a) Probing subcellular organic hydroperoxide formation via a genetically encoded ratiometric and reversible fluorescent indicator. *Integrative Biology*, 5, 1485-1489.
- Zhao, Y., J. L. C. Howe, Z. Yu, D. T. Leong, J. J. H. Chu, J. S. C. Loo & K. W. Ng (2013b) Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles Induces Autophagy in Primary Human Keratinocytes. *Small*, 9, 387-392.
- Zhou, Q., B. Kan, X. Jian, W. Zhang, H. Liu & Z. Zhang (2013) Paraquat poisoning by skin absorption: Two case reports and a literature review. *Experimental and therapeutic medicine*, 6, 1504-1506.
- Zhu, L., D. Guo, L. Sun, Z. Huang, X. Zhang, W. Ma, J. Wu, L. Xiao, Y. Zhao & N. Gu (2017) Activation of autophagy by elevated reactive oxygen species rather than released silver ions promotes cytotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in hematopoietic cells. *Nanoscale*, 9, 5489-5498.

- Zook, J. M., R. I. MacCuspie, L. E. Locascio, M. D. Halter & J. T. Elliott (2011) Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 5, 517-530.
- Zoroddu, M., S. Medici, A. Ledda, V. Nurchi, J. Lachowicz & M. Peana (2014) Toxicity of Nanoparticles. *Current medicinal chemistry*, 21.
- Zucker, R. M. & K. M. Daniel. 2012. Detection of TiO₂ Nanoparticles in Cells by Flow Cytometry. In *Nanoparticles in Biology and Medicine: Methods and Protocols*, ed. M. Soloviev, 497-509. Totowa, NJ: Humana Press.
- Zucker, R. M., K. M. Daniel, E. J. Massaro, S. J. Karafas, L. L. Degn & W. K. Boyes (2013) Detection of silver nanoparticles in cells by flow cytometry using light scatter and far-red fluorescence. *Cytometry Part A*, 83, 962-972.

Environmental Protection Agency.

<https://www.epa.gov/>

Citada en Enero de 2016

Microscopy U.

http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Info_fluorescencia.htm

citada en Marzo de 2017

The National Nanotechnology Initiative.

EPA, 2016; National Science Foundation, 2016; y National Nanotechnology, 2016

Citada en Marzo de 2017

U.S. Food and Drug Administration.

<https://www.fda.gov/>

Citada en Julio de 2018

The Royal Society.

<https://royalsociety.org/science-events-and-lectures/2016/11/evolutionary-biology/>

Citada en Julio de 2018

Law 360.

<https://www.law360.com/articles/878949/the-firms-that-dominated-in-2016>

Citada en Julio de 2018

Cámara Nacional de la Industria de Productos Cosméticos.

<http://canipec.org.mx/>

Citada en Agosto de 2019

Curtis, Biología.

<http://www.curtisbiologia.com/node/90>

Citada en Agosto de 2019

Es gibt nur zwei Ärzte - der Allmächtige und deiner eigenen Körper

<https://zoldtom.blogspot.com/2017/08/, 2017.>

Citada en Septiembre de 2019.

Secretaria de Economía.

<https://www.gob.mx/se>

<http://www.2006-2012.economia.gob.mx>

Citada en Noviembre de 2019

8. APÉNDICE

Portada de la revista *Chemical Research in Toxicology*, febrero 2020.



Participación en congresos y simposios durante el periodo de 2015-2020

- POSTER. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, March 15-19, 2020. Survival Mechanisms in Keratinocytes Exposed to Subtoxic Concentrations of Metal-Derived Nanoparticles and Their Susceptibility to Xenobiotic Exposure
- PRESENTACIÓN ORAL. XI congreso de la SOMTOX-2019. Mecanismos de sobrevivencia en queratinocitos expuestos a concentraciones “sub-tóxicas” de nanopartículas metálicas y su susceptibilidad a la exposición a xenobióticos.
- POSTER. Taller Internacional de Nano seguridad y Nanotoxicología. NANOMXCN-TOX2018 “Induction of senescence by exposure to nanoparticles of titanium dioxide, silver and cerium dioxide in a model of human keratinocytes –adequateness of test”.
- POSTER. 2do Simposio Interdisciplinario de Materiales con su Trabajo-2018. “Physicochemical Characterization of Nanoparticles and their Potential use in the Cosmetics Industry”.
- POSTER. 1er Simposio Interdisciplinario de Materiales con su Trabajo-2017. Induction of oxidative stress, proteostasis and cellular senescence by exposure to titanium dioxide, silver and gold nanoparticles in a human keratinocyte model.