



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



**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

“Evaluación de citocinas pro-inflamatorias y su participación en la expresión de las proteínas del surfactante en la línea celular de epitelio alveolar humano (A549) por la exposición a nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  u  $\text{ZnO}$ ”

Tesis que presenta:

**L.A.Q.B. José Arturo Jiménez Chávez**

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias  
En la especialidad en Toxicología

**Directora de tesis:**

Dra. Andrea M. G. De Vizcaya Ruiz

Ciudad de México, México

Agosto de 2018.

## Resumen

Los individuos ocupacionalmente expuestos son los más susceptibles a los efectos causados por los nanomateriales (NM), siendo el sistema respiratorio la principal vía de exposición y la región alveolar su primer punto de contacto. Una de las principales funciones de las células alveolares es la producción del surfactante pulmonar, el cual está constituido por lípidos y proteínas asociadas al surfactante (A, B, C, D), y entre sus funciones se destacan el mantenimiento de la homeostasis pulmonar y su participación en la respuesta inmune innata. Se ha demostrado que diferentes contaminantes como el humo del cigarro y el material particulado menor a  $2.5\ \mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>) tienen la capacidad de afectar la concentración de las proteínas del surfactante (SP). Las nanopartículas (NP) de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y óxido de zinc (ZnO) se encuentran entre las más utilizadas en los productos de consumo. Estos óxidos metálicos se caracterizan por su capacidad de absorción de luz UV y su alto índice de refracción; sin embargo, a diferencia de las de TiO<sub>2</sub>, las NP de ZnO son muy solubles en medio acuoso y a diferentes pH. Diferentes investigaciones han mostrado que estas NP generan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento de citocinas pro-inflamatorias, y citotoxicidad sobre el punto de contacto del epitelio alveolar. Con base en lo anterior, este trabajo propone identificar el papel que juegan las citocinas pro-inflamatorias inducidas por la exposición a NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO sobre los niveles de las proteínas del surfactante en un modelo celular de epitelio alveolar humano (A549). Los resultados obtenidos mediante las pruebas de yoduro de propidio y MTS posterior a la exposición a estas NP después de 12, 24 y 48 horas (25 – 200  $\mu\text{g/mL}$  de TiO<sub>2</sub> y 2.5 – 20  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO) mostraron que sólo la concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  de TiO<sub>2</sub> presenta un efecto citotóxico sobre estas células. Se cuantificó la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a diferentes tiempos (3, 12 y 24 horas); donde las NP de TiO<sub>2</sub> produjeron un aumento en la generación del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en todos los tiempos analizados, mientras que las NP de ZnO sólo produjeron un aumento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a 3 horas posterior a la exposición. De igual forma, se determinaron los niveles de citocinas a 12, 24 y 48 h; observándose un aumento de la IL-6 posterior a la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> (24 y

48 h) y a las NP de ZnO (24 h); un incremento de TNF- $\alpha$  a las 48 horas con ambas NP y el aumento de la IL-10 en el tratamiento con NP de TiO<sub>2</sub> a 24 h y con las NP de ZnO a las 48 h. Sobre los niveles de las SP, la determinación de los niveles de proteína mostró una disminución de la SP-A después de la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> (24 h) y las NP de ZnO (24 y 48 h); un aumento de SP-B tras el tratamiento con NP de TiO<sub>2</sub> a las 48h, y en las NP de ZnO a 24h; y en lo referente a la SP-D, se observó una disminución de esta por la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> (48 h) y las NP de ZnO (12, 24 y 48 h); por desgracia y debido a la dificultad para cuantificar la expresión de SP-C, esta proteína no pudo ser reportada. Finalmente, para determinar la participación de la IL-6 en la disrupción de las SP, particularmente SP-A debido a que es la más abundante, se utilizó un anticuerpo específico para la IL-6 (anti IL-6) y un inhibidor general de la respuesta inflamatoria (dexametasona), los cuales se adicionaron por separado y simultáneamente a las células expuestas a NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO. Se observó que, tanto el anti IL-6 como la dexametasona inhibieron la liberación de la IL-6 por la exposición a las NP y por tanto los niveles de SP-A no mostraron cambios. A pesar de que estas proteínas forman menos del 10% del total del surfactante, sus funciones contribuyen importantemente al funcionamiento del sistema respiratorio. Aunque las concentraciones de exposición de las NP de TiO<sub>2</sub> o ZnO no sean citotóxicas y que los efectos de ambas NP fueron similares, destaca el hecho de que las NP de ZnO no produjeron un aumento de las ROS; así como que la inducción de los efectos sobre las citocinas y las SP fueron observados desde tiempos más cortos. Lo anterior puede ser atribuido a su capacidad de liberar iones Zn<sup>+2</sup> en el medio, los cuales contribuyen a la rápida inducción de estos efectos; a diferencia de las NP de TiO<sub>2</sub>, las cuales son muy estables en los diferentes medios analizados y por tanto sus efectos sólo son observados hasta después de entrar en contacto con las células. Las modificaciones observadas sobre las proteínas del surfactante a largo plazo pudieran llevar a la pérdida de elasticidad del tejido y a una mayor susceptibilidad a enfermedades, consecuencia letárgica a NM por vía inhalatoria. La inhibición de la respuesta inflamatoria producida por estas NP podría ser una alternativa para evitar la disrupción producida sobre las SP y de esta forma evitar daños futuros.

## **Abstract**

Occupationally exposed individuals are the most susceptible people to the effects caused by the nanomaterials (NM), where the respiratory system is the main route of exposure and the alveolar region their first point of contact. One of the main functions of the alveolar region is the production of pulmonary surfactant, which is constituted by lipids and associated proteins (A, B, C, D); among its functions are the maintenance of the pulmonary homeostasis and their participation in the innate immune response. It has been shown that different pollutants like cigarette smoke and particulate matter 2.5 (PM<sub>2.5</sub>) have the capacity to affect the concentration of the surfactant proteins (SP). The titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles (NP) are the most commonly used NM in consumer products. These NP are characterized by their capability to absorb UV light and its high refractive index; however, unlike TiO<sub>2</sub> NP, ZnO NP are very soluble in aqueous medium at different pH. Different research studies have shown the generation of reactive oxygen species (ROS), increase of pro-inflammatory cytokines and cytotoxicity by the exposure to the NP on the alveolar epithelium. Based on the above, this work proposed to identify the role played by pro-inflammatory cytokines produced after exposure to TiO<sub>2</sub> or ZnO NP on the levels of the surfactant proteins in a cellular model of human alveolar epithelia (A549). The results obtained by the propidium iodide and MTS assays after the exposure to the NP for 12, 24 and 48 h (25 – 200 µg/mL from TiO<sub>2</sub> and 2.5 – 20 µg/mL from ZnO) showed that only the concentration of 200 µg/mL of TiO<sub>2</sub> is capable to produce a cytotoxic effect on these cells. The ROS generations was determined at different times (3, 12 and 24 h); where the TiO<sub>2</sub> NP produced an increase at all times tested of both analyzed oxygenated species (O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); while the ZnO NP only produced an increase of O<sub>2</sub><sup>-</sup> after 3 h of exposure. In the same way, the pro-inflammatory cytokines levels were determined at 12, 24 and 48 h; noting an increase of the IL-6 after TiO<sub>2</sub> NP (24 and 48 h) and ZnO NP (24 h) exposure; an increase of TNF-α after 48 h of exposure of TiO<sub>2</sub> NP or ZnO NP and the increase of IL-10 after treatment whit TiO<sub>2</sub> NP (24 h) and ZnO NP (48 h). In relation to the SP levels, the results showed the decrease of SP-A after the exposure of TiO<sub>2</sub> NP (24 h) and ZnO NP (24 and 48 h); an increase of SP-B after 48 h of TiO<sub>2</sub> NP exposure, and 24 h of ZnO exposure; and with reference to SP-D a decrease was observed after the TiO<sub>2</sub> NP

exposure (48 h) and ZnO NP exposure (24 h); unfortunately and because of the difficulty to quantify the expression of SP-C, this protein could not be reported. Finally, to determine the participation of IL-6 in the SP-A stability, a specific antibody for IL-6 (anti IL-6) and a general inhibitor of the inflammatory response (dexamethasone) were used, which were added separately to the TiO<sub>2</sub> or ZnO NP exposure; subsequent to this exposure, both (the antibody and the dexamethasone) they were able to inhibit the effect and production of the IL-6 after NP exposure, and the SP-A levels were not modified. Despite that proteins form less of the 10% of surfactant film, their functions contribute in an important manner to the function of the respiratory system. Although the concentrations of TiO<sub>2</sub> or ZnO NP were not cytotoxic and the effects of both NP were similar, should be noted the fact that ZnO NP did not induce the ROS generation; in the same way, the effects on the cytokine induction and the SP were observed from shorter times. All these could be attributed to the solubility of the ZnO NP and the release of Zn<sup>+2</sup> ions in the medium, which contribute to the quick induction of all the ZnO NP effects, unlike the TiO<sub>2</sub> NP, which are very stable in the different analyzed media, and therefore these effects are only observed until the moment cells are in contact with the NP. The observed modifications on the surfactant proteins to long term exposures could lead to loss of tissue elasticity and an increased susceptibility to diseases in consequence to inhaled NM exposure. The inhibition of the inflammatory response produced by the NP could be an alternative to avoid the disruption of surfactant proteins, and in this way, prevent future damage.

## Dedicatoria

**A Dios, a mis padres y a mis hermanos  
por estar incluso en los momentos más oscuros.**

La felicidad puede ser encontrada,  
incluso en los momentos más oscuros...

Sólo si uno recuerda encender la luz  
(Rowling, 1999).

## **Agradecimientos.**

A Dios, por ser siempre mi fortaleza, mi guía y mi refugio; porque no importa que tan lejos quiera estar yo de tí, tú siempre estas a mi lado. Gracias por darme el camino y los medios para cumplir esta nueva etapa en mi vida.

A la Dra. Andrea de Vizcaya, gracias por haber puesto su confianza en mi para realizar este proyecto, pero sobre todo muchas gracias por permitirme ser parte de un gran equipo de trabajo. Por todas sus enseñanzas, por los buenos momentos, por todas las oportunidades y metas que ha significado el poder formar parte del Laboratorio 26.

A mis asesores de tesis, Dr. Arnulfo Albores y Dra. Patricia Segura, por todos sus correcciones, comentarios y sugerencias, que han hecho de esta tesis un trabajo más completo y con mejores resultados.

A mi familia, mis hermanos, mi mamá, mi abue y mis tías. Por buscar comprender todas mis locuras y apoyarme en todos mis proyectos y nuevas metas. Porque a pesar de la distancia y de no estar todo el tiempo juntos, siempre me reciben con los brazos abiertos y tienen las palabras y las acciones precisas para hacerme sentir bien en todo momento.

A la Bióloga Marisela Uribe, por todo su apoyo incondicional en todas las técnicas de laboratorio, por estar siempre al pendiente de mi, mis experimentos y de mi vida. Por siempre tener un consejo o una sugerencia para mejorar día con día en el laboratorio y en la vida.

Al Dr. Gamaliel Aztatzi, por apoyarme desde el inicio de este proyecto, por ser mi guía y enseñarme sólo un poco de todo su conocimiento, pero sobre todo por su gran ejemplo de humildad y de compañerismo.

Al Dr. Vicente Escamilla, por su apoyo en la realización en las técnicas del laboratorio, por sus consejos acerca de mi trabajo y por su gran dedicación y entrega hacia sus compañeros.

A todos mis compañeros y amigos de la maestría, Nadia, Jonathan, Sandy, Cecy, Jose, Manolo, Jaz, Esme, Lau, Ross, David, Janisse; gracias por haber estado conmigo en algún momento de estos dos años, por sus enseñanzas, pero sobre todo por los buenos momentos juntos y por tantos buenos recuerdos.

A todos mis compañeros del laboratorio 26, Jose, Russell, Vero, Gerardo, Aidee. Por los momentos vividos juntos, su apoyo en el laboratorio y todos sus consejos de vida.

Al colegio de profesores del Departamento de Toxicología por todas sus enseñanzas a lo largo de mi estancia en la maestría, pero sobre todo por ser un gran ejemplo a seguir dentro de la investigación.

Al Cinvestav-IPN por permitirme seguir desarrollando mis habilidades y mis conocimientos, por el acceso a la educación y al logro de esta maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante la realización de mi maestría y mi estancia en el extranjero.

Al Dr. Flemming R. Cassee, y a todo su equipo de trabajo (Daan, Jhon, Paul, Eric, Ruiwen) por permitirme realizar mi estancia en su laboratorio en los Países Bajos, y por su apoyo incondicional que hizo de mi estancia uno de los mejores momentos de la maestría.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>X</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de acrónimos y abreviaturas</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Nanotecnología: usos y aplicaciones</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 NP de óxidos metálicos</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 El sistema respiratorio</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4 El surfactante pulmonar</b> .....	<b>7</b>
1.4.1 Composición y funciones del surfactante pulmonar. ....	7
1.4.2 Síntesis, secreción y recaptura del surfactante pulmonar.....	10
1.4.3 Regulación de la expresión del surfactante pulmonar.....	12
<b>1.5 La respuesta inflamatoria</b> .....	<b>13</b>
<b>1.6 Relación entre la respuesta inflamatoria y las NP en el sistema respiratorio</b> .....	<b>14</b>
<b>1.7 La toxicidad de las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO sobre el sistema respiratorio</b> .....	<b>16</b>
1.7.1 Efecto de la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	16
1.7.2 Efecto de la exposición a NP de ZnO .....	17
<b>1.8 Justificación</b> .....	<b>19</b>
<b>1.9 Hipótesis</b> .....	<b>19</b>
<b>1.10 Objetivos</b> .....	<b>20</b>
1.10.1 Objetivo general.....	20
1.10.2 Objetivos particulares .....	20
<b>2. Métodos</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Diseño experimental</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2 Preparación de las suspensiones de NP</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3 Microscopía electrónica de transmisión y espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (TEM-EDS)</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4 Diámetro hidrodinámico y potencial zeta</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5 Exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO</b> .....	<b>23</b>

2.6 Ensayo de viabilidad por la cuantificación del metabolismo de MTS.....	23
2.7 Ensayo de viabilidad celular por determinación de yoduro de propidio (PI) .....	24
2.8 Determinación de la generación intracelular de ROS. ....	25
2.9 Cuantificación de citocinas.....	25
2.10 Cuantificación de los niveles de SP por Western blot .....	26
2.11 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	27
2.12 Inhibición de las citocinas pro-inflamatorias .....	28
2.13 Análisis estadístico .....	28
<b>3. Resultados .....</b>	<b>30</b>
3.1 Caracterización de las NP de TiO <sub>2</sub> y ZnO .....	30
3.1.1 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión .....	30
3.1.2 Caracterización de diámetro hidrodinámico y potencial zeta .....	31
3.2 Exposición <i>in vitro</i> a las células A549 con las NP de TiO <sub>2</sub> y ZnO.....	34
3.2.1 Determinación de la viabilidad celular.....	34
3.2.2 Determinación de la generación intracelular de ROS. ....	40
3.2.3 Cuantificación de citocinas. ....	46
3.2.4 Determinación de la concentración de las proteínas del surfactante (SP) .	58
3.2.5 Inhibición de la citocina pro-inflamatoria IL-6. ....	65
<b>4. Discusión.....</b>	<b>67</b>
4.1 Caracterización de las NP de TiO <sub>2</sub> y ZnO.....	67
4.2 Exposición <i>in vitro</i> a las células A549 con las NP de TiO <sub>2</sub> y ZnO.....	71
4.2.1 Determinación de la viabilidad celular.....	71
4.2.2 Determinación de la generación intracelular de ROS .....	72
4.2.3 Cuantificación de citocinas. ....	74
4.2.4 Determinación de la concentración de las proteínas del surfactante (SP) .	76
4.2.5 Influencia de las características de las NP de TiO <sub>2</sub> u ZnO en la disrupción de las SP. ....	81
4.2.6 Inhibición de la citocina pro-inflamatoria IL-6. ....	83
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>85</b>
<b>6. Perspectivas .....</b>	<b>86</b>
<b>7. Referencias .....</b>	<b>87</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estabilidad de las NP de óxidos metálicos .....	3
<b>Figura 2.</b> La disociación de las NP de ZnO es inversa a su tamaño .....	4
<b>Figura 3.</b> Depósito de las NP en el tracto respiratorio.....	6
<b>Figura 4.</b> Composición porcentual del surfactante pulmonar.....	8
<b>Figura 5.</b> Síntesis, formación y secreción del surfactante.....	12
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de acción general propuesto por la exposición a NP .....	15
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental de la caracterización de las NP .....	21
<b>Figura 8.</b> Diseño experimental de la exposición .....	21
<b>Figura 9.</b> Estructura de las NP de TiO <sub>2</sub> mediante TEM-EDS .....	30
<b>Figura 10.</b> Estructura de las NP de ZnO mediante TEM-EDS .....	31
<b>Figura 11.</b> Determinación de viabilidad celular por el ensayo MTS posterior a la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	35
<b>Figura 12.</b> Determinación de la viabilidad celular por el ensayo MTS posterior a la exposición a NP de ZnO .....	36
<b>Figura 13.</b> Determinación de la viabilidad celular por el ensayo de PI posterior a la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	38
<b>Figura 14.</b> Determinación de la viabilidad celular por el ensayo de PI posterior a la exposición a NP de ZnO .....	39
<b>Figura 15.</b> Determinación de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por el ensayo MitoSox Red después de la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	41
<b>Figura 16.</b> Determinación de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por el ensayo MitoSox Red después de la exposición a NP de ZnO.....	42
<b>Figura 17.</b> Determinación de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> después de la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	44
<b>Figura 18.</b> Determinación de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> posterior a la exposición a NP de ZnO .....	45
<b>Figura 19.</b> Cuantificación de la IL-1 $\beta$ después de la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	47
<b>Figura 20.</b> Cuantificación de la IL-1 $\beta$ después de la exposición a NP de ZnO .....	47
<b>Figura 21.</b> Cuantificación de la IL-4 posterior a la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	48
<b>Figura 22.</b> Cuantificación de la IL-4 posterior a la exposición a NP de ZnO .....	49

<b>Figura 23.</b> Cuantificación de la IL-6 posterior a la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	50
<b>Figura 24.</b> Cuantificación de la IL-6 posterior a la exposición a NP de ZnO.....	51
<b>Figura 25.</b> Cuantificación de la IL-8 posterior a la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	52
<b>Figura 26.</b> Cuantificación de la IL-8 posterior a la exposición a NP de ZnO.....	53
<b>Figura 27.</b> Cuantificación de la IL-10 posterior a la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	54
<b>Figura 28.</b> Cuantificación de la IL-10 posterior a la exposición a NP de ZnO.....	55
<b>Figura 29.</b> Cuantificación de la TNF- $\alpha$ posterior a la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	56
<b>Figura 30.</b> Cuantificación de la TNF- $\alpha$ posterior a la exposición a NP de ZnO.....	57
<b>Figura 31.</b> Concentración de SP-A posterior a la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	59
<b>Figura 32.</b> Concentración de SP-A posterior a la exposición a NP de ZnO.....	60
<b>Figura 33.</b> Concentración de SP-B tras la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	61
<b>Figura 34.</b> Concentración de SP-B posterior a la exposición a NP de ZnO.....	62
<b>Figura 35.</b> Concentración de SP-D después de la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> .....	63
<b>Figura 36.</b> Concentración de SP-D después de la exposición a NP de ZnO.....	64
<b>Figura 37.</b> Concentración de SP-A posterior a la inhibición de IL-6.....	65
<b>Figura 38.</b> Concentración de SP-A posterior a la inhibición de IL-6.....	66

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Propiedades físicas de las diferentes estructuras del TiO <sub>2</sub> .....	2
<b>Tabla 2.</b> Propiedades físicas de las diferentes estructuras del ZnO.....	4
<b>Tabla 3.</b> Funciones del surfactante pulmonar.....	10
<b>Tabla 4.</b> Efecto de la exposición a NP de TiO <sub>2</sub> sobre modelos in vitro.....	17
<b>Tabla 5.</b> Efecto de las NPs de ZnO sobre modelos in vitro.....	18
<b>Tabla 6.</b> Determinación del tiempo de sonicado de cada tipo de NP.....	33
<b>Tabla 7.</b> Características físicoquímicas de las NP en medio de cultivo.....	33

## Lista de acrónimos y abreviaturas.

NM	Nanomateriales	PI	Yoduro de propidio
NP	Nanopartículas	°C	Grados celcius
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titanio	rpm	Revoluciones por minuto
ZnO	Óxido de Zinc	Ab	Anticuerpo
SP	Proteínas del surfactante	PM	Peso molecular
SP-A	Proteína del surfactante A	PDI	Índice de polidispersión
SP-B	Proteína del surfactante B	DE	Desviación estándar
SP-C	Proteína del surfactante C	EE	Error estándar
PC	Fosfatidilcolinas	ANOVA	Análisis de varianza
CL	Cuerpos lamelares	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
CMV	Cuerpos multi-vesciculaes	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Óxido de hierro (II,III)
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido de Ítrio (III)
IL	Interleucinas	IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
Th <sub>2</sub>	Células T cooperadoras tipo II	PBS	Solución de buffer de fosfatos
ARNm	Ácido ribonucléico mensajero	Zn <sup>+2</sup>	Iones zinc
TNF	Factor de necrosis tumoral	kDa	Kilodaltones
H <sub>2</sub> O-dd	Agua doble desionizada	h	horas
SFB	Suero fetal bovino	min	Minutos
TEM-EDS	Microscopía electrónica de transmisión y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X	MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
DLS	Dispersión dinamica de la luz	nm	Nanómetros
LDV	Voltimetría por laser tipo Doppler	ADN	Ácido desóxiribonucléico
DCFH DA	Diclorodihidrofluoresceina diacetato		

## **1. Introducción**

### **1.1 Nanotecnología: usos y aplicaciones**

La nanotecnología es una ciencia aplicada que permite el desarrollo y el uso de materiales, estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones específicas derivadas de su tamaño en escala nanométrica (Reineke, 2012). Dentro del grupo de materiales y estructuras en escala nanométrica encontramos a los nanomateriales (NM), los cuales han sido definidos como materiales naturales, incidentales o fabricados que contienen partículas, en un estado no enlazado, o como un aglomerado o agregado; dónde al menos el 50% o más de las partículas presentan una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaño de 1 a 100 nm (Shi et al., 2013). Entre los NM fabricados destacan las nanopartículas (NP), que son todos aquellos materiales que presentan una de sus dimensiones entre los 1 a 100 nm como característica y propiedades diferentes a las de los elementos químicos en su estado molecular con la misma composición (Auffan et al., 2009).

Las NP comercialmente disponibles se utilizan en productos de cuidado personal (protectores solares, pastas de dientes, cremas, productos para el cabello, maquillaje), artículos deportivos, partes de aviones y automóviles, aplicaciones biomédicas, de diagnóstico, sistemas de liberación de fármacos y componentes eléctricos y computacionales. En marzo de 2015, el inventario de productos de consumo nanotecnológico reportó la existencia de 1814 productos que contienen NM, siendo el área de salud y cuidado personal la que presenta mayor aplicación de los NM (Vance et al., 2015). Se estima que para 2020 el valor total de los productos provenientes de la nanotecnología podría tener un crecimiento de hasta 3 trillones de dólares (Geiker y Andersen, 2009).

### **1.2 NP de óxidos metálicos**

Las NP de óxidos metálicos son ampliamente utilizadas en los productos de consumo personal, aplicaciones industriales y como semiconductores. Entre las NP más

utilizadas en los productos de consumo se incluyen a las partículas sintetizadas a base de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y óxido de zinc (ZnO) (Ivask et al., 2015).

El TiO<sub>2</sub> es un óxido mineral natural que existe en tres diferentes formas: anatasa, rutilo y bruquita; siendo el rutilo es la estructura más estable termodinámicamente a todas las temperaturas y presiones normales (Varner, 2010), y la bruquita aquella que presenta la mayor actividad catalítica, sin embargo, su obtención es altamente compleja (Zhang et al., 2015). La anatasa ha sido reportada como la forma más reactiva químicamente, aunque existe evidencia que demuestra que la P25, una mezcla de 80% de la estructura de anatasa con un 20% de rutilo puede presentar una mayor actividad fotocatalítica (Davis, Wang, & Shtakin, 2010). A continuación, se destacan algunas de las características físicas del TiO<sub>2</sub> en sus diferentes estructuras (Tabla 1).

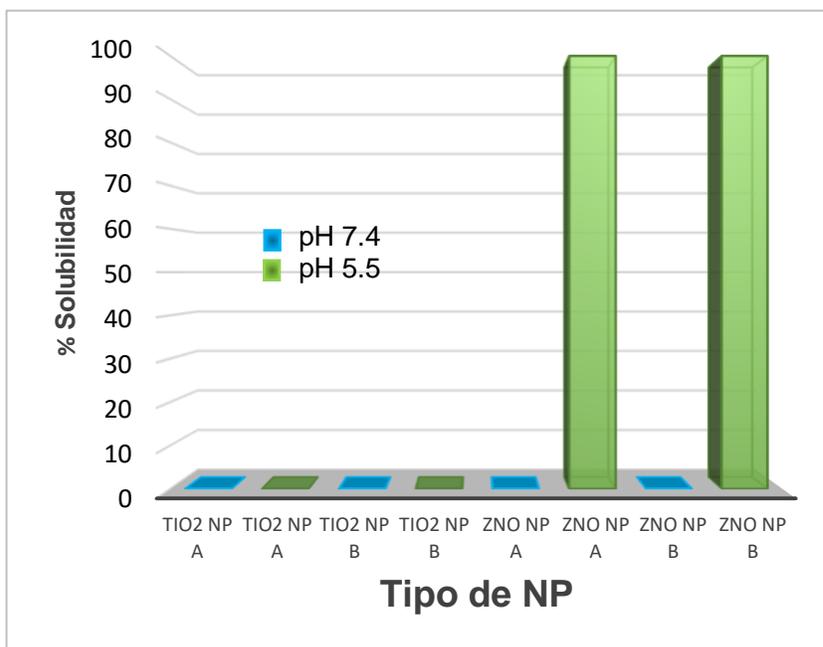
**Tabla 1. Propiedades físicas de las diferentes estructuras del TiO<sub>2</sub>**

Propiedad Estructura	PM (g/mol)	Forma	$\rho$ (g/ml)	IR	PF (° C)	BP (eV)
Rutilo	79.866	Tetraédrica	4.24	2.75	1825	3.0
Anatasa		Tetraédrica	3.83	2.54	1850	3.21
Bruquita		Romboédrica	4.17	2.58	1825	3.13

PM: peso molecular;  $\rho$ : densidad; IR: índice de refracción; PF: punto de fusión; BP: banda prohibida. (Información obtenida de: Kathae & Mansoori, 2012; Varner, 2010)

Además de las características anteriores es importante destacar su estabilidad en medios acuosos, dada su poca solubilidad a diferentes pH (Figura 1). Gracias a su alto índice de refracción y su brillo, el TiO<sub>2</sub> ha sido usado como un pigmento. Como NP, el TiO<sub>2</sub> ha sido ampliamente utilizado en la cosmética, la bioremedicación, preservación de alimentos, fármacos y pinturas (Wang et al., 2015); este material se encuentra entre los 5 NM más usados a nivel mundial (Shi et al., 2013). En 2016 la obtención de TiO<sub>2</sub> superó los 7.5 millones de toneladas, siendo Australia, Sudáfrica, Canadá y Ucrania sus principales productores. La mayor parte de este material es obtenido por la

minería, y sólo un bajo porcentaje es sintetizado por diferentes medios (Bedinger, 2017).



**Figura 1. Estabilidad de las NP de óxidos metálicos.** La estabilidad de las NP de  $\text{TiO}_2$  en medio acuoso puede mantenerse a pesar de las variaciones de pH y del tipo de NP utilizada (modificado de Donaldson et al., 2013).

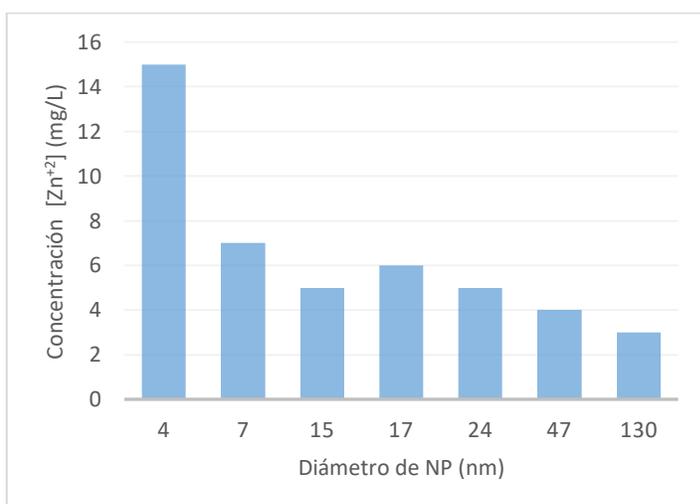
Por otro lado, el ZnO presenta tres tipos de estructuras, la wurzita, la blenda y sal de roca (Coleman y Jagadish, 2006). La wurzita, que se presenta en condiciones ambientales, es la forma con mayor estabilidad termodinámica (Vaseem et al., 2010); la blenda que es meta estable, se encuentra en bajas proporciones y tiende a tomar la forma de wurzita; y la estructura de sal de roca sólo es estable a altas presiones y se observa en raras ocasiones (Coleman y Jagadish, 2006). Algunas de las características físicas de las diferentes formas del ZnO se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Propiedades físicas de las diferentes estructuras del ZnO.**

Propiedad Forma	PM (g/mol)	Forma	$\rho$ (g/ml)	IR	PF (° C)	BP (eV)
Wurzita	81.38	Hexagonal	5.606	2.4	1975	3.4
Blenda		Cúbica	5.675	-	1975	3.17
Sal de roca		Cúbica	-	-	-	2.7

PM: peso molecular;  $\rho$ : densidad; IR: índice de refracción; PF: punto de fusión; BP: banda prohibida. (Información obtenida de: Coleman y Jagadish, 2006; Sans et al., 2005; Lee et al., 2002).

El ZnO es un polvo blanco ampliamente utilizado en cosméticos, pinturas y recubrimientos, productos farmacéuticos, dispositivos electrónicos y catalizadores (Morimoto et al., 2016). La obtención de este material sólo puede darse por su síntesis, diferentes métodos han sido desarrollados para la obtención de este óxido metálico, y estos varían dependiendo de las propiedades deseadas del material, su estructura, así como el costo de su síntesis (Moezzi et al., 2012). Estas NP se encuentran entre las más tóxicas debido a su capacidad de liberar iones; las NP de ZnO presentan una elevada solubilidad en medios ácidos y moderada en medios neutros (Figura 1); esta solubilidad ha mostrado ser inversamente proporcional a su tamaño, es decir, las partículas más pequeñas poseen una mayor solubilidad (Figura 2) (Liu et al., 2016).



**Figura 2. La disociación de las NP de ZnO es inversa a su tamaño.** Las NP que presentan un menor diámetro son más solubles en medio acuoso que aquellas de mayor diámetro (modificado de Liu et al., 2016).

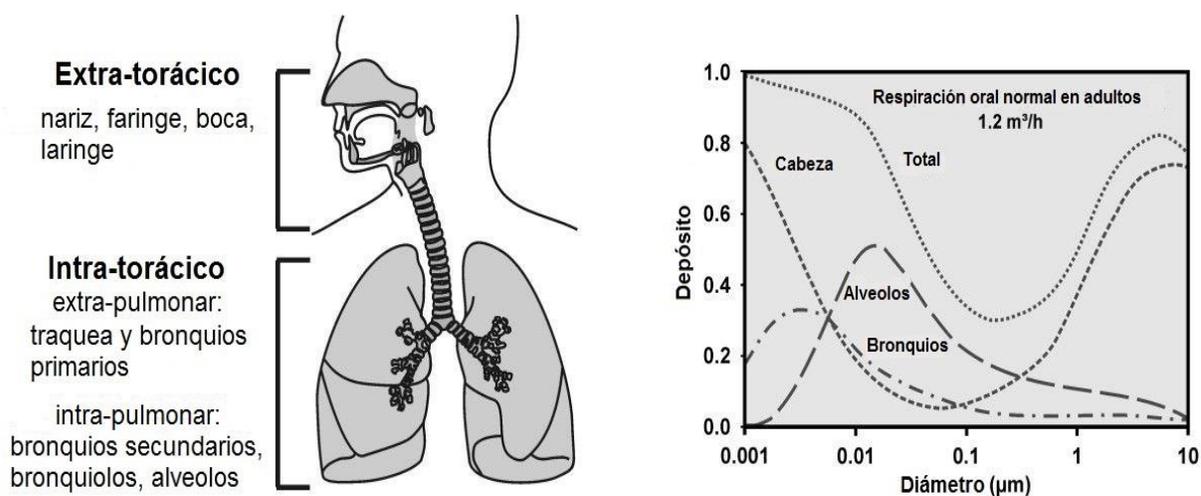
Las características antes mencionadas, cómo su índice de refracción, su capacidad cómo materiales semiconductores y su actividad catalítica han llevado a un aumento en el uso de las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO; este hecho ha incrementado por tanto su demanda y la exposición del hombre con estas NP. La exposición a los NM en la actualidad puede presentarse en su manufactura, su uso o su desecho. Se considera al personal ocupacionalmente expuesto como aquel que se encuentra en mayor contacto con los NM y por tanto el más susceptible a estos, siendo la vía inhalatoria como la principal entrada de las NP al organismo (Shi et al., 2013). Este tipo de NM presenta una gran eficiencia de depósito en el sistema respiratorio y pueden penetrar profundamente en el intersticio pulmonar y los espacios vasculares (Hussain et al., 2009).

### **1.3 El sistema respiratorio**

El sistema respiratorio comienza en la nariz, que provee del sentido del olfato, y se encarga de filtrar y calentar el aire inhalado. Este aire es transportado hacia la faringe que es el pasaje intermedio entre la nariz y la boca para llegar a la laringe, la cual se comunica con la parte superior de la tráquea. En la tráquea, el aire es limpiado y humedecido antes de entrar a los pulmones, donde este aire viaja a los tejidos más profundos hasta la región donde se da el intercambio de gases (Rogers, 2011).

El pulmón es un órgano particularmente vulnerable ubicado en la interface entre el interior del organismo y el ambiente, el pulmón está optimizado para el intercambio de gases, teniendo un muy delgado y delicado epitelio, abundante flujo sanguíneo, y una amplia área de superficie. Inherente en esta estructura se encuentra una enorme carga inmunológica de patógenos, alérgenos, y contaminantes (NP y material particulado) que están presentes en los 11,000 litros de aire inhalados diariamente (Wright, 2003). El pulmón está dividido en dos secciones, las vías aéreas (transportan el aire dentro y fuera de los pulmones) y los alveolos (el lugar donde se lleva a cabo el intercambio de gases). Las vías aéreas son una barrera específica que no permite que las partículas penetren a través de ella, un epitelio activo lo protege con una capa viscosa de moco; mientras que la barrera entre la pared alveolar y los capilares es muy delgada y relativamente vulnerable en las áreas de intercambio de gases (Lu et al., 2014).

Los alveolos son las unidades respiratorias terminales que se encuentran en el pulmón con un diámetro aproximado de 200  $\mu\text{m}$  en los humanos. Los neumocitos tipo I, neumocitos tipo II y los fibroblastos son los principales tipos celulares alveolares. Las células alveolares tipo I son grandes células columnares responsables del intercambio gaseoso y cubren cerca del 95% de la superficie alveolar. Los neumocitos tipo II cubren el otro 5% del área de superficie de los alveolos, actúan como precursores de las células alveolares tipo I, y secretan el surfactante alveolar. Los fibroblastos son el principal grupo involucrado en la síntesis de la matriz extracelular, los mecanismos de reparación y contribuyen al mantenimiento de la funcionalidad de los neumocitos tipo II (Nandkumar et al., 2015). Al ser inhaladas, las NP pueden ser transportadas y depositadas a lo largo del tracto respiratorio, desde las vías aéreas superiores hasta los alveolos por medio de difusión. Estas pueden depositarse en las regiones extra e intra-torácicas (nariz, faringe, laringe, tráquea, bronquios, alveolos), presentándose en mayor concentración en la región alveolar. La Figura 3 muestra las regiones de depósito de las diferentes partículas con base en sus tamaños (Geiser y Kreyling, 2010).



**Figura 3. Depósito de las NP en el tracto respiratorio.** El tracto respiratorio y el depósito de las partículas en un hombre adulto sano dado por respiración orofaríngea en reposo en función del tamaño de partícula (modificado de Geiser y Kreyling, 2010).

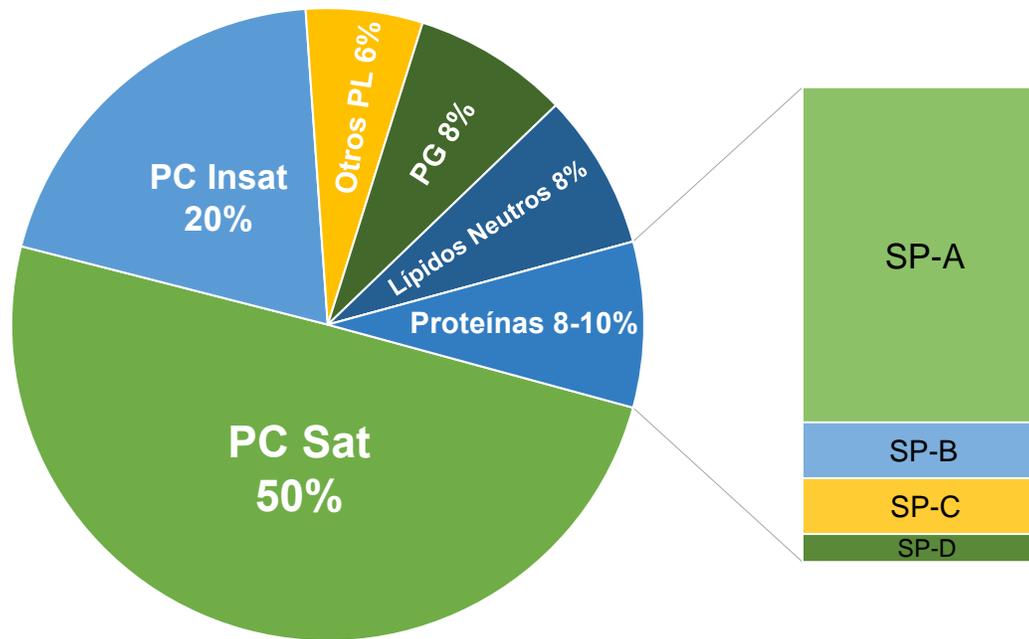
Una vez depositadas las NP, estas entran en contacto con el surfactante pulmonar, que se localiza entre la fase aérea y la fase acuosa de los alveolos. Al interactuar con el surfactante, las NP se recubren de este y posteriormente pueden atravesar a la fase acuosa e interactuar con las células epiteliales; esto dado por la capacidad de las NP de evadir los dos mecanismos de depuración más importantes que existen, el aclaramiento mucociliar, y la captación por parte de los macrófagos, lo que incrementa el tiempo de retención de las NP en los alveolos y por tanto la existencia de una mayor interacción con las células epiteliales (Griese, 1999).

#### **1.4 El surfactante pulmonar**

El pulmón en la región alveolar está recubierto por una capa delgada de una sustancia formada por distintos componentes que protegen y participan en la homeostasis de este órgano. Dicha sustancia es denominada surfactante pulmonar el cual es una sustancia tensoactiva compuesto de lípidos y proteínas los cuales se encuentran en el fluido localizado en la interface aérea y celular (Griese, 1999). Como se mencionó anteriormente, el surfactante es sintetizado y secretado por las células epiteliales tipo II o neumocitos tipo II en el alveolo y las células de la clara en la tráquea y bronquios (Wright, 2003).

##### **1.4.1 Composición y funciones del surfactante pulmonar.**

Con respecto a la composición bioquímica del surfactante, la mayor parte está formada por lípidos (90%), del cual el 80-90% son fosfolípidos, mientras que el otro 10% está compuesto por colesterol y otros lípidos neutros (Batenburg y Haagsman, 1998). El 10% restante del total del surfactante está conformado por las proteínas asociadas al surfactante A, B, C y D (Figura 4), de las cuales SP-A forma alrededor del 8%, SP-B y SP-C un 1% cada una y SP-D el 0.5% (Kingma y Jobe, 2012).



**Figura 4. Composición porcentual del surfactante pulmonar.** Las fosfatidilcolinas (PC) representan la mayor proporción del surfactante. Las proteínas del surfactante (SP) contribuyen cerca de un 10% del peso total (Modificado Kingma y Jobe, 2012).

La proteína del surfactante A (SP-A) es la más abundante de estas proteínas, su forma monomérica es de aproximadamente 32 kDa, y es una glicoproteína con cuatro dominios estructurales distintos (un dominio amino terminal corto, un dominio de colágeno, una región de unión y un dominio de reconocimiento de carbohidratos dependiente de calcio); la forma procesada y secretada de SP-A consiste de 18 monómeros unidos por puentes bisulfuro y uniones no covalentes en forma de un ramo de tulipanes (Griese, 1999). Entre sus funciones se encuentran: producir la agregación de vesículas de fosfolípidos jugando un papel importante en la formación de mielina tubular, participar en la homeostasis del surfactante (por inhibir su secreción y aumentar su ingesta por los neumocitos tipo II), reducir los efectos inhibitorios sobre la actividad de superficie de las proteínas no pertenecientes al surfactante (Griese, 1999), regular las respuestas relacionadas con la inflamación al controlar la producción de citocinas pro-inflamatorias, acelerar el aclaramiento de los patógenos, y opsonizar y aumentar la ingesta de patógenos por los fagocitos.

La proteína del surfactante D (SP-D) contiene un dominio de colágeno unido directamente al dominio de reconocimiento de carbohidratos dependientes de calcio; en su forma nativa está compuesta por 12 monómeros, los cuales a su vez se unen en cuatro trímeros, para dar lugar a una estructura con forma de cruz. Esta proteína puede unirse a los lipopolisacáridos bacterianos y a la superficie celular, formando grandes redes de células y bacterias, además cuenta con sitios de unión específicos a macrófagos, puede inducir el estallido respiratorio y estimular su capacidad fagocítica. Tanto SP-A como SP-D son proteínas hidrofílicas (Griese, 1999).

La proteína del surfactante B (SP-B) es una molécula hidrofóbica de aproximadamente 8 kDa cargada positivamente, que se encuentra generalmente en forma de un dímero unido por puentes bisulfuro. Esta proteína está relacionada con la formación de la capa de surfactante y la transformación de los cuerpos lamelares en mielina tubular (Mitsuhashi et al., 2013).

Finalmente, la proteína del surfactante C (SP-C) es una proteína muy hidrofóbica, formada por dos grupos palmitoilo unidos mediante enlaces covalentes, y presenta un peso aproximado de 4 kDa. La SP-C se encarga de mantener la actividad biofísica de superficie de los lípidos durante la compresión y expansión al respirar, aumentar la resistencia del surfactante a la inhibición por las proteínas del suero o por el fluido del edema e incrementar la ingesta de fosfolípidos por los neumocitos tipo II (Griese, 1999). En la práctica, el peso molecular tan pequeño de esta proteína ha llevado a su difícil detección dentro de los modelos biológicos.

En general, el surfactante pulmonar en conjunto se encarga de regular las funciones biofísicas y algunas funciones inmunológicas dentro de los alveolos. En la Tabla 3 se muestra de manera específica las funciones del surfactante pulmonar.

**Tabla 3. Funciones del surfactante pulmonar.**

**Funciones biofísicas del surfactante pulmonar**

Prevenir el colapso de los alveolos y de los pulmones durante la expiración.

Manutención de la apertura inspiratoria de los pulmones.

Previene la formación del edema pulmonar equilibrando las fuerzas de filtración hidrostática.

Estabiliza y mantiene la permeabilidad de las vías aéreas pequeñas.

Mejora el transporte mucociliar.

Transloca las partículas  $< 6\mu\text{m}$  en la hipofase del fluido de revestimiento epitelial.

Facilita la remoción de partículas y desechos celulares de los alveolos a las vías respiratorias altas por disminución de la tensión superficial durante la expiración final.

**Funciones inmunológicas**

Supresión de la proliferación, producción de inmunoglobulinas y citotoxicidad de los linfocitos (fosfolípidos).

Inhibición de la liberación de las citocinas (TNF, IL-1, IL-6) inducidas por la endotoxina liberadas por los macrófagos (fosfolípidos).

Modulación de la fagocitosis, quimiotaxis y el estallido respiratorio de los macrófagos (SP-A, SP-D).

Neutralización de los mediadores endógenos como radicales y especies reactivas de oxígeno.

Opsonizar microorganismos y facilitar su fagocitosis (SP-A, SP-D).

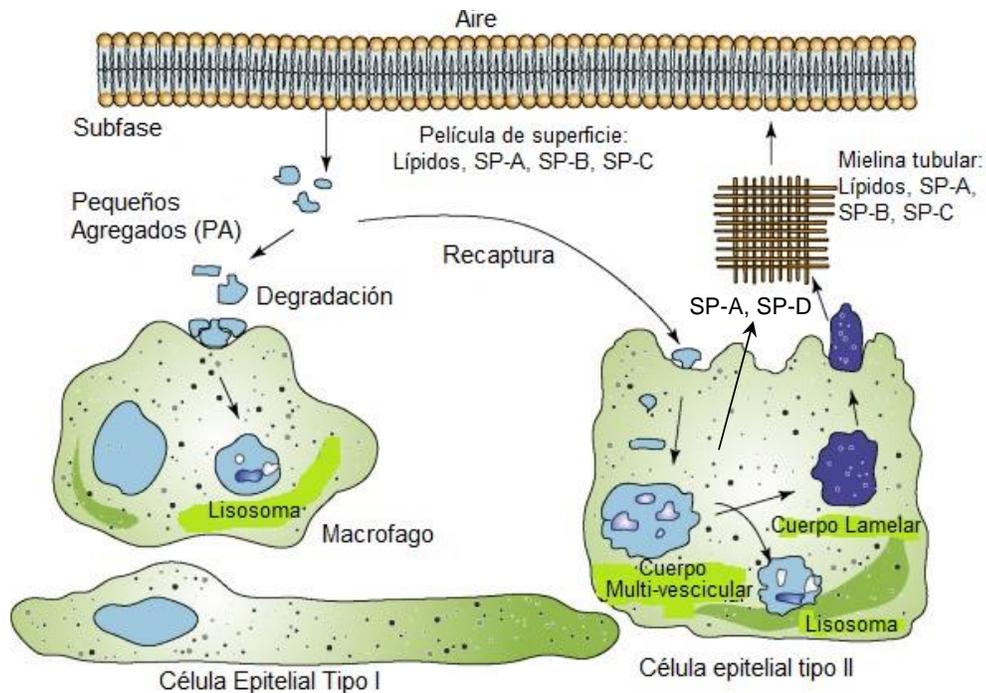
Unión y captura de toxinas bacterianas (SP-A, SP-D).

(modificado de Griese, 1999).

**1.4.2 Síntesis, secreción y recaptura del surfactante pulmonar.**

La síntesis del surfactante se lleva a cabo dentro de las células epiteliales tipo II en los alveolos. En estas, los lípidos y proteínas que lo componen son sintetizados y ensamblados para formar complejos que se encuentran empaquetados en membranas

conocidos como cuerpos lamelares (CL) (Perez-Gil y Weaver, 2010); estos CL son los organelos encargados de almacenar los componentes del surfactante. Los CL se encuentran rodeados por una membrana que se fusiona con la membrana celular para su secreción (Haagsman & van Golde, 1991). El mecanismo exacto por medio del cual se lleva a cabo la formación de los cuerpos lamelares no se conoce completamente. Se ha propuesto que los lípidos y las proteínas del surfactante son transportados a los cuerpos lamelares por diferentes vías; las proteínas del surfactante B y C una vez sintetizadas son llevadas del aparato de Golgi al endosoma tardío/cuerpo multivescicular (CMV), y de este a los CL (Perez-Gil y Weaver, 2010). Una vez formado el cuerpo lamelar, este puede ser secretado mediante exocitosis para ser llevado a la interfase agua/aire, donde es transformado a mielina tubular. La secreción de las proteínas SP-A y SP-D, es poco conocida, sin embargo, se cree que estas son secretadas por vías alternas a las de los cuerpos lamelares, y que una vez en la interfase agua/aire, estas se unen a los otros constituyentes del surfactante; donde SP-A participa en la formación de la mielina tubular (Andreeva, et al., 2007); esta mielina tubular posteriormente pasa a formar la película del surfactante. Se ha observado que los componentes del surfactante tienen una duración de alrededor de 7 días formando parte de la película de surfactante, y posteriormente son retirados de esta en forma de pequeños agregados, los cuales pueden ser fagocitados y degradados por los macrófagos o en su defecto ser recapturados por las células alveolares tipo II. (Perez-Gil y Weaver, 2010). Investigaciones han demostrado que aquellos agregados que contienen grandes cantidades de SP-A y SP-D son principalmente recapturados por las células epiteliales tipo II (Perez-Gil y Weaver, 2010); tanto las proteínas como los lípidos presentes en estos son llevados a los endosomas tempranos para posteriormente formar a los cuerpos lamelares dentro de estas células (Kingma y Jobe, 2012). La Figura 5 muestra de manera gráfica el proceso de síntesis, liberación y recaptura de los componentes del surfactante pulmonar.



**Figura 5. Síntesis, formación y secreción del surfactante.** Las proteínas del surfactante se encuentran rodeando a los lípidos dentro de los cuerpos lamelares. Estos son secretados por exocitosis a la interfase agua/aire (modificado de Kingma y Jobe, 2012).

### 1.4.3 Regulación de la expresión del surfactante pulmonar.

El surfactante puede verse regulado por diferentes cambios dentro de su homeostasis. Diversos procesos dentro del organismo, así como la presencia de agentes exógenos pueden llevar a la alteración del surfactante (Whitsett y Glasser, 1998). Diferentes contaminantes han demostrado su capacidad para modificar la concentración de las proteínas del surfactante. El análisis del fluido bronquio-alveolar de personas fumadoras ha demostrado la disminución tanto de la SP-A como la SP-D (Griese, 1999). Aztatzi y colaboradores observaron que tras la exposición a material particulado 2.5 (PM<sub>2.5</sub>) el fluido bronquio-alveolar de ratas macho Sprague-Dowley presentaba una disminución de la SP-A (Aztatzi-Aguilar et al., 2016). De esta misma forma, se ha encontrado que la expresión de la SP-A puede ser modulada por una variedad de hormonas y factores, incluyendo retinoides, insulina, factores de crecimiento, glucocorticoides y agentes que aumentan la formación de AMP cíclico (Mendelson et al., 1998). Estudios evidencian que la exposición a TNF disminuye los niveles de SP-

A, SP-B y SP-C en un modelo *in vivo*; así mismo, TNF- $\alpha$  y los ésteres de forbol reducen el ARNm de SP-A y SP-B en células pulmonares de adenocarcinoma (Whitsett y Glasser, 1998). Doumanov y colaboradores en su estudio en 2014 demostraron que tras la exposición a diferentes tiempos de interleucina 6 sobre un cultivo de células A549 los niveles de la SP-A se veían disminuidos. Uno de los principales causantes del aumento desmedido de las citocinas pro-inflamatorias es la respuesta inflamatoria, la cual puede presentarse por diversos factores entre los que se podría destacar el ingreso a las vías aéreas de diferentes contaminantes como el material particulado y las NP, los cuales, además de llevar a la inducción de esta respuesta podrían alterar de manera indirecta la concentración de las proteínas del surfactante, y por tanto a la pérdida de las funciones antes mencionadas que permiten el mantenimiento normal del sistema respiratorio.

### **1.5 La respuesta inflamatoria**

La inflamación es una reacción biológica a una interrupción de la homeostasis de los tejidos. Puede entenderse como un proceso de destrucción de tejidos que involucra el reclutamiento de productos derivados de la sangre como proteínas del plasma, fluido y leucocitos en el tejido dañado. Esta migración es facilitada por alteraciones en la vasculatura local que llevan a vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y aumento del flujo sanguíneo. La infección por invasores microbianos, un daño o trauma y la exposición a partículas, irritantes o contaminantes externos son potentes activadores de la inflamación. La función principal de la inflamación es la rápida destrucción o el aislamiento de la fuente causante del daño, la remoción del tejido dañado y finalmente la restauración de la homeostasis del tejido (Ashley, et al., 2012).

Uno de los principales mediadores en la respuesta inflamatoria son las citocinas. Las células del sistema inmune y de otros sistemas pueden interactuar unas con otras a través de las citocinas. Las citocinas son glicoproteínas pequeñas, solubles, producidas por una amplia variedad de células inmunes y no inmunes que tienen funciones pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Las citocinas se unen a los sitios receptores de la membrana celular y por un proceso de vías de señalización que

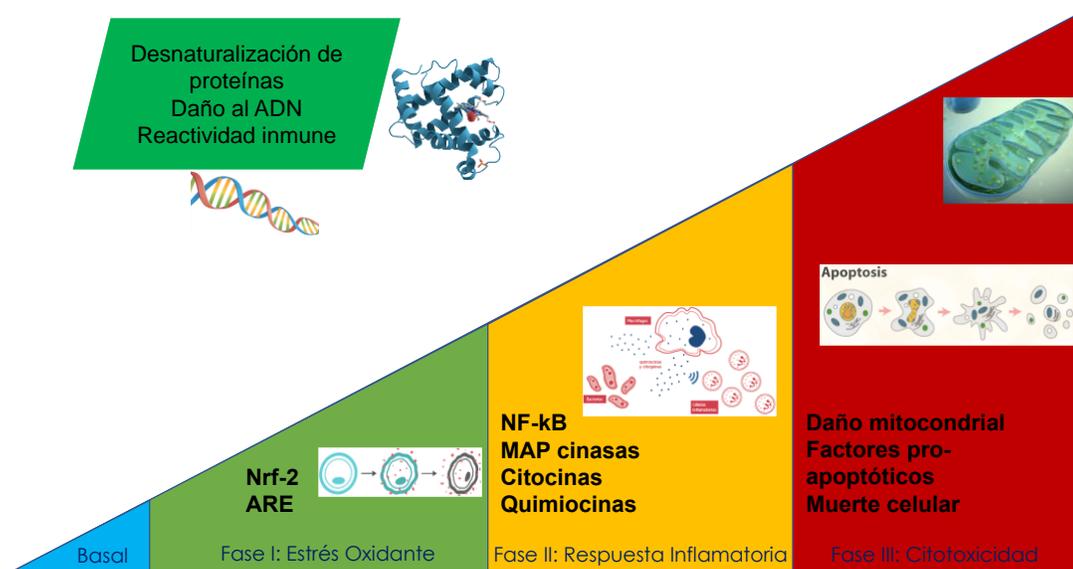
involucra enzimas intracelulares y factores de transcripción inducen, aumentan o inhiben a los genes que regulan a las citocinas (Rankin, 2004). Las citocinas participan tanto en procesos biológicos como la proliferación y diferenciación de diferentes células, así como en la respuesta inflamatoria y la regulación de esta. Uno de los puntos críticos de la producción de estas proteínas es el hecho de que en general, estas deben ser producidas durante un lapso corto de tiempo, y que una vez ejercida su función, sus niveles deben verse disminuidos para mantener la homeostasis de los tejidos y continuar con el correcto funcionamiento del organismo (Kelso, 1998); sin embargo, diversos procesos pueden llevar a desencadenar una respuesta inflamatoria crónica (exposición continua a contaminantes, falta de regulación del sistema inmune, entre otros), que pueden llevar al daño permanente de la estructura y la función de las células y por tanto, a enfermedades degenerativas a largo plazo (Turner et al., 2014).

### **1.6 Relación entre la respuesta inflamatoria y las NP en el sistema respiratorio**

Como ya se ha mencionado, una de las principales vías de exposición a las NP es el sistema respiratorio, una vez inhaladas, estas NP son probables inductoras de la respuesta inflamatoria aguda o crónica, donde sucede el reclutamiento de células inflamatorias y la liberación de citocinas.

Diferentes investigaciones han asociado la toxicidad de las NP principalmente a la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), se ha observado, que una vez aumentada la generación de las diferentes especies oxidantes en la célula, distintas vías de señalización son activadas para producir una respuesta antioxidante como primera línea de defensa (Oberdörster et al., 2005). Dentro de la activación de estas vías de señalización se encuentra Nrf-2, que lleva a la producción de enzimas antioxidantes; así como la vía de las MAP cinasas y NF- $\kappa$ B, las cuales pueden llevar a un segundo nivel de respuesta (Nel, et al., 2006). La vía de las MAP cinasas es sensible al aumento del estrés oxidante en las células y puede ser activada por las ROS generadas por la exposición a NP; la activación de esta vía puede llevar a la

producción de diversas citocinas pro-inflamatoria (Lu et al., 2014). Generalmente, la exposición a NP se ha visto asociada a la producción de diversas citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , entre otras en diferentes modelos biológicos, asociándose esta a la respuesta inmune innata, la cual tiende a volverse una respuesta adaptativa de tipo 1 (que se presenta por infecciones bacterianas, virales, etc.) (Himly, et al., 2016). Finalmente, si estos efectos producidos por la respuesta inflamatoria y el estrés oxidante no son controlados, diferentes organelos como la mitocondria, el retículo endoplásmico o los lisosomas pueden sufrir daños irreparables dando como resultado la muerte celular causada por la liberación de factores pro-apoptóticos provenientes de estos organelos (Figura 6) (Meng et al., 2009).



**Figura 6. Mecanismo de acción general propuesto por la exposición a NP.** Una vez en contacto con la célula, las NP son capaces de producir ROS, las cuales son capaces de desencadenar la respuesta inflamatoria y el daño de los organelos celulares, llevándola a la muerte (modificado de Nel et al., 2006).

A pesar de lo anterior, no siempre la concentración presente de estas NP en las vías respiratorias, propiamente en la región alveolar, puede terminar en la muerte de las células, diferentes investigaciones han demostrado que a concentraciones no tóxicas

de NP las células pueden presentar otros daños a las distintas macromoléculas (interacción con proteínas, lípidos, ADN), desbalance de la respuesta antioxidante y reactividad inmune, entre otros. Estos daños a las células podrían desencadenar una serie de procesos crónicos dentro de sus tejidos y órganos, que de no ser controlados podrían llevar a diferentes enfermedades. A continuación, se describe como se desarrolla la toxicidad por la exposición a NP del interés de este trabajo, TiO<sub>2</sub> u ZnO, particularmente en el sistema respiratorio.

### **1.7 La toxicidad de las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO sobre el sistema respiratorio**

Diferentes estudios acerca del posible daño causado por los NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO se han enfocado en el efecto sobre el sistema respiratorio tanto *in vivo* como *in vitro*.

#### **1.7.1 Efecto de la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>**

La investigación realizada en ratones C57BL/6 expuestos a NP de TiO<sub>2</sub> por instilación nasal a concentraciones de 7.5 a 30 mg/kg mostró el aumento de neutrófilos dentro del lavado bronquio-alveolar, así como el incremento de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6, por la inducción de un evento pro-inflamatorio (Yazdi et al., 2010). Otra investigación realizada en ratas macho Fisher F344 jóvenes (12-13 semanas de edad) y ancianas (19 meses de edad) determinó los efectos del depósito y bio-distribución de aerosoles de TiO<sub>2</sub> (21 nm) administrados vía inhalatoria a una concentración de 10 mg/m<sup>3</sup> por 6 horas al día, 5 días a la semana durante 4 semanas; los resultados muestran que a 180 días posteriores a la exposición los niveles de TiO<sub>2</sub> son detectables en los pulmones (ratas jóvenes), el hígado y el bazo (en ambos grupos) (Gaté et al., 2017). Estos hallazgos muestran la capacidad que presentan estas NP para distribuirse en todo el organismo una vez que son inhaladas, pudiendo llevar a diferentes efectos sobre los órganos blanco.

Entre los efectos observados *in vitro* se ha visto que estas NP pueden alterar el metabolismo celular, su viabilidad, así como la producción de especies reactivas de oxígeno e inflamación; en la Tabla 4 se muestran algunos de estos efectos en diferentes ensayos.

**Tabla 4. Efecto de la exposición a NP de TiO<sub>2</sub> sobre modelos *in vitro*.**

<b>NP (tamaño)</b>	<b>Línea celular</b>	<b>Efectos observados</b>	<b>Referencia</b>
TiO <sub>2</sub> (21 nm) C: 0.3-1000µg/mL T: 24 h	A549 H1299	Diferencia en la incorporación de las NP dependiente de línea celular. Efecto sobre la actividad mitocondrial. Disminución de la viabilidad celular.	(Tedja, Marquis, Lim, & Amal, 2011)
TiO <sub>2</sub> (dif. tamaños) C: 5–500 mg/ml T: 24 h	A549	Disminución de la viabilidad celular. Producción de ROS. Aumento en la concentración de IL-6 e IL-8.	(Ekstrand-Hammarström et al., 2012)
TiO <sub>2</sub> (5nm) C: 50 – 200 µg/mL T: 24, 48 y 72 h	A549	Inhibición de proliferación celular. Daño al ADN. Inducción de apoptosis por activación de la vía intrínseca mitocondrial.	(Y. Wang et al., 2015)

(C: concentraciones; T: Tiempos).

### 1.7.2 Efecto de la exposición a NP de ZnO

De esta misma forma, diferentes estudios acerca de los posibles daños de las NP de ZnO sobre el sistema respiratorio se han llevado a cabo. Estudios *in vivo* realizados en ratas Fisher F344 macho (9-11 semanas de edad) expuestas por vía intra-traqueal (0.2 y 1 mg) en una dosis única y por vía inhalatoria (2 y 10 mg/m<sup>3</sup>) por 6 h al día, 5 días a la semana por 4 semanas a las NP de ZnO, muestran un incremento transitorio del flujo de neutrófilos, así como de las concentraciones de CINC-1, CINC-2 y HO-1 en el lavado bronquio-alveolar en las dosis más altas administradas por ambos tipos de exposiciones durante la fase aguda, mientras que en la fase crónica estos

parámetros y la inflamación producida por los neutrófilos regresan a sus valores basales (Morimoto et al., 2016). Otra investigación hecha sobre ratas Wistar macho las cuales fueron expuestas por vía inhalatoria 2 veces al día por 3 días con 2.5mg/kg de NP de ZnO, observaron una biodistribución al hígado 12 horas después de finalizados los tratamientos, así como un aumento de estas NP después de 36 horas en los riñones e hígado (Wang et al., 2010). En la Tabla 5 se muestran algunos de los efectos observados tras la exposición a las NP de ZnO en modelos *in vitro*.

**Tabla 5. Efecto de las NPs de ZnO sobre modelos *in vitro*.**

<b>NP (tamaño)</b>	<b>Línea celular</b>	<b>Efectos observados</b>	<b>Referencia</b>
ZnO (10 nm) C: 3, 10 y 30 cm <sup>2</sup> /mL T: 24 h	A549	Aumenta la citotoxicidad. Producción de IL-8. Activación de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB.	(W.-S. Cho et al., 2012)
ZnO (50x140 nm) C: 5, 10, 25, 50, 100 μg/mL T: 24, 48 h	A549	Citotoxicidad. Generación de ROS. Activación de caspasa 3 y 9. Inducción de la hsp 70. Aumento de la proteína Pro-apoptótica bax.	(Ahamed et al., 2011)
ZnO (63 nm) C: 0.5 – 200 μg/mL T: 24 h	A549 BEAS-2B	Arresto del ciclo celular (G2/M). Apoptosis. Producción de ROS. Disfunción mitocondrial. Afecta metabolismo de glucosa.	(Lai et al., 2015)

(C: concentraciones; T: tiempos).

Cómo se menciona en los estudios anteriores, la mayoría de las investigaciones de NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO realizadas actualmente se han enfocado en los daños producidos sobre diferentes organelos celulares, alteraciones celulares e integridad del tejido del sistema respiratorio, llevando a la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, entre otras); sin embargo, poco es sabido del efecto de estas NP sobre

el surfactante pulmonar; la presencia de estas citocinas puede llevar a la disminución de las proteínas del surfactante, y esto a su vez producir una disfunción tisular, que podría contribuir a daños epiteliales en el pulmón participando en enfermedades crónicas como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfisema entre otras.

### **1.8 Justificación**

El aumento en el uso y la manufactura de las nanopartículas (NP) ha llevado a una mayor exposición al humano. Distintas investigaciones han demostrado que los nanomateriales (NM) como el  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$  son capaces de causar una respuesta inflamatoria, la inducción de estrés oxidante y como consecuencia de esto, apoptosis en modelos *in vivo* e *in vitro*. Una de las principales vías de exposición a estos materiales es la inhalatoria. El líquido surfactante es la primera barrera con la cual entran en contacto agentes externos que ingresan al sistema respiratorio. Entre los componentes de este líquido se encuentran las proteínas del surfactante (SP-A, SP-B, SP-D), las cuales participan en procesos inmunológicos y biofísicos para el mantenimiento del epitelio pulmonar. Por otro lado, se ha reportado que las citocinas pro-inflamatorias pueden regular los niveles de las proteínas del surfactante. Por lo anterior, el presente estudio pretende evaluar la respuesta inflamatoria y su participación en la expresión de las proteínas del surfactante tras la exposición a NP de  $\text{TiO}_2$  u  $\text{ZnO}$  en la línea celular A549.

### **1.9 Hipótesis**

El aumento en citocinas pro-inflamatorias modificará la expresión de las proteínas del surfactante tras la exposición a NP de  $\text{TiO}_2$  u  $\text{ZnO}$  en una línea celular de epitelio alveolar humano.

## **1.10 Objetivos**

### **1.10.1 Objetivo general**

Evaluar la participación de citocinas pro-inflamatorias en la expresión de las proteínas del surfactante tras la exposición a NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO en una línea celular de epitelio alveolar humano (A549).

### **1.10.2 Objetivos particulares**

- Caracterizar las propiedades físicoquímicas de las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO.
- Determinar la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Evaluar las citocinas pro-inflamatorias producidas por las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO en la línea celular A549.
- Cuantificar los niveles de proteína de las SP (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D).
- Inhibir los niveles de la interleucina 6 producida por las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO para evaluar su participación en la expresión de las SP.

## 2. Métodos

### 2.1 Diseño experimental



**Figura 7. Diseño experimental de la caracterización de las NP.** Se muestra un esquema general de los ensayos realizados para la determinación de las características fisicoquímicas de las NP de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$ .



**Figura 8. Diseño experimental de la exposición.** Se muestran los experimentos realizados de la exposición a la línea celular A549 a las NP de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$ .

## **2.2 Preparación de las suspensiones de NP**

Se preparó una suspensión stock (2 mg/mL y 300 µg/mL, respectivamente) de NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO en agua doblemente desionizada (H<sub>2</sub>O-dd). Se suspendieron las NP en agua y se sonicaron durante 2.5 min para el TiO<sub>2</sub> y 2 min para el ZnO en hielo. Esta suspensión fue diluida en medio de cultivo Ham's-F12 con 10% de suero fetal bovino (SFB) para determinar el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO en el medio.

## **2.3 Microscopía electrónica de transmisión y espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (TEM-EDS)**

**2.3.1 Principio.** En esta técnica, un espécimen fino es irradiado con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme. Los electrones son emitidos desde la pistola de electrones por emisión termoiónica de los cátodos de la horquilla de tungsteno. Un sistema de dos fases de lentes de condensación permite la variación de la apertura de iluminación y del área de la muestra iluminada. La distribución de la intensidad de electrones detrás de la muestra es reflejado con un sistema de lentes de tres o cuatro fases sobre una pantalla fluorescente (Reimer, 1984).

**2.3.2 Procedimiento.** Una vez preparadas las suspensiones de NP de TiO<sub>2</sub> (200 µg/mL) y ZnO (300µg/mL), 10µl de esta suspensión fueron homogeneizados con 10 µL de agua milliQ; de este homogeneizado se tomaron 10 µL y se colocaron sobre una laminilla de carbono; la laminilla se dejó a temperatura ambiente hasta secarse la gota de la suspensión de NP. La laminilla seca se llevó a analizar al microscopio de la marca JEOL, modelo JEM-ARM200F en las instalaciones del Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica en el Cinvestav-IPN. Las imágenes se obtuvieron para analizar el tamaño primario de la partícula y su dispersión. El análisis elemental de las NP se realizó por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X.

## **2.4 Diámetro hidrodinámico y potencial zeta**

**2.4.1 Principio.** El método de dispersión dinámica de la luz (DLS) analiza la distribución de velocidad de movimiento de la partícula por medición de las fluctuaciones de la dinámica de la dispersión de la luz causada por el movimiento

Browniano de la partícula. Esta técnica produce un radio hidrodinámico, o diámetro, que puede ser calculado por la ecuación de Stokes-Einstein de las medidas mencionadas. La técnica utilizada para determinar el potencial zeta de las partículas es conocida como velocimetría por láser tipo Doppler (LDV). Esta técnica utiliza un láser, el cual atraviesa la muestra, para medir la velocidad de las partículas en un campo eléctrico aplicado de un valor conocido de referencia, que se conoce como movilidad electroforética (Murdock, et al., 2008).

**2.4.2 Procedimiento.** Las suspensiones de NP fueron preparadas de acuerdo a las condiciones mencionadas antes: H<sub>2</sub>O-dd y medio Ham's-F12 10% de SFB, para las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO, respectivamente. Se colocó 1 mL de cada suspensión en una celda de vidrio para determinar el diámetro hidrodinámico, y esta misma alícuota fue llevada a una celda desechable especial para determinar el potencial zeta en el equipo Zetasizer NanoZS90 de Malvern Instruments Ltd, UK.

## **2.5 Exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO**

Para alcanzar las concentraciones de NP deseadas en la suspensión (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL para TiO<sub>2</sub>; 2.5, 5.0, 10 y 15 µg/mL para ZnO), la cantidad necesaria de las suspensiones stock (2 mg/mL para TiO<sub>2</sub> y 300 µg/mL para ZnO) fue adicionada en medio Ham's-F12 al 0.5% SFB. Estas soluciones fueron preparadas en tubos cónicos de vidrio y se sonicaron durante 5 seg. A las células sembradas en las placas se les retiró el medio, los pozos fueron lavados con PBS y se les adicionó la suspensión de NP en cada pozo. Los tratamientos se realizaron durante 12, 24 y 48 h a una densidad de 50,000 células/cm<sup>2</sup>.

## **2.6 Ensayo de viabilidad por la cuantificación del metabolismo de MTS**

**2.6.1 Principio.** Este ensayo mide el metabolismo celular por la determinación de la actividad mitocondrial de las células viables para convertir a la sal soluble de tetrazolio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) a un producto coloreado de formazán (azul/violeta). La reducción del MTS a formazán refleja el estado redox de la célula (Stec & Hull, 2010). Esta conversión es llevada a cabo por enzimas deshidrogenasas dependientes de NADPH. El colorante producido

puede ser cuantificado por medición de su absorbancia a 490 nm (Cory, Owen, Barltrop, & Cory, 1991). Este ensayo es un método conveniente para la evaluación de la viabilidad celular. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo (Bartlett & Entzeroth, 2006).

**2.6.2 Procedimiento.** Al cumplir el tiempo exposición el medio fue retirado y se adicionaron 135  $\mu$ L de medio fresco y 15  $\mu$ L del reactivo de MTS, las células fueron incubadas nuevamente por 2.5 h a 37° C y protegidas de la luz. Posteriormente, los 150 $\mu$ L obtenidos de cada pozo fueron llevados a otra placa, para ser centrifugados por 45 min. a 3700 rpm, y finalmente ser leídos. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 490 nm y 690 nm en el espectrofotómetro TECAN Infinite® 200 (Tecan, Suiza).

## **2.7 Ensayo de viabilidad celular por determinación de yoduro de propidio (PI)**

**2.7.1 Principio.** El yoduro de propidio (PI) es un compuesto fluorogénico que se une de manera estequiométrica a los ácidos nucleicos, donde esta emisión es proporcional al ADN contenido en la célula, a consecuencia también de un aumento en la permeabilidad de la membrana. Cuando las células apoptóticas son teñidas con PI y analizadas con citómetro de flujo, muestran un amplio pico hipodiploide, el cual puede ser discriminado del pico estrecho producido por las células con contenido normal de ADN (diploides) (Riccardi & Nicoletti, 2006).

**2.7.2 Procedimiento.** Posterior al tiempo de tratamiento de las células, estas fueron levantadas por medio de tripsina; posteriormente fueron lavadas con PBS dos veces y centrifugadas por 5 min a 2000 rpm. Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200  $\mu$ L de PBS. Finalmente 0.2  $\mu$ L de PI se adicionaron a la solución y se llevó a la suspensión total de células a lectura en el citómetro de flujo BD LSRFortessa (BD Biosciences, Estados Unidos).

## **2.8 Determinación de la generación intracelular de ROS.**

**2.8.1 Principio.** La citometría de flujo mide características ópticas y fluorescentes de las células. Colorantes fluorescentes pueden unirse o intercalarse con diferentes componentes celulares como el ADN o el ARN. Cuando las células marcadas por un colorante son pasadas por una fuente de luz, las moléculas fluorescentes son excitadas a un estado de alta energía; una vez que estos regresan a su estado de reposo, los fluorocromos emiten energía luminosa a longitudes de onda mayores. Estas señales de luz son concentradas y detectadas por filtros y tubos fotomultiplicadores que finalmente se digitalizan para su análisis en computadora (Brown & Wittwer, 2000). La 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) es un colorante no polar, que es convertido a su derivado polar DCFH por las esterasas celulares que es no fluorescente, pero que al ser oxidado por las ROS y otros peróxidos es transformada a DCF un compuesto fluorescente (Rastogi, Singh, Häder, & Sinha, 2010). El uso de MitoSox Red permite analizar la producción mitocondrial del anión superóxido ( $O_2^-$ ); el MitoSox Red es ingresado de manera pasiva a la célula, y al llegar a la mitocondria este compuesto es oxidado por el anión  $O_2^-$  resultando en la emisión de fluorescencia roja (Puleston, 2015).

**2.8.2 Procedimiento.** Pasado el tiempo de tratamiento de las células, estas fueron levantadas por medio de tripsina; posteriormente se lavaron con PBS dos veces y se centrifugaron por 5 min a 2000 rpm. Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200  $\mu$ L de PBS. Después una solución de 50  $\mu$ L de MitoSox Red y DCFH-DA se adicionó a las células y se dejaron en reposo por 30 minutos. Finalmente se llevó a la suspensión total de células a lectura en el citómetro de flujo BD LSRFortessa.

## **2.9 Cuantificación de citocinas**

**2.9.1 Principio.** Este tipo de ensayo se lleva a cabo sobre una plataforma de micro-esferas que pueden ser aplicados tanto a proteínas como a ácidos nucleicos. Estas micro-esferas tienen un anticuerpo (Ab) de captura inmovilizado covalentemente en una pequeña área de superficie, requiriendo menos anticuerpo de captura y menos volumen de muestra, comparado con el ensayo ELISA, además de que las uniones no

específicas se ven reducidas significativamente. Posterior a la unión de la muestra con el anticuerpo, estas plataformas deben ser incubadas con un segundo anticuerpo de detección unido a biotina, para después ser llevados a reaccionar con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina. Una vez finalizado este proceso, las plataformas son excitadas a una longitud de onda específica, emitiendo una fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de antígeno capturado (Houser, 2012).

**2.9.2 Procedimiento.** La determinación de citocinas se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones mencionadas por el fabricante. Después de la exposición a las NP, se colectaron los sobrenadantes del medio de cultivo, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min y se incubaron con las perlas conjugadas con los anticuerpos de interés anti: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$  durante toda la noche a 4<sup>o</sup> C. Posteriormente, se lavaron las muestras para retirar el exceso de proteínas no unidas y se incubaron con los anticuerpos acoplados a biotina por 1 h. Pasado este tiempo, se realizó nuevamente un lavado para eliminar el exceso y se agregó el complejo reportero de estreptavidina-ficoeritrina para posteriormente ser incubado por 30 min. Las muestras se analizaron en el equipo MAGPIX (Luminex Corporation, Estados Unidos) y los datos obtenidos se procesaron con el software Xponent (Luminex Corporation, Estados Unidos).

## **2.10 Cuantificación de los niveles de SP por Western blot**

**2.10.1 Principio.** Esta técnica es utilizada en la investigación para separar e identificar proteínas. En esta, una mezcla de proteínas es separada con base a su peso molecular, y así por su tipo, a través de un gel de electroforesis. Estos resultados son después transferidos a una membrana produciendo una banda para cada proteína. Posteriormente, la membrana se incuba con anticuerpos marcados específicos para la proteína de interés. Estos anticuerpos pueden ser detectados por revelado de la membrana por el uso de un cromóforo. El espesor de la banda obtenida corresponde a la cantidad de proteína presente; así haciendo un estándar se puede indicar la cantidad de proteína presente (Mahmood y Yang, 2012).

**2.10.2 Procedimiento.** Extracción de proteína total. El cultivo celular fue homogeneizado mediante politrón con buffer de lisis Nonidet-P40 (150 mM NaCl, 1%

Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8.0) e inhibidores de proteasas COMPLETE, las muestras se sonicaron por 5 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min, y se realizaron alícuotas del sobrenadante.

Técnica de Western blot. Las muestras de proteína obtenidas del lisado fueron ajustadas con solución de homogeneización hasta un volumen final de 50  $\mu$ L, se añadieron 5  $\mu$ L de buffer de carga, y se dejaron reposar las alícuotas a temperatura ambiente. Las muestras se cargaron en geles de 12% de poliacrilamida. Los geles se corrieron a temperatura ambiente y voltaje constante (70V) durante 5 horas hasta 1 cm antes de finalizar el gel. Pasado este tiempo, las proteínas del gel de electroforesis fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada en metanol. Se usó un marcador de peso molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder y la tinción de rojo Ponceau S. La membrana se lavó con TBS 1X y se bloqueó con leche descremada al 5% por 1h. Posteriormente se adicionó el Ab primario y se dejó toda la noche a 4° C. Pasado este tiempo la membrana fue lavada 3 veces en TBS 1X-Tween 0.1% por 5 minutos, para incubarse después con el Ab secundario conjugado durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante, nuevamente, la membranas fue lavada 3 veces en TBS 1X-Tween 0.1% y se reveló mediante un sistema de detección ECL (Enhanced chemiluminescence) acoplada a peroxidasa de rábano. La identificación de las proteínas de interés se hizo en relación al marcador de peso molecular de proteínas. Se utilizó como control de carga de la cantidad de proteína la inmunodetección de actina (P.M. 42 kDa) y otro de GADPH (P.M 39kDa). Las placas fotográficas obtenidas se analizaron por medio del software ImageJ 1.37v para obtener la densitometría de las bandas.

## **2.11 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

**2.11.1 Principio.** Este ensayo se basa en la unión del colorante azul de Comassie G250 a las proteínas. Este colorante puede existir en cuatro formas iónicas, siendo la más aniónica (azul) la que se une a las proteínas, con una absorbancia máxima a 590 nm. De esta forma, la cantidad de proteína puede ser estimada por la determinación de la cantidad de colorante a 595 nm. Este colorante parece unirse fuertemente a los

residuos de arginina y lisina, y con menor fuerza a residuos aromáticos y de histidina (Hammond y Kruger, 2009).

**2.11.2 Procedimiento.** Se preparó una curva de calibración mediante la dilución de una solución de albúmina bovina sérica de 1mg/mL con H<sub>2</sub>O-dd. Se colocaron cada uno de los volúmenes de H<sub>2</sub>O-dd y albúmina de las diluciones de la curva de calibración por triplicado en una placa de 48 pozos, teniendo un volumen de dilución de 1 mL, este volumen será igual para las muestras problema. Posteriormente se adicionaron 900 µL de reactivo de Bradford; se dejaron incubar por 15 min en oscuridad y se leyeron a 595 nm en el instrumento TECAN Infinite® 200 (Tecan, Suiza).

## **2.12 Inhibición de las citocinas pro-inflamatorias**

**2.12.1 Principio.** El bloqueo de la actividad de las citocinas pro-inflamatorias reduce la inflamación y puede suprimir vías específicas. Los anticuerpos monoclonales específicos son los mejores agentes para bloquear la actividad de algunas citocinas (Dinarello, 2013). Ya sea en el contexto de cultivo celular, modelos en animales o humanos, los anticuerpos pueden neutralizar o activar la señalización celular normal simplemente por su unión al antígeno correspondiente. Para probar que una citocina está mediando una respuesta *in vitro*, concentraciones elevadas de un anticuerpo pueden ser añadidas para unirse a su antígeno (citocina) y neutralizar su función (Lipman et al., 2005).

**2.12.2 Procedimiento.** Al momento de exponer a las diferentes concentraciones de las NP, se adicionaron 5 µL de anticuerpos específicos contra la interleucina 6 (IL-6), con el propósito de inhibir su función. Pasado el tiempo de exposición a las NP, de la misma forma que a los tratamientos anteriormente mencionados, se determinaron las concentraciones de las SP. De esta misma forma, se adicionó una concentración 10 nmolar de Dexametasona en tratamientos alternos con las NP en los cultivos celulares.

## **2.13 Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes y los resultados expresados como la media ± desviación estándar. El

análisis estadístico se llevó a cabo en el programa Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc.). Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA de una vía para los datos distribuidos de manera normal con prueba post-hoc Bonferroni. En el caso del análisis de Western blot, este fue realizado mediante t de student.

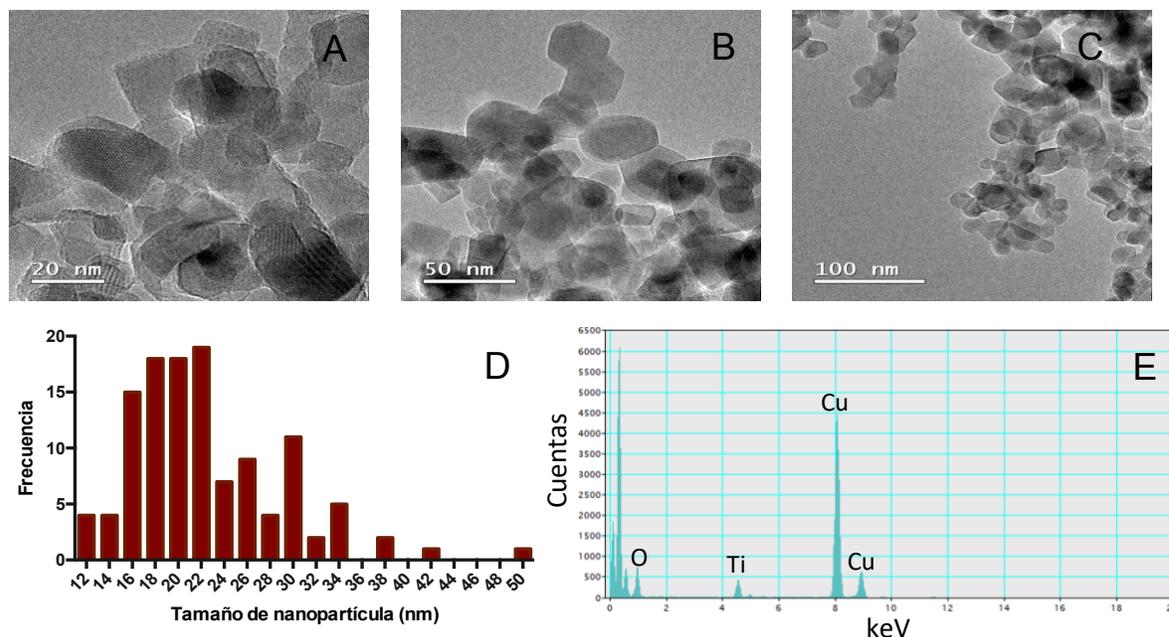
### 3. Resultados

Para continuar con la estructura presentada en la metodología, los resultados se dividieron en dos secciones: la caracterización de las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO, y posteriormente, los experimentos *in vitro* realizados sobre las células de epitelio alveolar humano A549.

#### 3.1 Caracterización de las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO

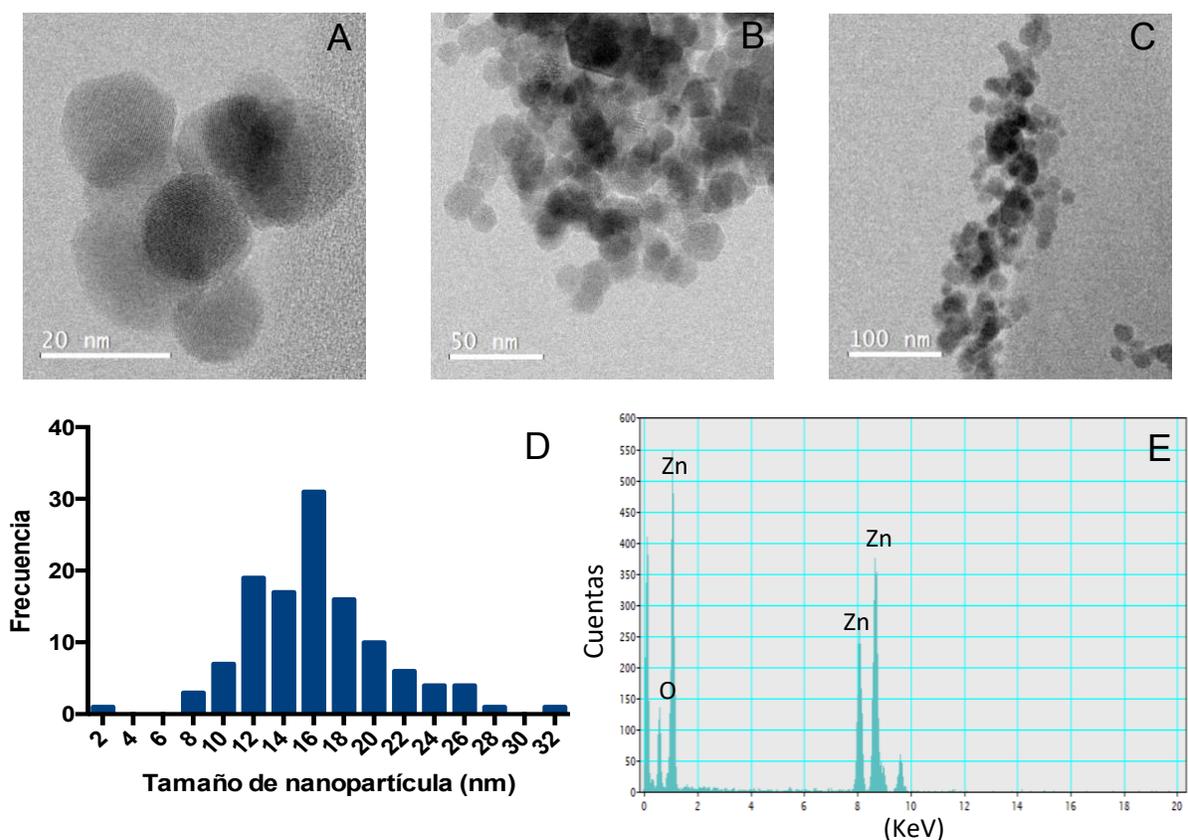
##### 3.1.1 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión

Las imágenes obtenidas por TEM de las NP de TiO<sub>2</sub> presentaban una variación en su morfología, donde se observaron NP tetraédricas y octaédricas (Figura 9 A y B), así como una gran aglomeración de este material (Figura 9 C). La determinación de la distribución de tamaño primario mostró un diámetro promedio de 22 nm, con un rango de diámetro desde los 12 hasta los 49 nm aproximadamente (Figura 9 D). El análisis elemental de estas NP permitió comprobar la composición principal de Ti y O de esta muestra (Figura 9 E).



**Figura 9. Estructura de las NP de TiO<sub>2</sub> mediante TEM-EDS.** Micrografías de las NP de TiO<sub>2</sub>, se observa la aglomeración de las NP y su morfología (A, B, C), el histograma de distribución de tamaño (D) y el análisis elemental (E). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio JEOL ARM200F del LANE Cinvestav.

En el caso de las NP de ZnO estas presentaron una morfología hexagonal (Figura 10 A) así como la presencia de aglomerados (Figura 10 B y C); con un diámetro primario de entre 2 a 32 nm con un promedio de 16 nm (Figura 10 D). El análisis de EDX mostró que además de los elementos constituyentes de estas NP no existen otros elementos contaminantes (Figura 10 E).



**Figura 10. Estructura de las NP de ZnO mediante TEM-EDS.** Micrografías de las NP de ZnO, se muestra la morfología de las NP (A), su aglomeración (B y C), el histograma de distribución de tamaño (D) y el análisis elemental (E). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio JEOL ARM200F del LANE Cinvestav.

### 3.1.2 Caracterización de diámetro hidrodinámico y potencial zeta

Con la finalidad de conocer las características fisicoquímicas de ambas NP en los diferentes medios acuosos utilizados se determinó el diámetro hidrodinámico y el

potencial zeta de estas en H<sub>2</sub>O-dd y en medio Ham's-F12. Como primer paso para realizar esta caracterización se llevó a cabo un protocolo de dispersión de las dos NP para determinar las condiciones óptimas para disminuir la aglomeración de las NP en H<sub>2</sub>O-dd, la Tabla 6 muestra la distribución del tamaño y el índice de poli-dispersión (PDI) de las NP después de 1, 1.5, 2 y 2.5 min de sonicado. Cabe destacar que el potencial zeta de las muestras analizadas se mantuvo constante en todas las temporalidades siendo de 0.163 mV para el TiO<sub>2</sub> y de 30.566 mV para el ZnO.

Posterior a este análisis se escogieron los tiempos de sonicado para cada NP basados en la estabilidad de los valores obtenidos del diámetro hidrodinámico y el PDI, determinando 2.5 min para el TiO<sub>2</sub> y 2 minutos para el ZnO. Una vez obtenido este parámetro se continuó con la determinación de estas características en medio Ham's-F12. En el medio de cultivo estos parámetros fueron obtenidos a 0, 24 y 48 h para determinar la cinética de estas NP durante su exposición a las células A549. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos tras el análisis de estas NP.

Los valores obtenidos de los tres parámetros para las NP de TiO<sub>2</sub> muestran la estabilidad de estas en el medio a los tiempos medidos. Para las NP de ZnO el valor del diámetro hidrodinámico se ve disminuido conforme pasa el tiempo, mientras que el índice de polidispersión y el potencial zeta no se ven modificados.

**Tabla 6. Determinación del tiempo de sonicado de cada tipo de NP.**

NP	Parámetro	Tiempo de sonicado (min)			
		1.0	1.5	2.0	2.5
TiO <sub>2</sub>	Diámetro hidrodinámico	19.86	17.83	18.38	17.06
	PDI	0.328	0.334	0.337	0.319
ZnO	Diámetro hidrodinámico	300.27	281.57	278.33	279.7
	PDI	0.263	0.249	0.253	0.23

\*Nota: Una vez dispersas las NP en H<sub>2</sub>O-dd, estas fueron llevadas a determinación del diámetro hidrodinámico y su índice de poli-dispersión por DLS y potencial zeta mediante electroforesis capilar Doppler.

**Tabla 7. Características fisicoquímicas de las NP en medio de cultivo.**

NP	Parámetro	Medio de cultivo		
		0	24	48
TiO <sub>2</sub>	Diámetro hidrodinámico	335.97	369.2	369.83
	PDI	0.201	0.19	0.209
	Potencial zeta	-12.07	-12.17	-11.43
ZnO	Diámetro hidrodinámico	368.57	207.5	145.3
	PDI	0.617	0.77	0.614
	Potencial zeta	-12.2	-11.33	-13.07

\*Nota: Tras la dispersión de las NP en H<sub>2</sub>O-dd una alícuota suspendida en medio Ham's-F12, esta suspensión fue llevada a determinación del diámetro hidrodinámico y su índice de polidispersión por DLS y potencial zeta mediante electroforesis capilar tipo Doppler.

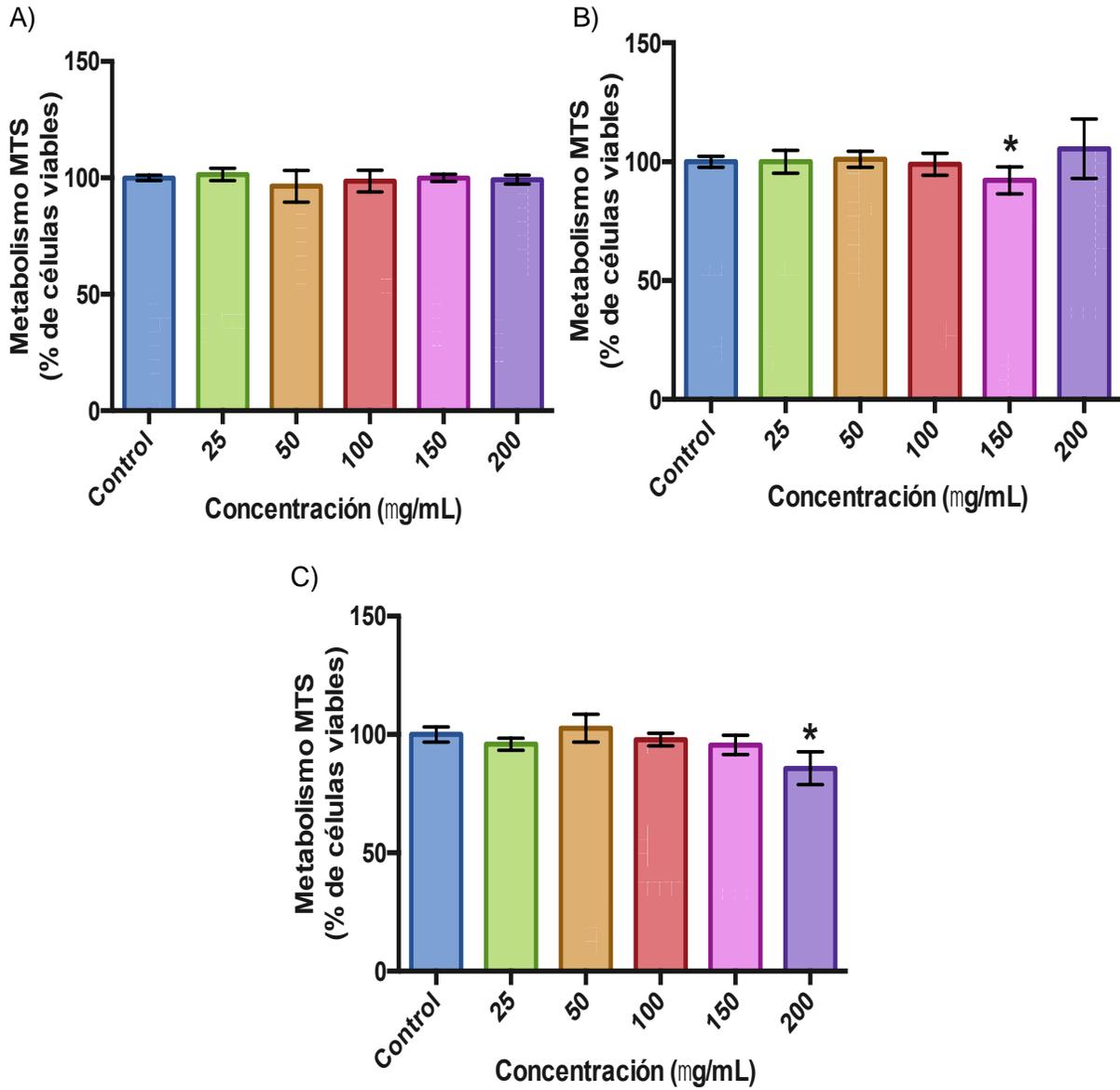
## **3.2 Exposición *in vitro* a las células A549 con las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO.**

### **3.2.1 Determinación de la viabilidad celular.**

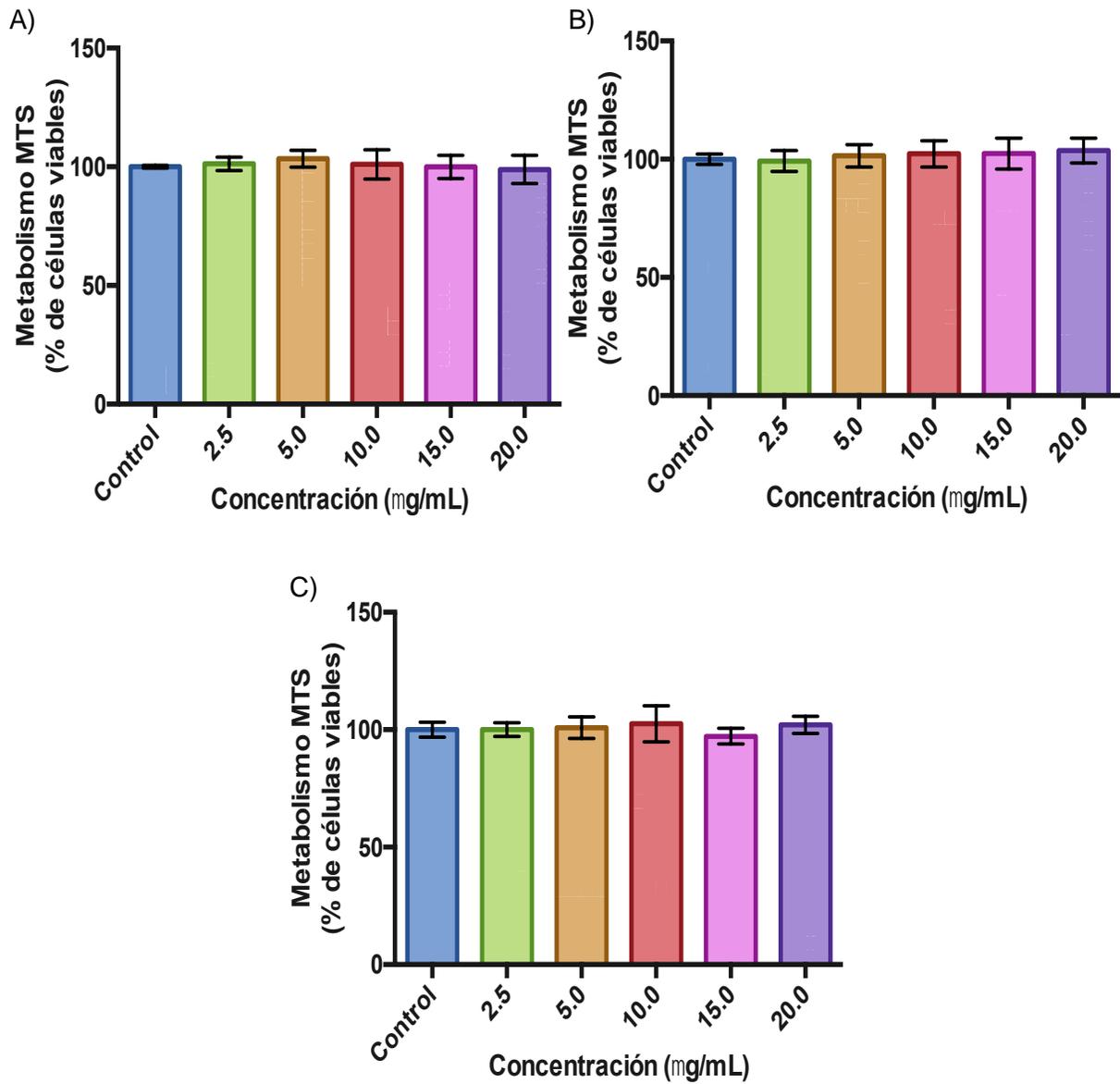
La prueba inicial realizada para la determinación de la toxicidad de las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO fue realizada mediante los ensayos de viabilidad celular. Para este propósito se seleccionaron el ensayo de MTS que permite determinar la integridad de la mitocondria y por tanto el metabolismo celular, así como el ensayo de yoduro de propidio que permite conocer la integridad del núcleo de la célula, la membrana celular y su posible muerte mediante necrosis o apoptosis. En ambos casos las determinaciones se realizaron a concentraciones crecientes de los NM (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL para TiO<sub>2</sub> y 2.5, 5.0, 10 y 15 µg/mL para ZnO, respectivamente).

#### **3.2.1.1 Ensayo de viabilidad por la cuantificación de MTS**

Los resultados obtenidos del ensayo de MTS mostraron que las NP de TiO<sub>2</sub> causan una disminución significativa del metabolismo a partir de las 24 h a una concentración de 150 µg/mL, esta se mantuvo hasta las 48 h con una disminución del 20% por la exposición a este NM a 200µg/mL; cabe destacar que a pesar de que esta disminución fue significativa a partir de las 24 h, sólo la disminución que se presentó a las 48 h fue relevante para efectos biológicos (Figura 11). Los valores obtenidos de la exposición a las NP de ZnO en este mismo ensayo no mostraron un cambio en el metabolismo en ninguna de las concentraciones ni tiempos analizados (Figura 12).



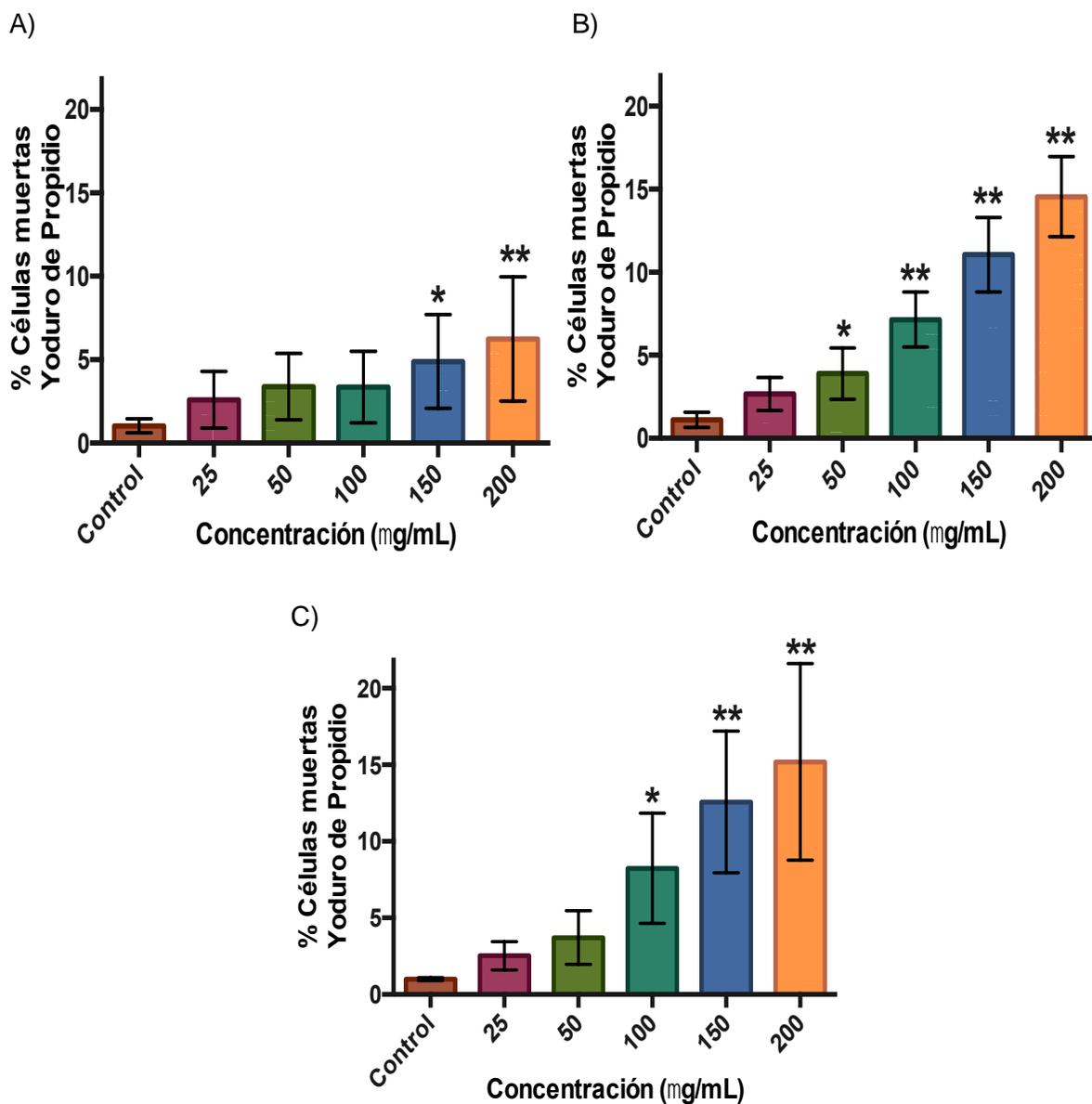
**Figura 11. Determinación de viabilidad celular por el ensayo MTS posterior a la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** Se observan los resultados obtenidos posterior a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h de exposición. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



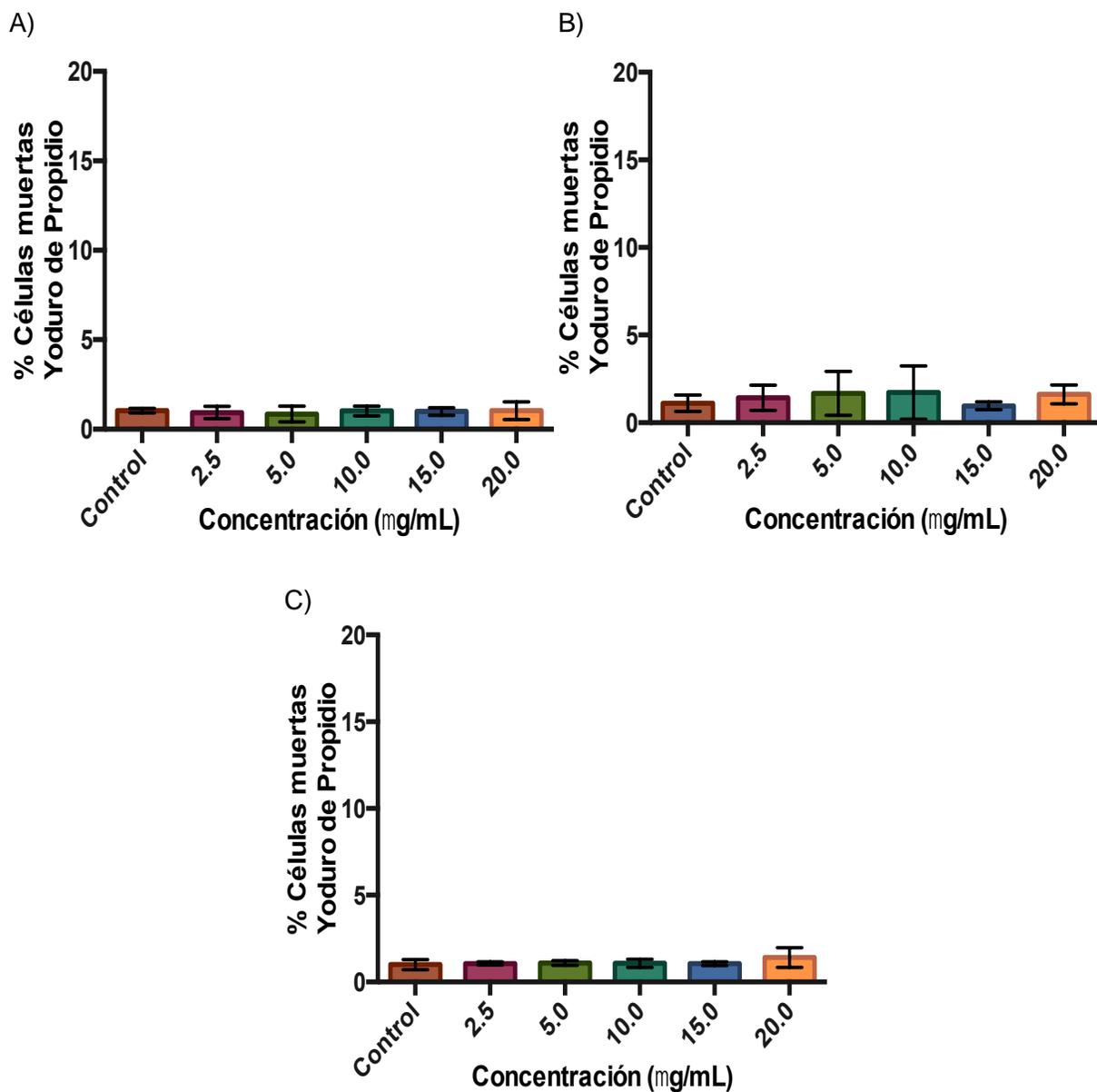
**Figura 12. Determinación de la viabilidad celular por el ensayo MTS posterior a la exposición a NP de ZnO.** Se observan los resultados obtenidos posterior a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h de exposición. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

### **3.2.1.2 Ensayo de viabilidad celular por determinación de yoduro de propidio (PI)**

El ensayo de PI mostró que las concentraciones crecientes de  $\text{TiO}_2$  presentan una disminución significativa de la viabilidad a partir de las 12 horas de exposición a las concentraciones de 150 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con valores del 5 al 10% de células no viables; este efecto se mantuvo a las 24 y 48 h, donde los valores de células muertas oscilaron entre el 5 al 22% (Figura 13). De la misma forma que en el ensayo de MTS, a pesar de que estos resultados fueron estadísticamente significativos no fueron considerados de relevancia biológica por no presentar un daño superior al 20% del total de las células, exceptuando sólo la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que en concordancia con el ensayo MTS muestra una disminución de la viabilidad cercana al 20%. Con respecto a este ensayo tras la exposición a las NP de ZnO, en ninguno de los tiempos analizados se observó un cambio significativo con respecto al control (Figura 14).



**Figura 13. Determinación de la viabilidad celular por el ensayo de PI posterior a la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** Se observan los resultados obtenidos tras 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h de exposición. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



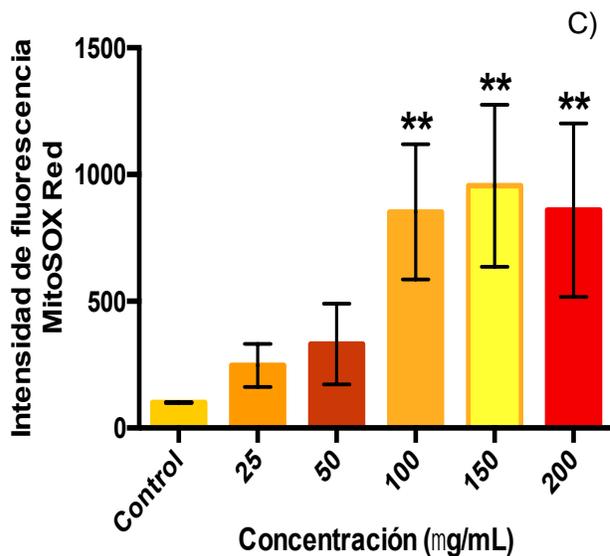
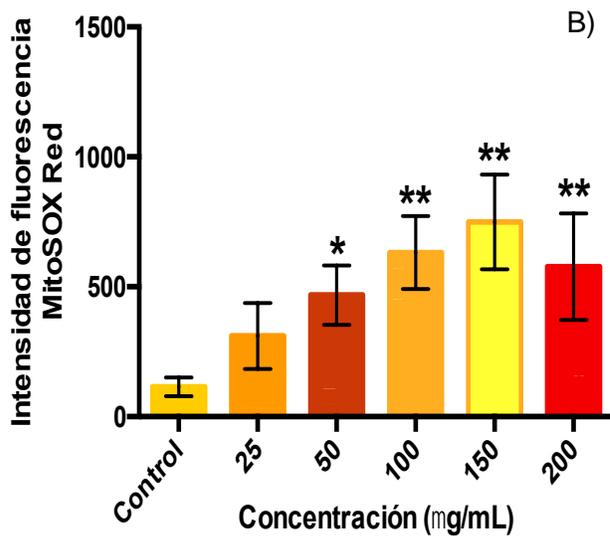
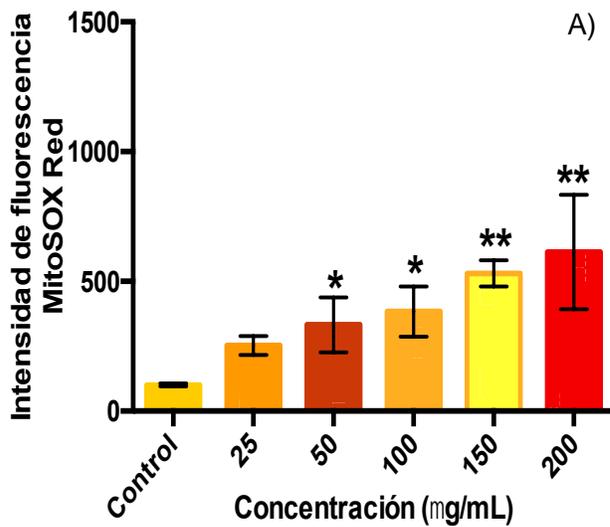
**Figura 14. Determinación de la viabilidad celular por el ensayo de PI posterior a la exposición a NP de ZnO.** Se observan los resultados obtenidos después de 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h de exposición. Estos resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

### **3.2.2 Determinación de la generación intracelular de ROS.**

De la misma manera que los ensayos de viabilidad se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ) a las diferentes concentraciones de ambas NP mediante citometría de flujo a 3, 12 y 24 horas. Mediante el uso de los colorantes específicos para detectar la concentración del anión superóxido (Mitosox Red), así como para la concentración del  $H_2O_2$  (DCFH-DA).

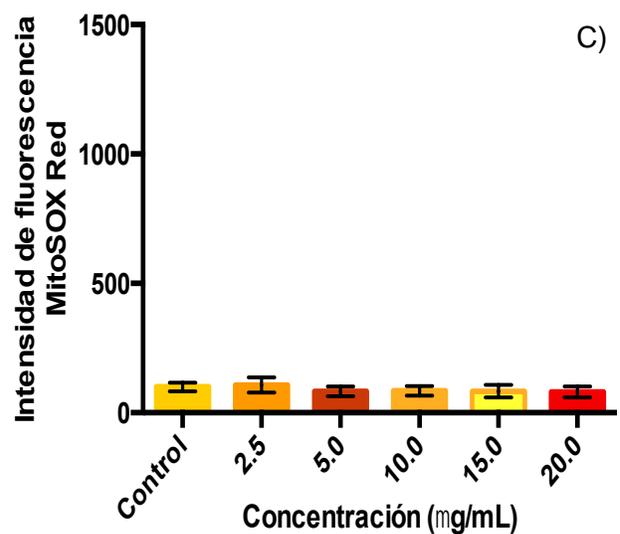
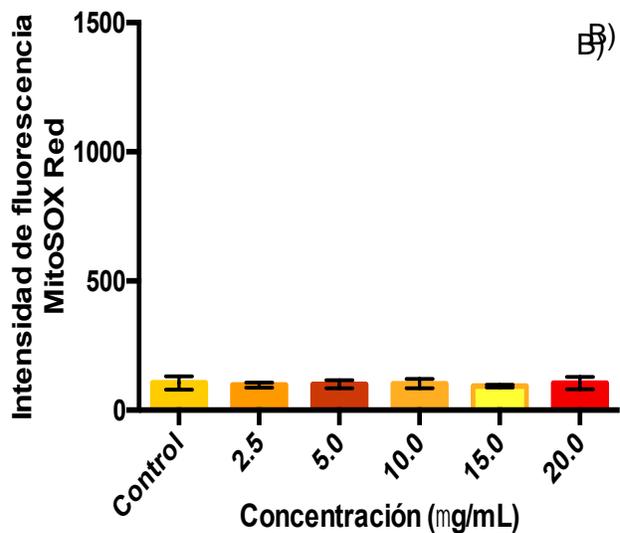
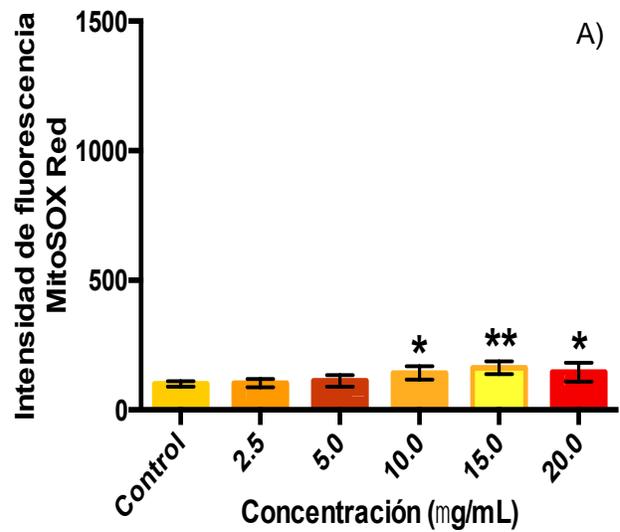
#### **3.2.2.1 Determinación del anión superóxido ( $O_2^-$ ).**

Los ensayos de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) después de la exposición a las NP de  $TiO_2$  permitieron cuantificar la generación del anión superóxido después de la exposición a este NM por 3, 12 y 24 horas; cabe destacar que para el primer tiempo analizado casi todas las concentraciones (50 – 200  $\mu\text{g/mL}$ ) presentaron un aumento significativo de esta especie, manteniéndose así a las 12 y a las 24 h (figura 15). En el caso de la determinación de este mismo ión posterior a la exposición a concentraciones crecientes de  $ZnO$ , sólo se observó un aumento estadísticamente significativo en la primera temporalidad para las concentraciones de 10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ; en los tiempos de 12 y 24 horas no se observó aumento alguno de este ión en ninguna de las concentraciones analizadas (figura 16).



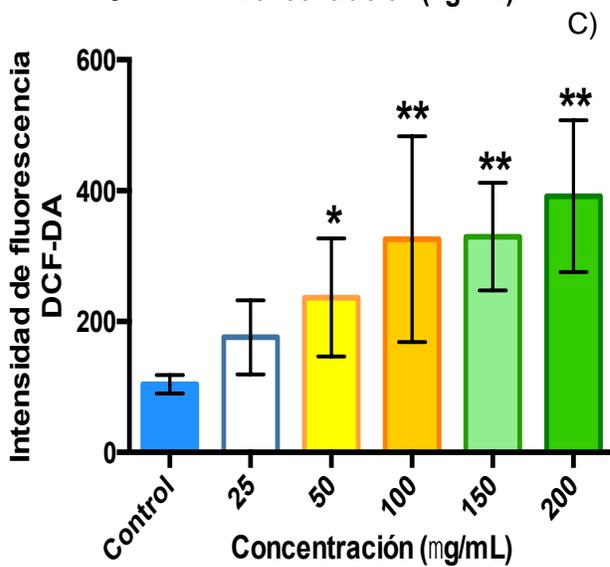
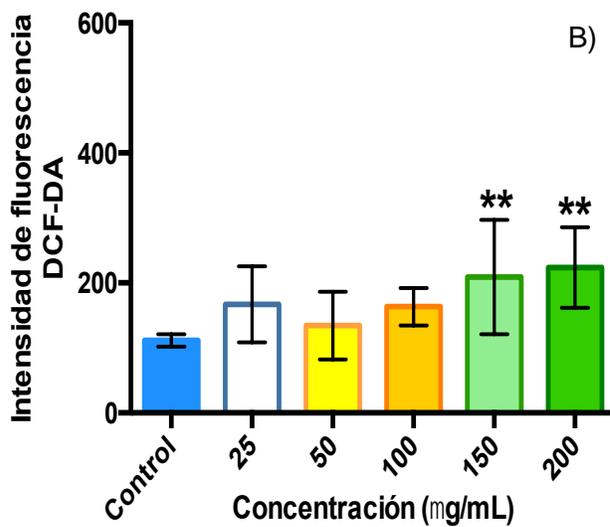
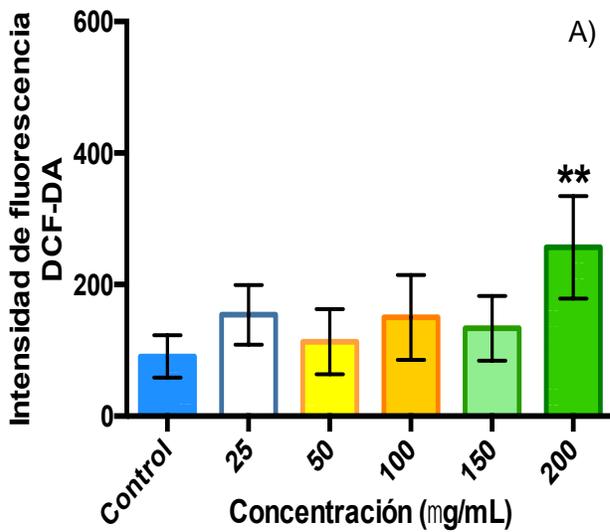
**Figura 15. Determinación de  $O_2^-$  por el ensayo MitoSox Red después de la exposición a NP de  $TiO_2$ .** La cuantificación del anión superóxido fue realizada tras la exposición a 3 (A), 12 (B) y 24 (C) h. Los resultados se obtuvieron de 3 experimentos independientes por triplicado, cada barra representa la mediana  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

**Figura 16. Determinación de  $O_2^-$  por el ensayo MitoSox Red después de la exposición a NP de ZnO.** La cuantificación del anión superóxido fue realizada tras 3 (A), 12 (B) y 24 (C) h. Los resultados se obtuvieron de 3 experimentos independientes por triplicado, cada barra representa la mediana  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



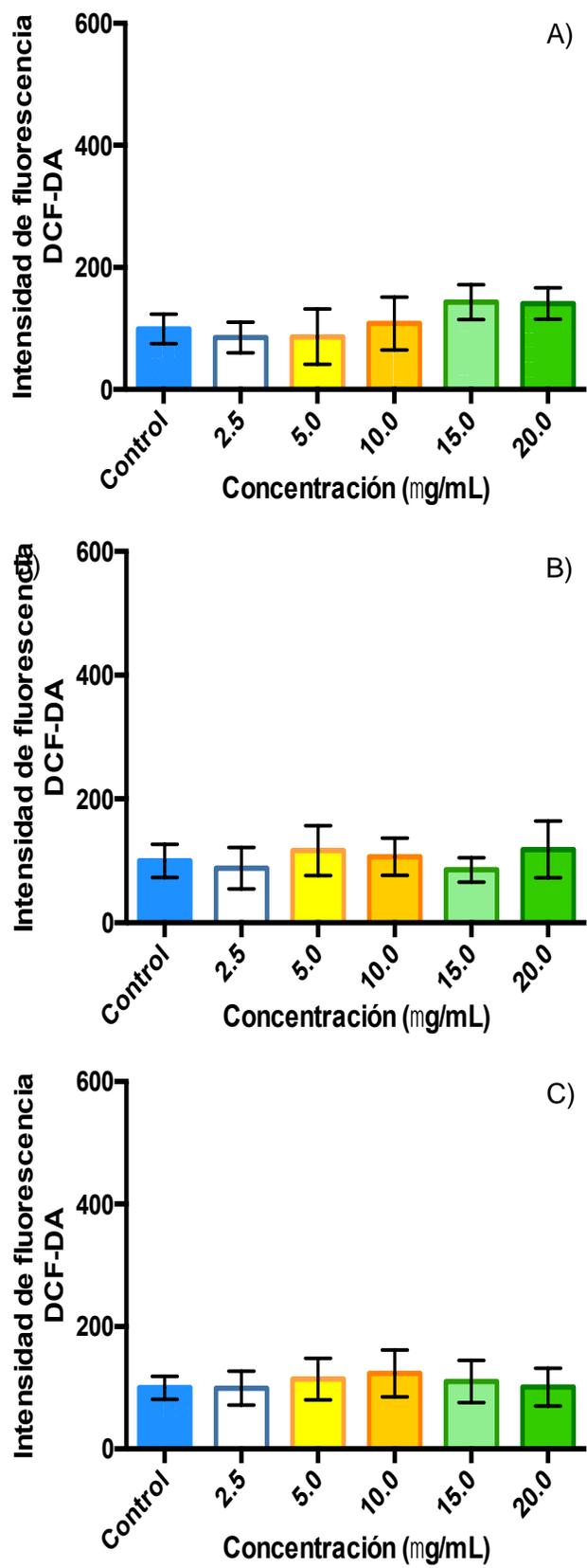
### **3.2.2.2 Determinación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

En lo referente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las NP de TiO<sub>2</sub> produjeron un aumento en la generación de este a partir de las 3 horas sólo a la concentración de 200 µg/mL, a las 12 horas en las concentraciones de 150 y 200 µg/mL y en el caso de la exposición a 24 horas, este aumento se observó a partir de los 50 µg/mL (Figura 17). La exposición a las NP de ZnO no mostró diferencias en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto al control en ninguna de las temporalidades ni las concentraciones utilizadas en este ensayo (Figura 18).



**Figura 17. Determinación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> después de la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno se realizó tras la exposición a 3 (A), 12 (B) y 24 (C) h. Los resultados se obtuvieron de 3 experimentos independientes por triplicado, cada barra representa la mediana ± DE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

**Figura 18. Determinación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posterior a la exposición a NP de ZnO.** La determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno se realizó tras la exposición a 3 (A), 12 (B) y 24 (C) h de las. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por triplicado, cada barra representa la mediana  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



### 3.2.3 Cuantificación de citocinas.

En la determinación de las citocinas y las proteínas del surfactante, para ambas NP se escogieron 3 de las concentraciones utilizadas en los ensayos anteriores con base en los resultados obtenidos en estos; dado el hecho de que se deseaba trabajar con concentraciones que no representaran un efecto citotóxico en las células, se escogieron tres de las concentraciones dónde no se observó ningún efecto significativo en la viabilidad. Para el TiO<sub>2</sub> las concentraciones utilizadas fueron 25, 50 y 100 µg/mL, mientras que para el ZnO se eligió trabajar con 5, 10 y 15 µg/mL. El medio sobrenadante obtenido de la exposición a las NP fue recolectado para cuantificar la concentración de las citocinas mediante el kit Milliplex. Se eligieron 6 citocinas para ser analizadas: IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF-α. La cuantificación de estas citocinas se realizó a las 12, 24 y 48 horas de exposición.

La cuantificación de las diferentes citocinas analizadas mostró el aumento de algunas de estas en diferentes temporalidades y concentraciones. La cuantificación de IL-1β no pudo ser realizada en algunas de las exposiciones puesto que sus niveles se encontraban por debajo de los límites de detección; los resultados obtenidos no mostraron diferencia significativa con respecto al control (Figuras 19 y 20).

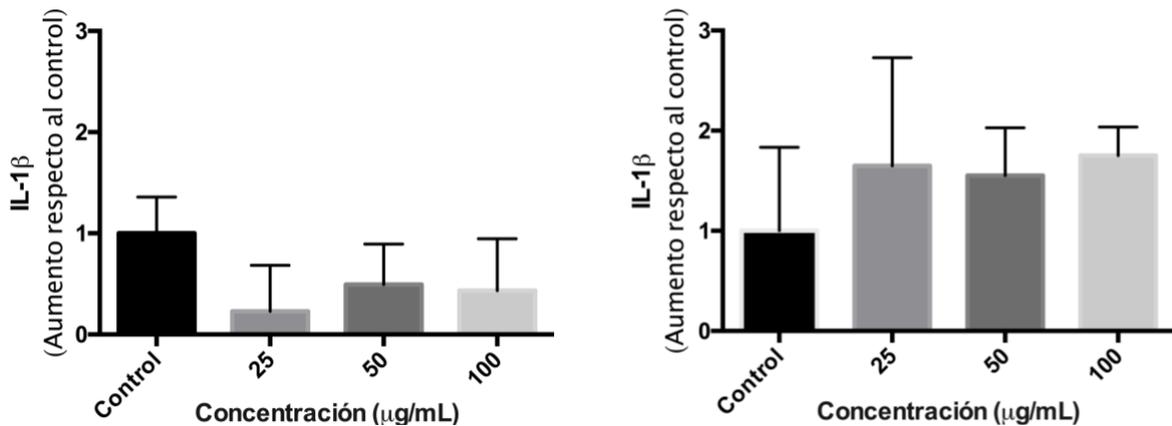
En el caso de la IL-4 (Figuras 21 y 22) y la IL-8 (Figuras 25 y 26), a las concentraciones y tiempos analizados para ambas NP, no se observaron diferencias con respecto a sus controles.

La concentración de IL-6 a 24 y 48 h tras la exposición a TiO<sub>2</sub> mostró un aumento significativo en la concentración de 100 µg/mL (Figura 23). El tratamiento con ZnO mostró sólo un aumento de esta interleucina a 24 h en la concentración de 15 µg/mL (Figura 24).

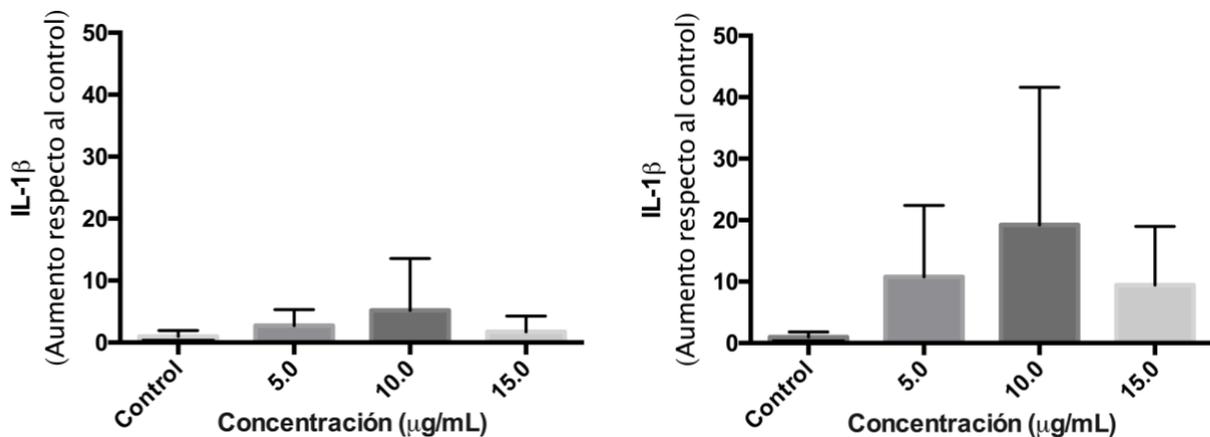
La determinación de la concentración de IL-10 tras el tratamiento de NP de TiO<sub>2</sub>, mostró un aumento significativo a 24 h en las concentraciones de 50 y 100 µg/mL

(Figura 27); mientras que para las muestras expuestas a ZnO, sólo se observó un aumento de esta en la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  a 48 h (Figura 28).

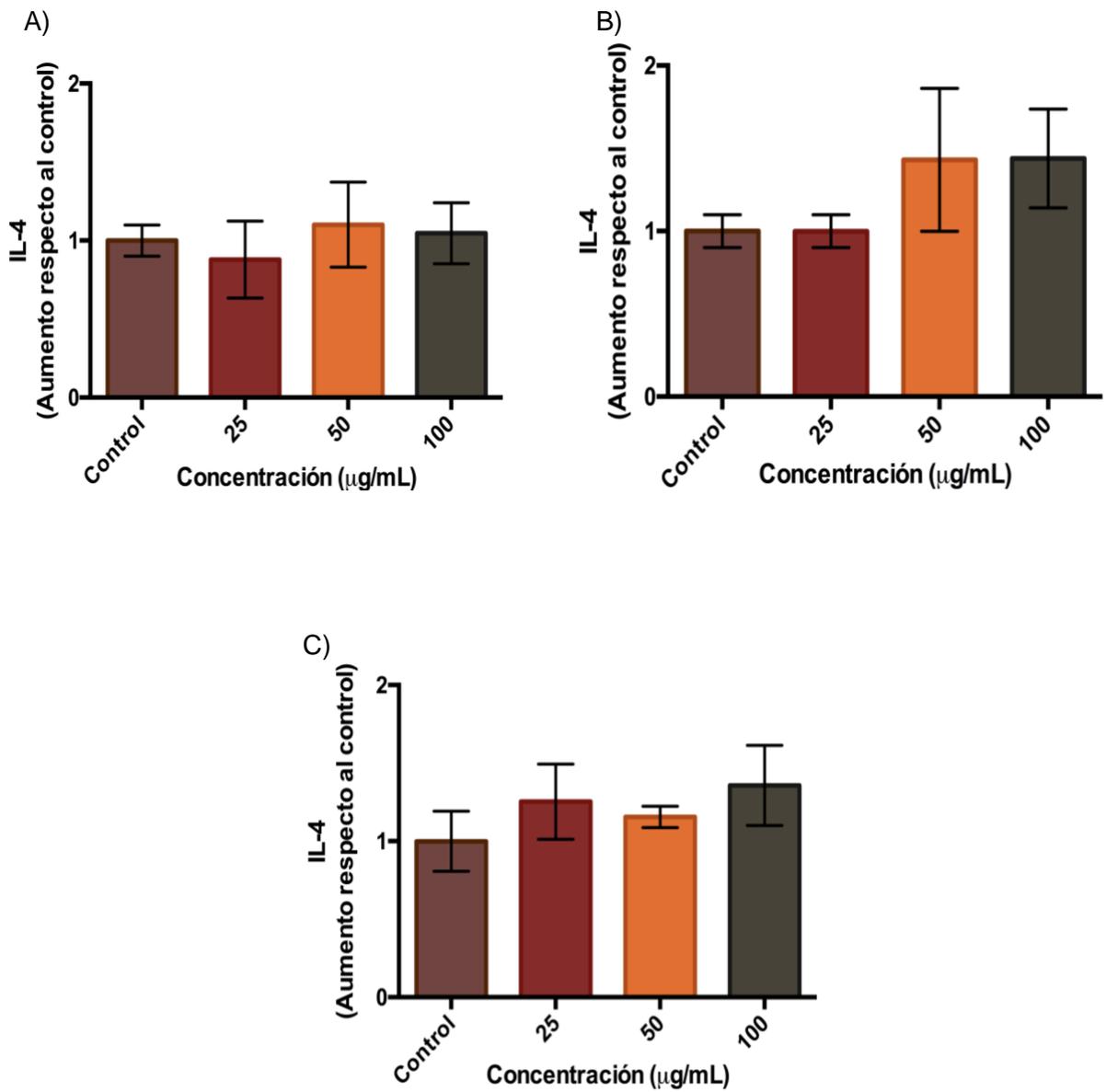
El análisis de TNF- $\alpha$  a 12 h reflejó una disminución significativa en las muestras expuestas a TiO<sub>2</sub>, a 25 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ; posteriormente a 48 horas, se presentó un aumento significativo de esta citocina en todos los tratamientos (Figura 29). La exposición a las NP de ZnO sólo mostró un aumento en las muestras expuestas a 15  $\mu\text{g/mL}$  por 48 h (Figura 30).



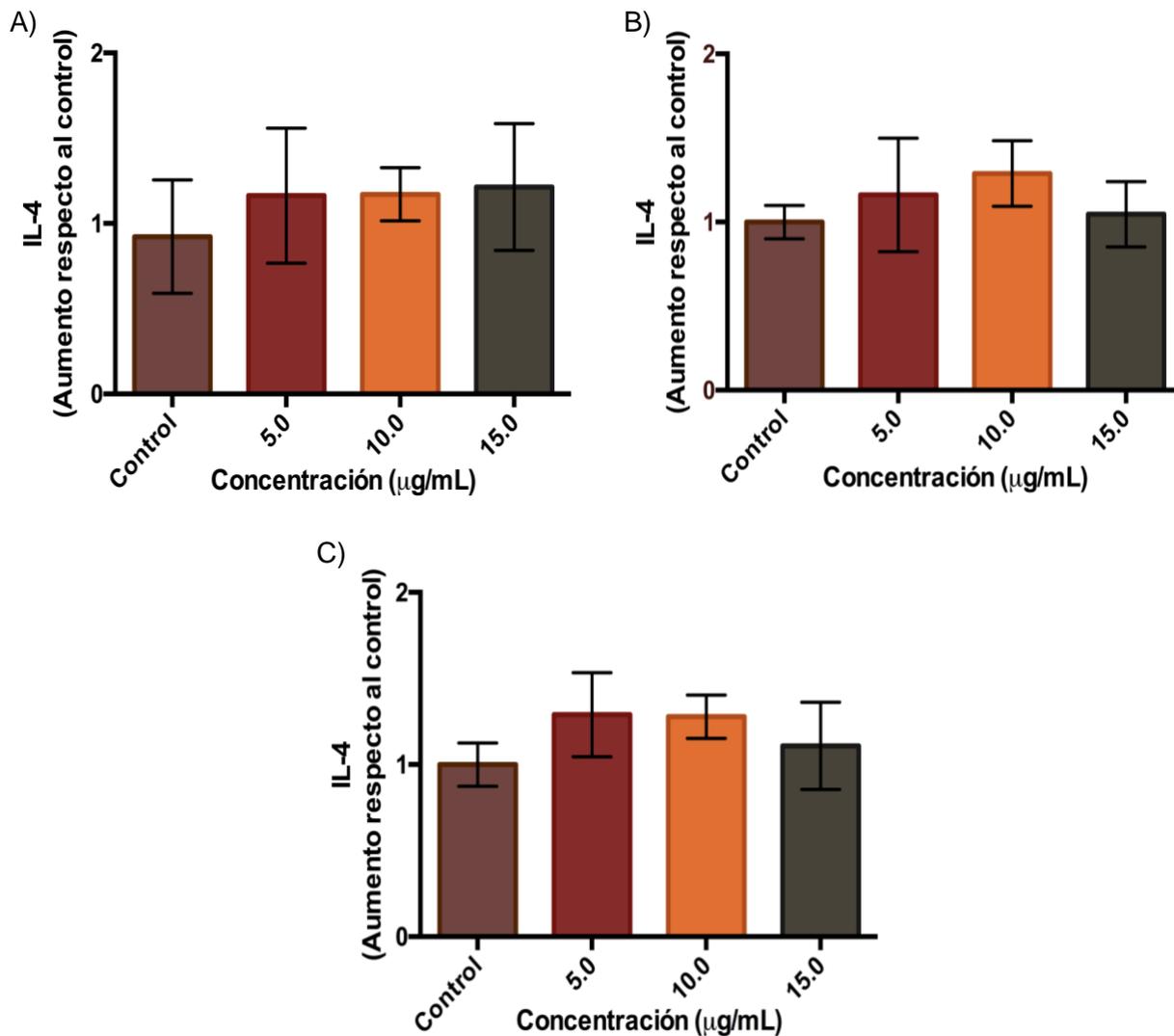
**Figura 19. Cuantificación de la IL-1 $\beta$  después de la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La concentración de la IL-1 $\beta$  se obtuvo después de la exposición a 12 (A) y 48 (B) h. Se muestran la media  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



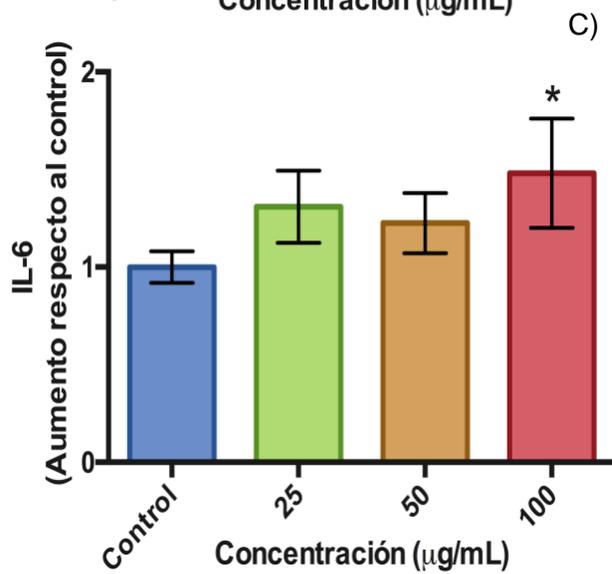
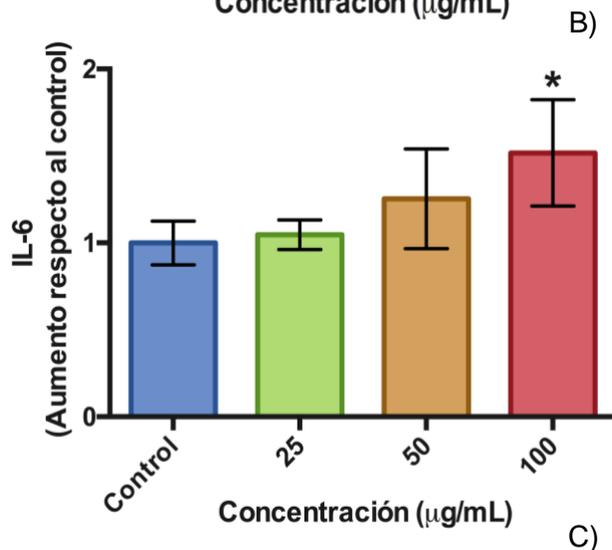
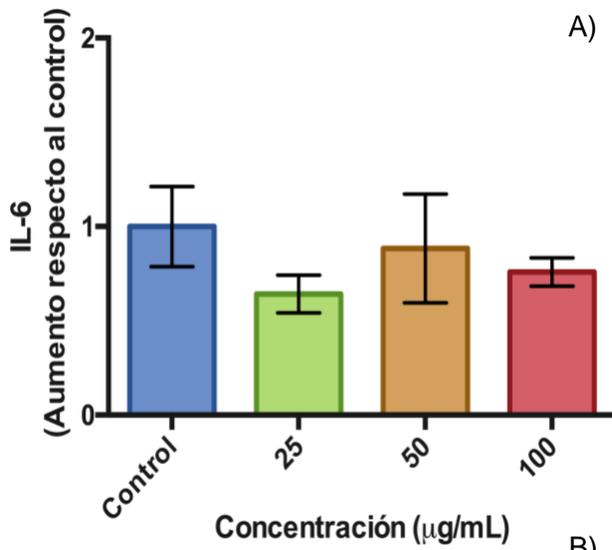
**Figura 20. Cuantificación de la IL-1 $\beta$  después de la exposición a NP de ZnO.** La concentración de la IL-1 $\beta$  se obtuvo después de la exposición a 24 (A) y 48 (B) h. Se muestran la media  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



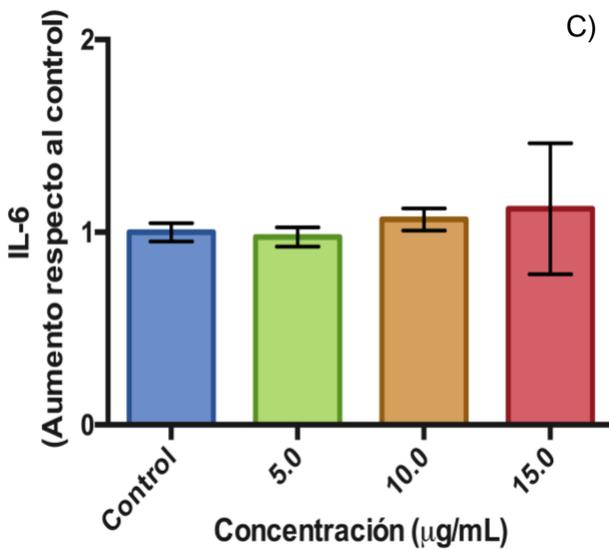
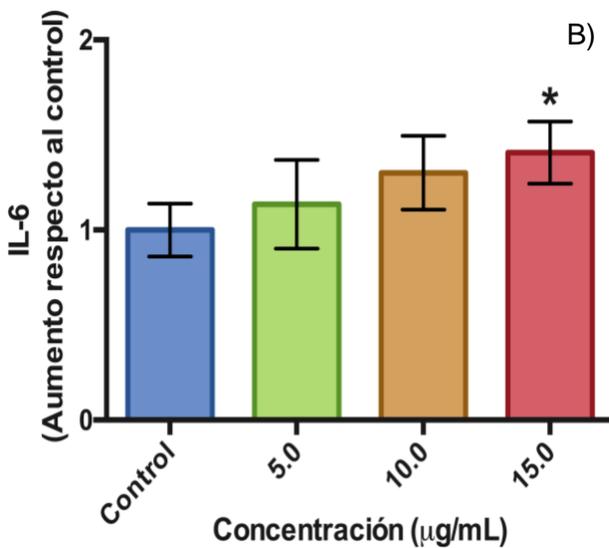
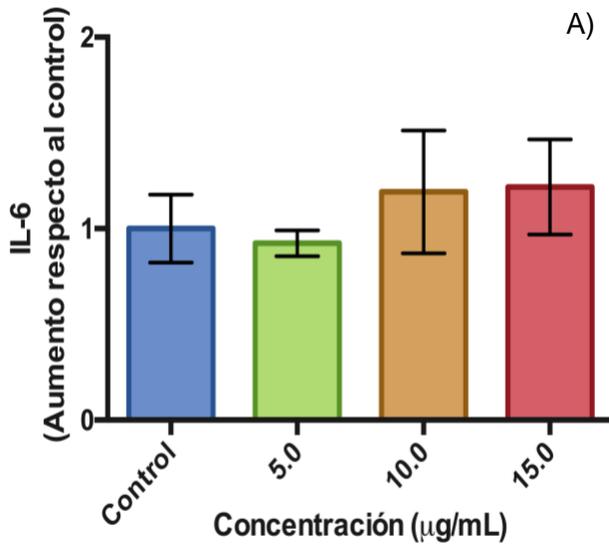
**Figura 21. Cuantificación de la IL-4 posterior a la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La concentración de la IL-4 se obtuvo después de la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



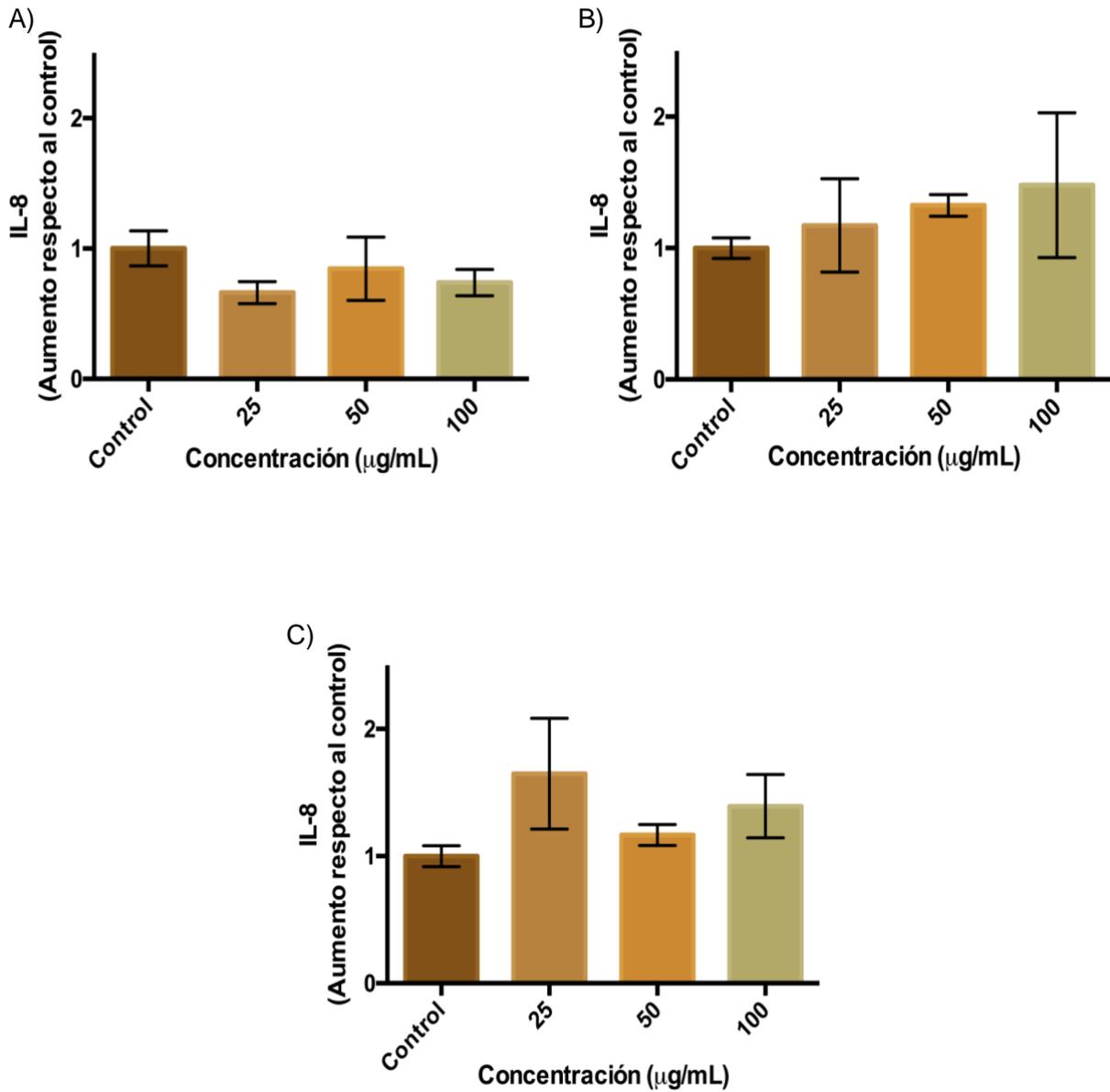
**Figura 22. Cuantificación de la IL-4 posterior a la exposición a NP de ZnO.** La concentración de la IL-4 se obtuvo después de la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



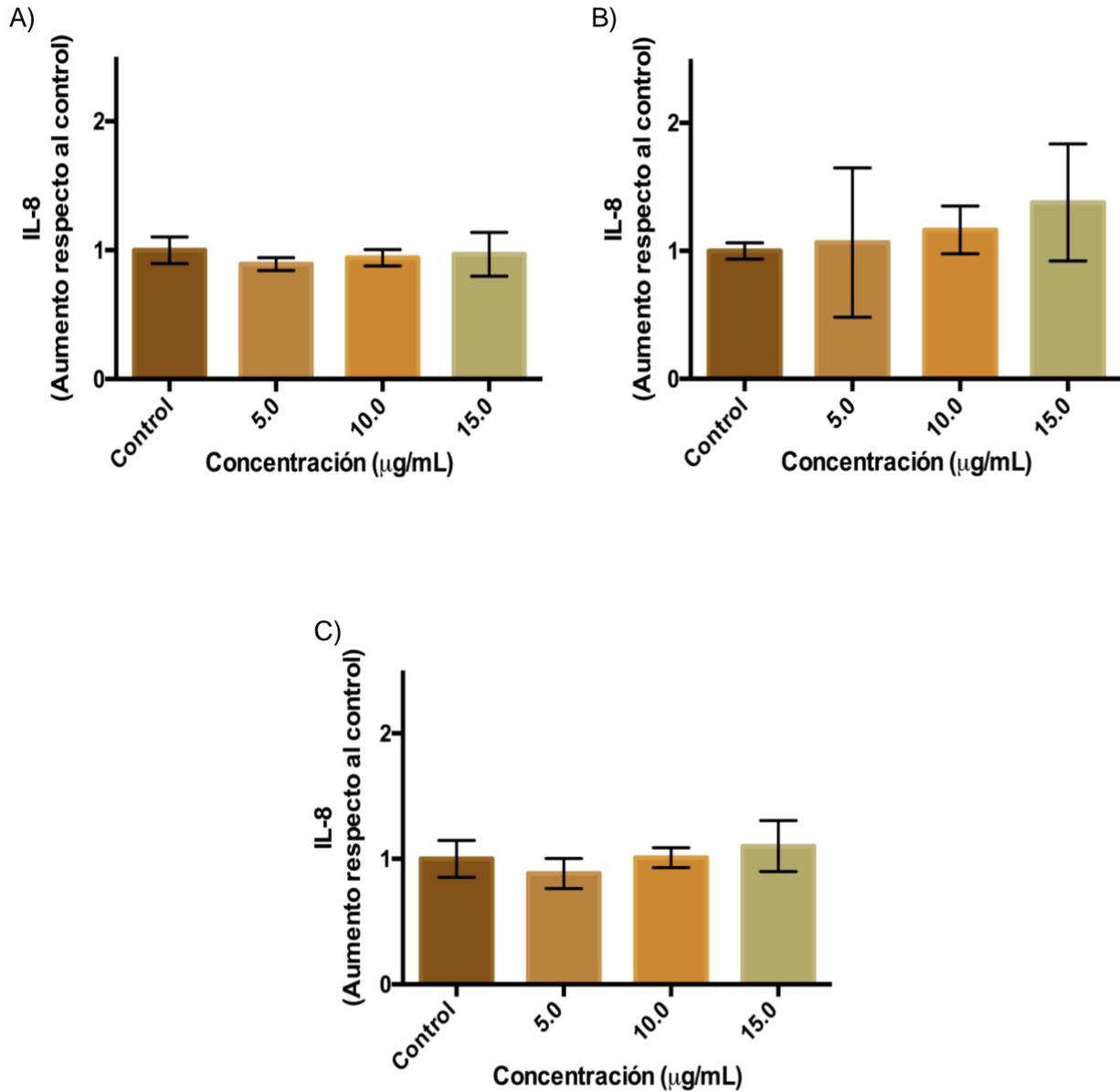
**Figura 23. Cuantificación de la IL-6 posterior a la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La concentración de la IL-6 se obtuvo después de la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media ± DE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



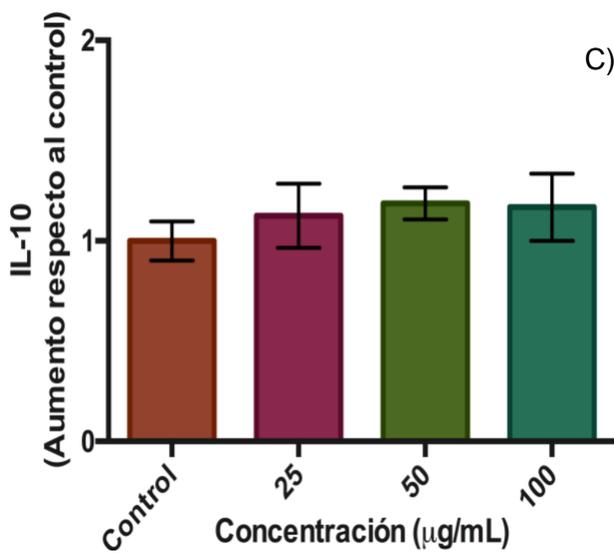
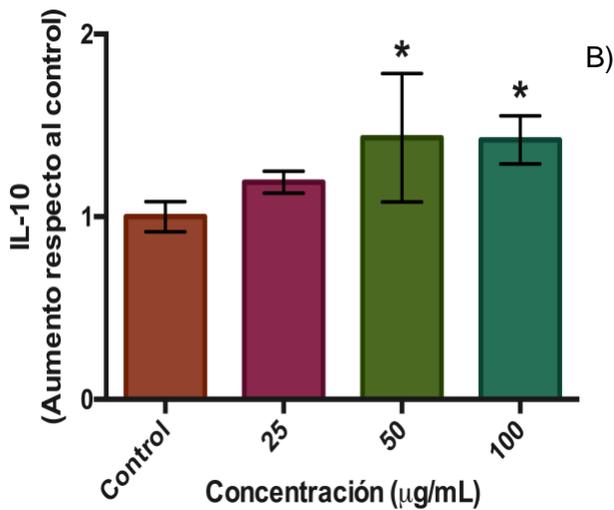
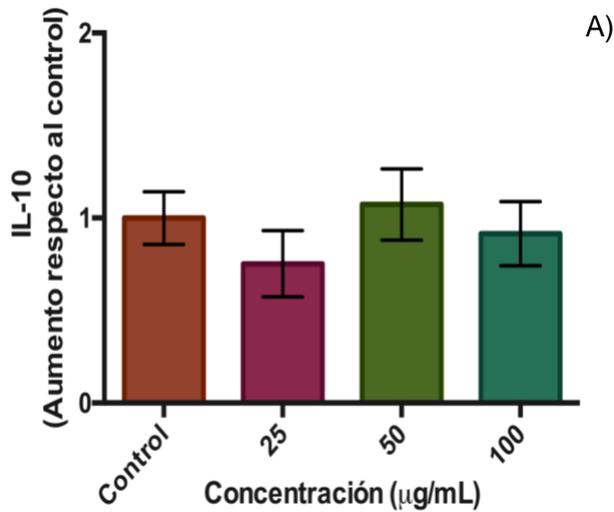
**Figura 24. Cuantificación de la IL-6 posterior a la exposición a NP de ZnO.** La concentración de la IL-6 se obtuvo después de la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



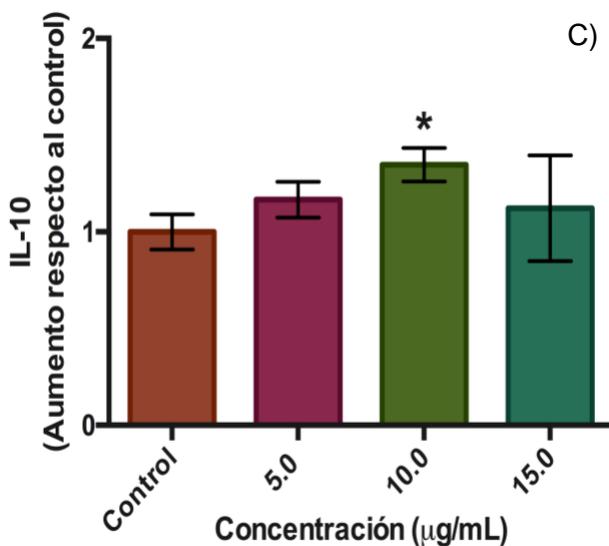
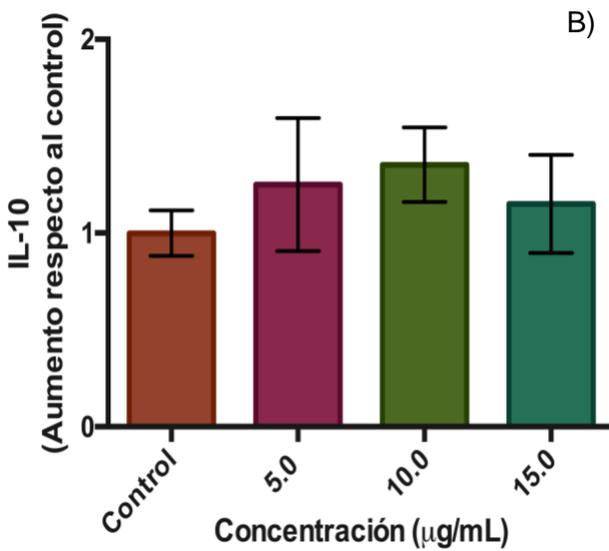
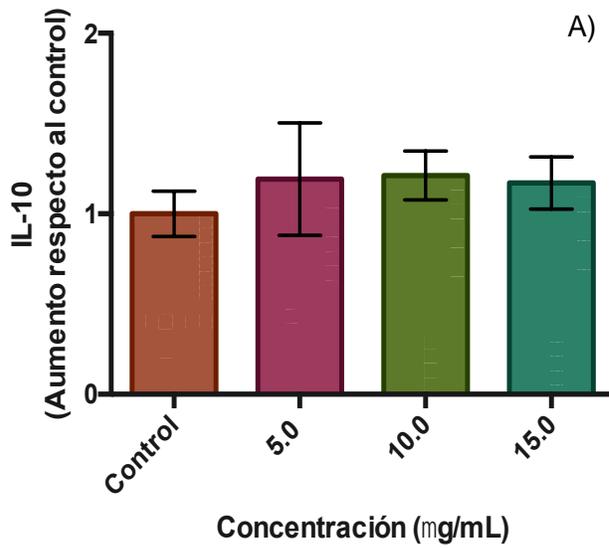
**Figura 25. Cuantificación de la IL-8 posterior a la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La concentración de la IL-8 se obtuvo tras la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



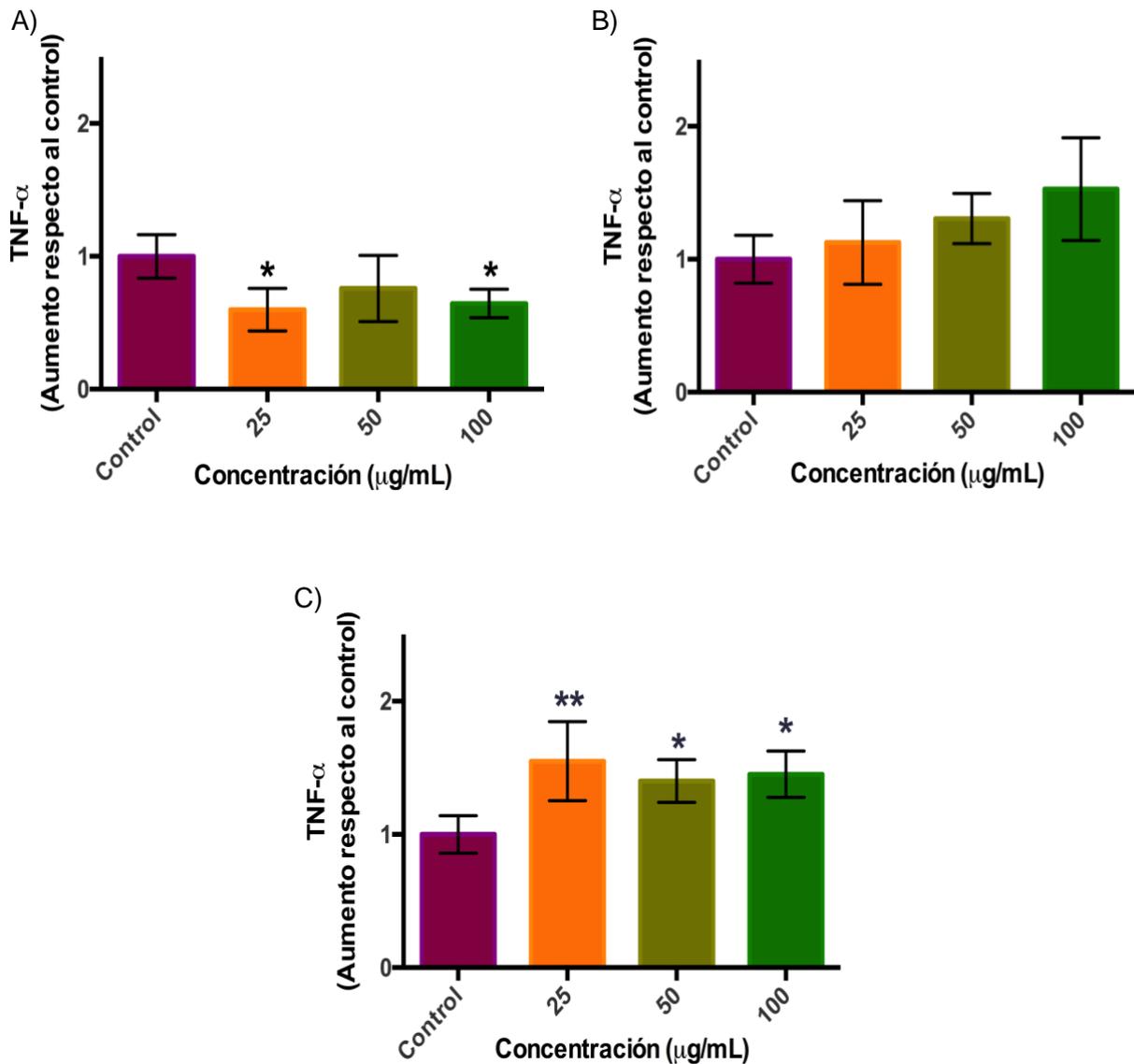
**Figura 26. Cuantificación de la IL-8 posterior a la exposición a NP de ZnO.** La concentración de la IL-8 se obtuvo tras la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



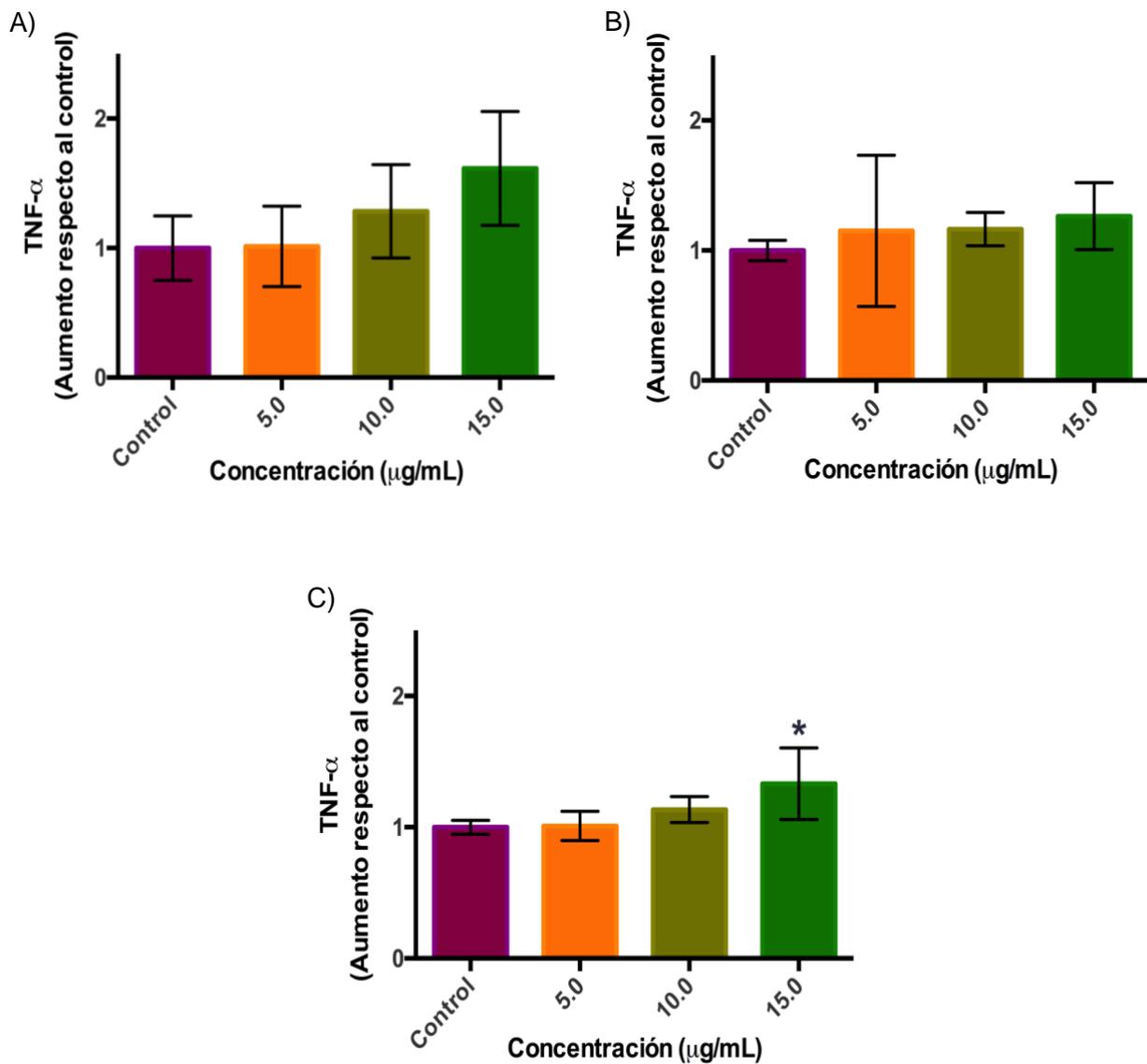
**Figura 27. Cuantificación de la IL-10 posterior a la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La concentración de la IL-10 se obtuvo tras la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media ± DE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



**Figura 28. Cuantificación de la IL-10 posterior a la exposición a NP de ZnO.** La concentración de la IL-10 se obtuvo tras la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



**Figura 29. Cuantificación de la TNF- $\alpha$  posterior a la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La concentración de la TNF- $\alpha$  se obtuvo tras la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



**Figura 30. Cuantificación de la TNF- $\alpha$  posterior a la exposición a NP de ZnO.** La concentración de la TNF- $\alpha$  se obtuvo tras la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por duplicado, cada barra representa la media  $\pm$  DE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

### 3.2.4 Determinación de la concentración de las proteínas del surfactante (SP)

La extracción de proteína de las células A549 se realizó posterior a 12, 24 y 48 h de exposición a estos NM; posterior a esta extracción se llevó a cabo la inmunodetección para determinar la concentración de las proteínas del surfactante. A continuación, se muestran los resultados obtenidos de los ensayos realizados para cada proteína.

Los niveles de la SP-A después de la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> presentó una disminución significativa a las 24 h en las tres concentraciones analizadas (Figura 31 B). En el caso de las NP de ZnO al igual que en el TiO<sub>2</sub> se observó una disminución significativa de esta proteína a las 24 h en las tres concentraciones utilizadas; este efecto se mantuvo a las 48 h siendo significativa en la concentración de 15 µg/mL (Figura 32 B y C).

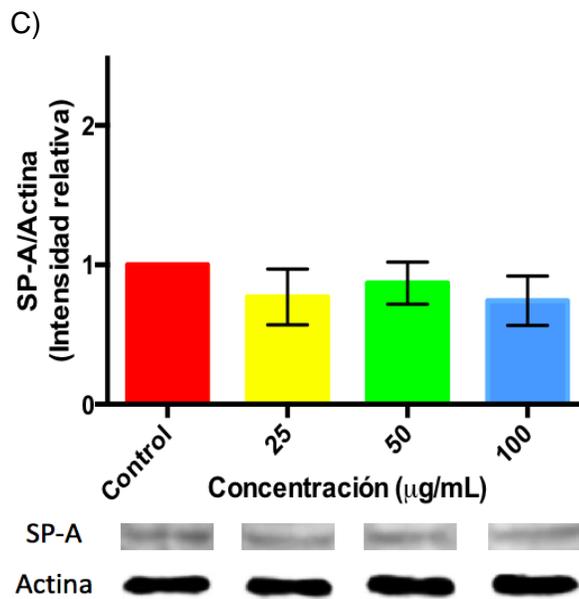
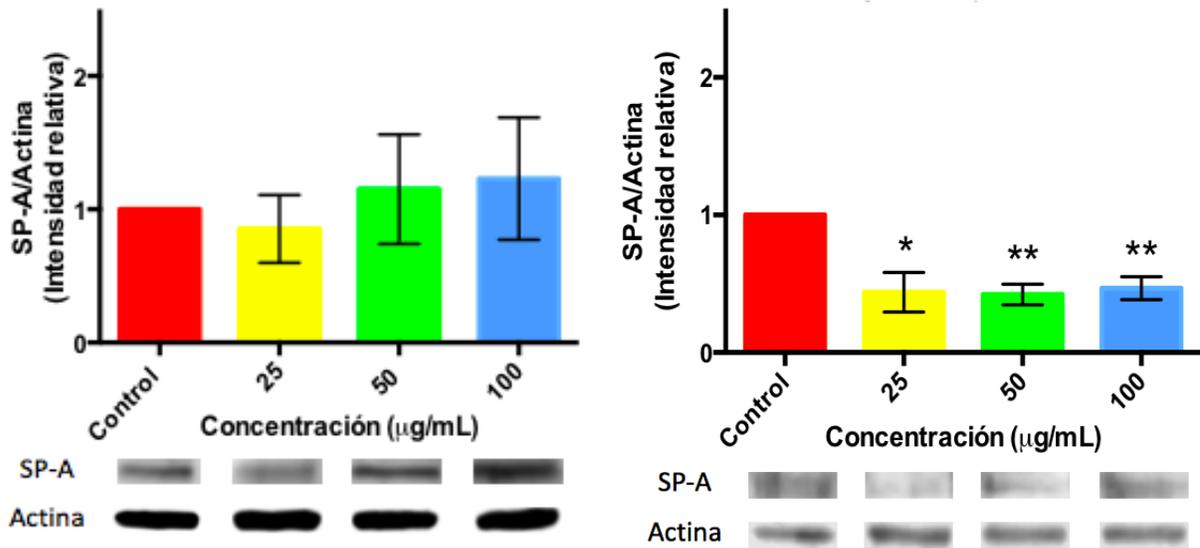
En el caso de la SP-B, la exposición al TiO<sub>2</sub> causó un aumento significativo de esta proteína a las 48 h en la concentración de 50 µg/mL (Figura 33 C). La exposición a las NP de ZnO mostró un aumento significativo de los niveles de SP-B a las 24 h a una concentración de 10 µg/mL (Figura 34 B).

La determinación de los niveles de SP-C no pudo ser realizada debido a problemas con el anticuerpo utilizado para su detección y el tamaño de esta proteína, a pesar de varios intentos y ajustes dentro de la metodología para la obtención de esta proteína, esta no pudo ser detectada por el método empleado.

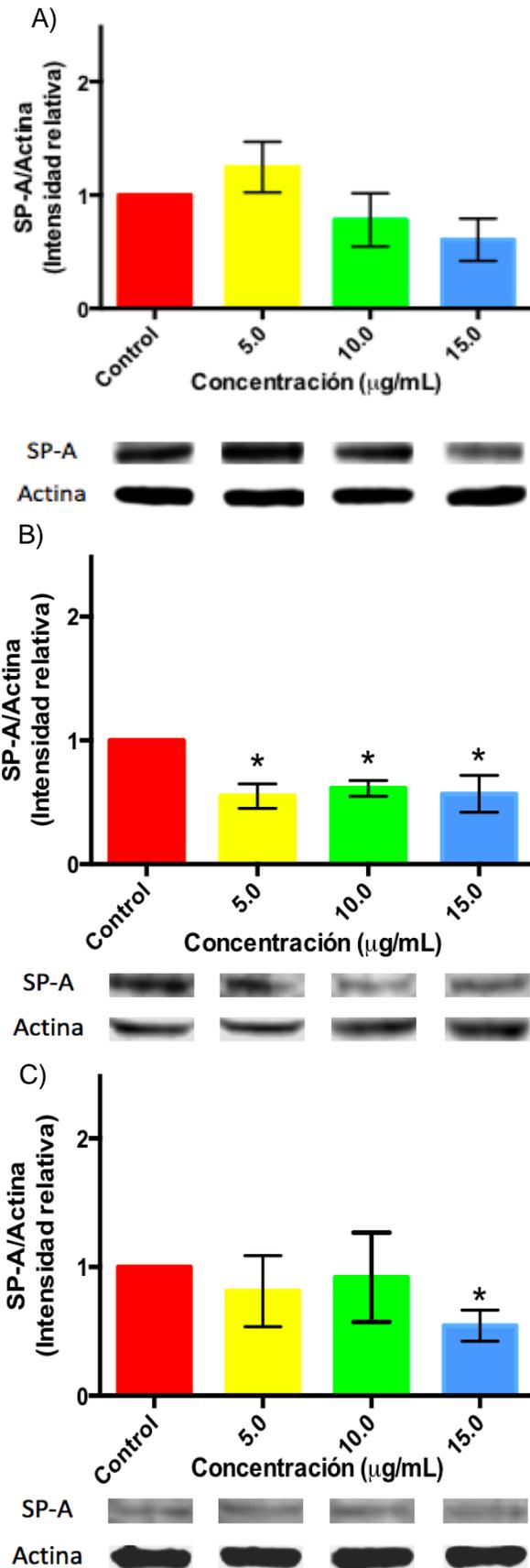
El análisis realizado sobre los niveles de la SP-D tras la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> mostraron un efecto sobre esta proteína hasta las 48 h, donde en la concentración de 100 µg/mL se detectó una disminución significativa de esta proteína (Figura 35 C). La exposición a las NP de ZnO exhibió una disminución de esta proteína en todos los tiempos analizados a la concentración de 10 µg/mL; la concentración de 15 µg/mL presentó una disminución significativa a las 12 y las 24 h de exposición (Figura 36).

A)

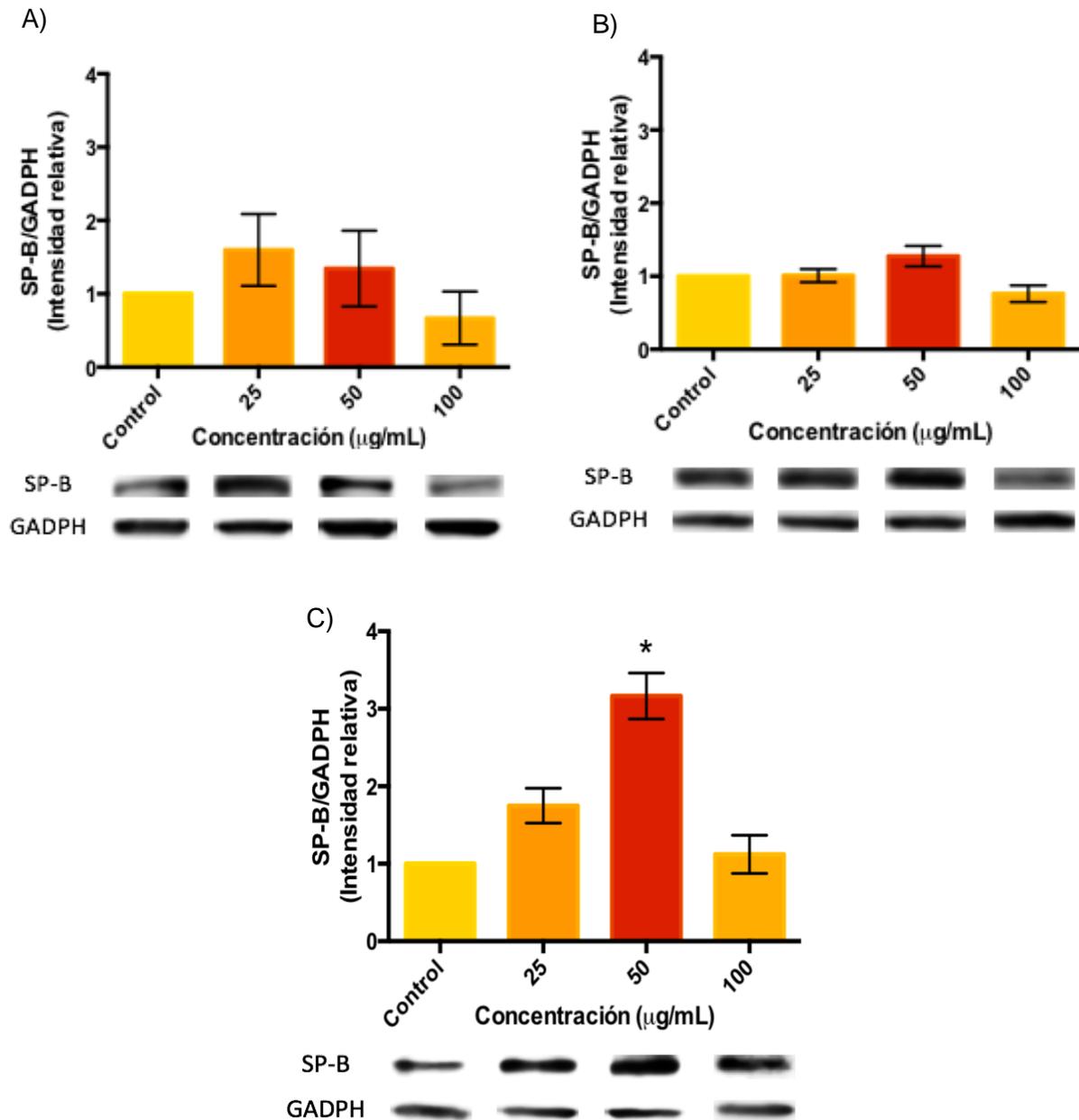
B)



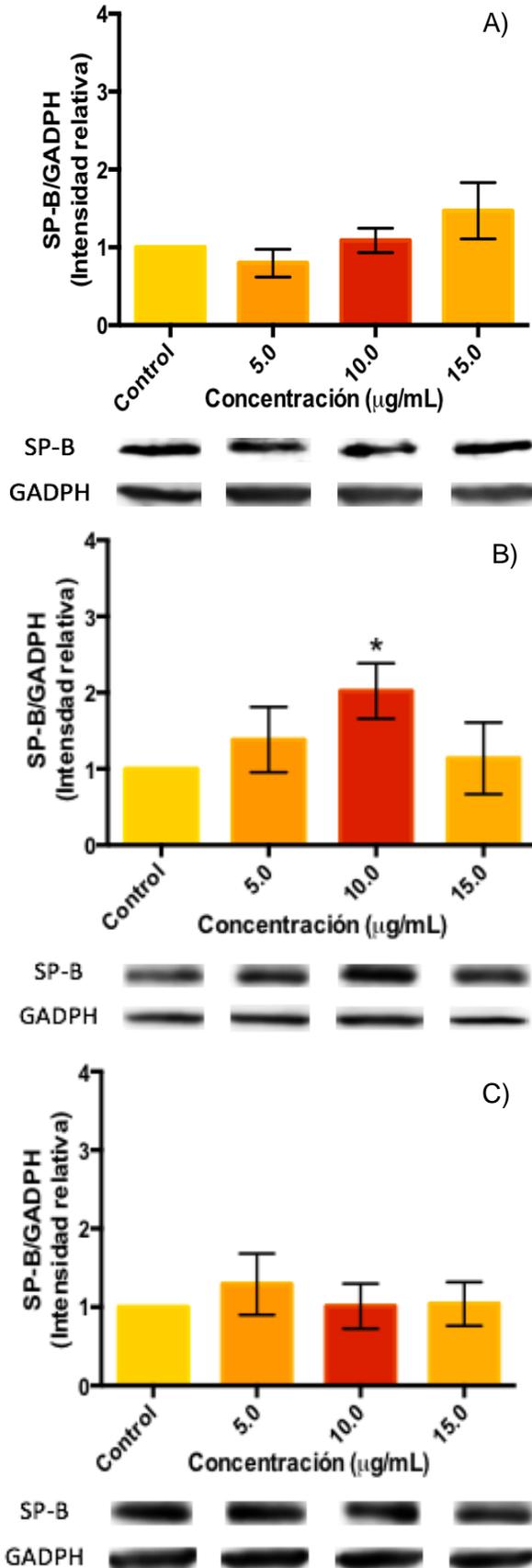
**Figura 31. Concentración de SP-A posterior a la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La determinación de SP-A se realizó posterior a una exposición de 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media  $\pm$  EE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), *t-test*.



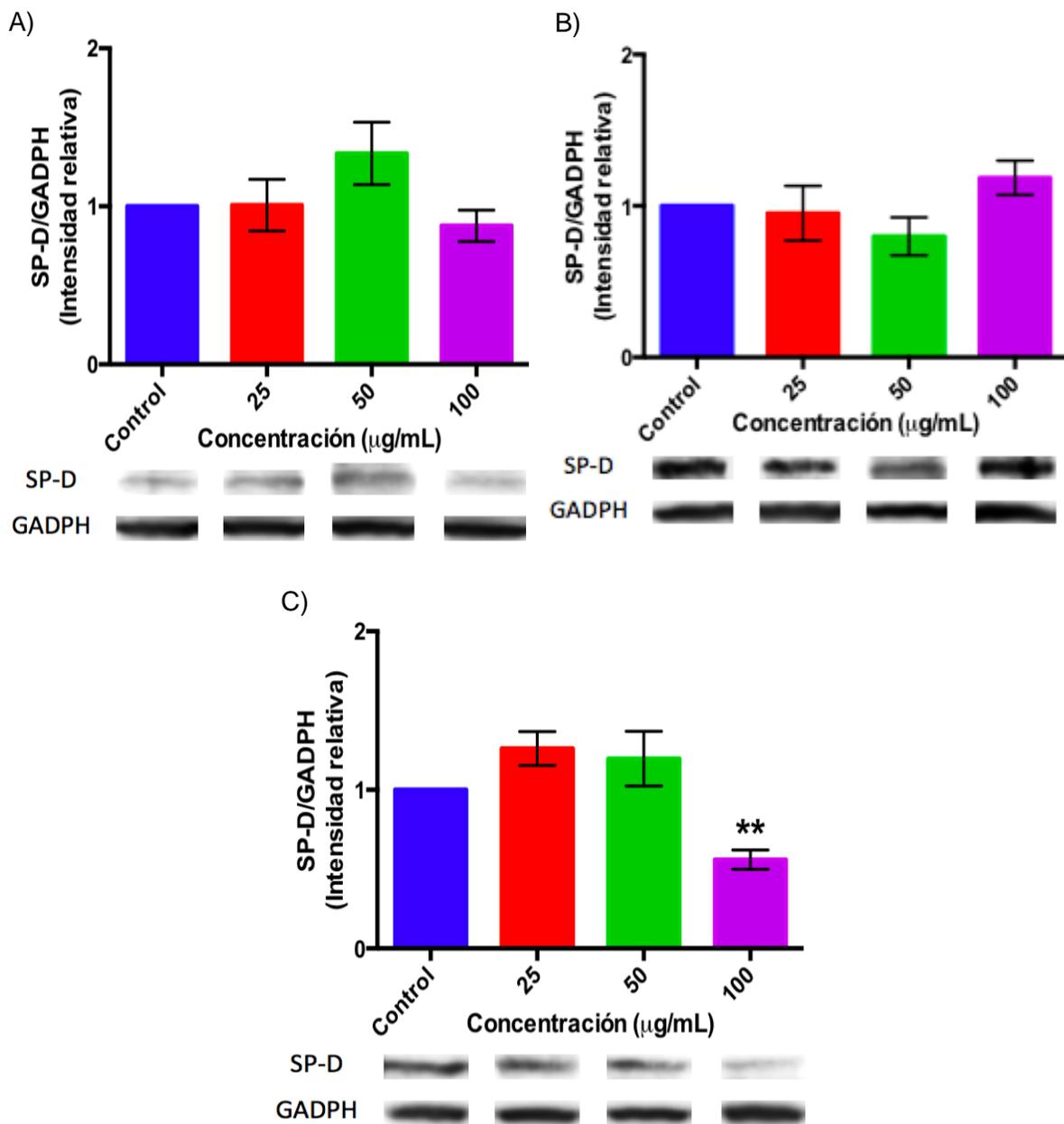
**Figura 32. Concentración de SP-A posterior a la exposición a NP de ZnO.** La determinación de SP-A se realizó posterior a una exposición de 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa  $\pm$  EE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), *t*-test.



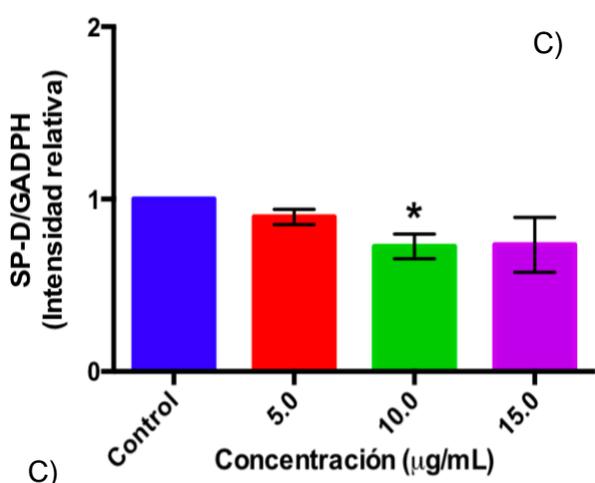
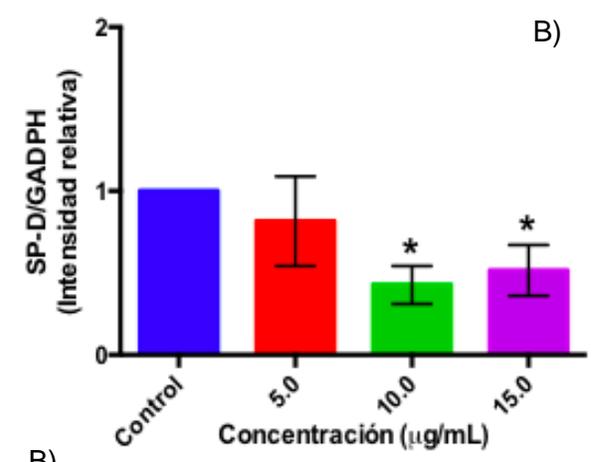
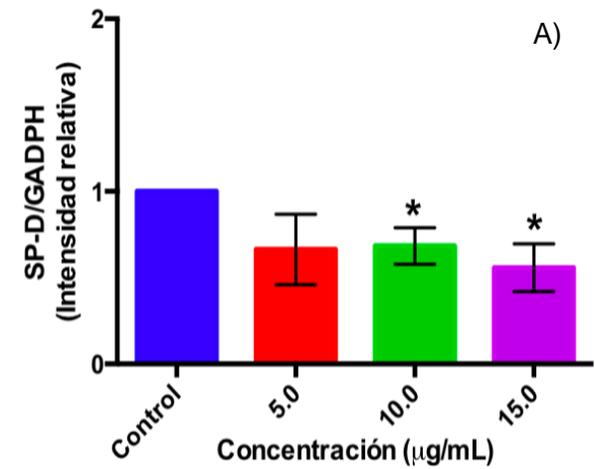
**Figura 33. Concentración de SP-B tras la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La determinación de SP-B se realizó posterior a la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media ± EE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), *t*-test.



**Figura 34. Concentración de SP-B posterior a la exposición a NP de ZnO.** La determinación de SP-B se realizó posterior a la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media  $\pm$  EE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), *t-test*.



**Figura 35. Concentración de SP-D después de la exposición a NP de TiO<sub>2</sub>.** La determinación de SP-D se realizó posterior a la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media ± EE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), *t-test*.



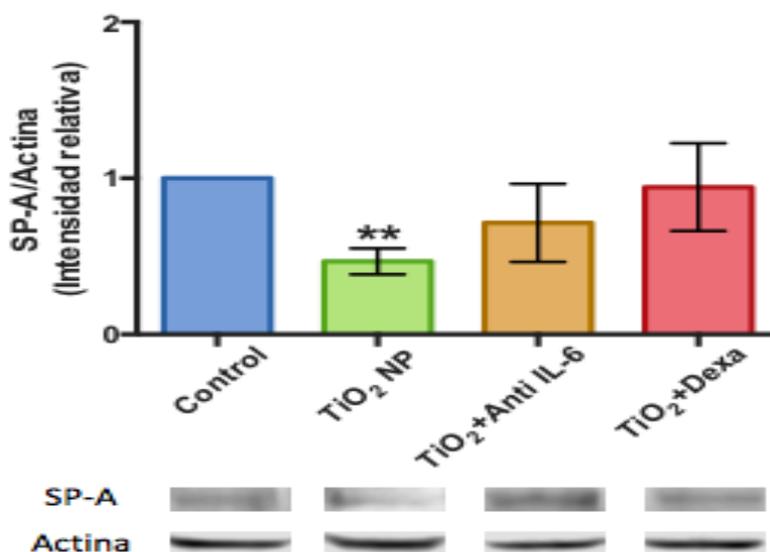
**Figura 36. Concentración de SP-D después de la exposición a NP de ZnO.** La determinación de SP-D se realizó posterior a la exposición a 12 (A), 24 (B) y 48 (C) h. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, cada barra representa la media  $\pm$  EE (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001), *t*-test.

### 3.2.5 Inhibición de la citocina pro-inflamatoria IL-6.

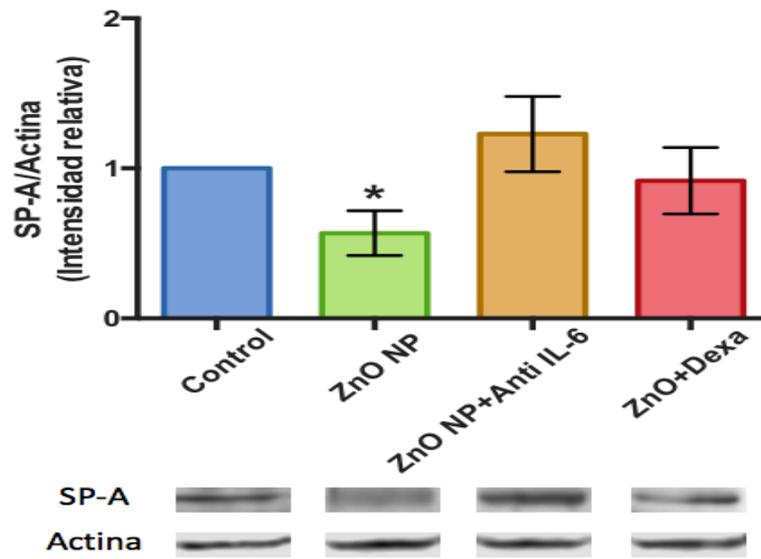
Después de determinar los niveles de las diferentes citocinas elegidas, se decidió llevar a cabo el bloqueo de la IL-6 mediante el uso de un anticuerpo específico contra esta citocina para demostrar su posible participación en la disrupción de la SP-A, este bloqueo se realizó en las concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para  $\text{TiO}_2$  y de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ZnO a 24 horas ambos casos. De esta misma forma, se utilizó dexametasona como control positivo para observar la inhibición total de la respuesta inmune en ambos tratamientos.

Los resultados obtenidos tras la inhibición de la función de la IL-6 mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico para esta citocina mostraron la recuperación de la SP-A hasta sus niveles basales en ambas exposiciones (combinado con las NP de  $\text{TiO}_2$  o ZnO); de la misma forma, este efecto fue observado en el uso de la dexametasona, inhibidor de la respuesta inflamatoria (Figuras 37 y 38).

#### 3.2.5.1 Determinación de SP-A posterior a la inhibición de la IL-6.



**Figura 37. concentración de SP-A posterior a la inhibición de IL-6.** La determinación de SP-A se realizó posterior a la exposición de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP de  $\text{TiO}_2$ , NP de  $\text{TiO}_2$  + anti-IL-6 o NP de  $\text{TiO}_2$  + dexametasona. Los resultados se obtuvieron de 3 experimentos independientes por triplicado, cada barra representa la media  $\pm$  EE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), t-test.



**Figura 38. Concentración de SP-A posterior a la inhibición de IL-6.** La determinación de SP-A se realizó posterior a la exposición de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP de ZnO, NP de ZnO + anti-IL-6 o NP de ZnO + dexametasona. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos diferentes realizados por triplicado, se muestran la media  $\pm$  EE (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ), *t-test*.

#### **4. Discusión.**

En los últimos años el uso de los productos derivados de la nanociencia y la nanotecnología ha ido en aumento en diferentes sectores de la industria. Hasta abril de 2017 el último reporte realizado por la Nanodatabase tenía registrados 3037 productos que contenían NM en su composición de los cuales 12 contienen NP de  $\text{TiO}_2$  y sólo 1 contiene NP de  $\text{ZnO}$  (The Nanodatabase). Este incremento en el uso y la producción de NM ha llevado a una mayor interacción del ser humano con estos materiales, considerando un evento de importancia la exposición por diferentes vías como la inhalatoria, dérmica, oral u ocular (Pietroiusti et al., 2018). La vía de entrada de estos NM al organismo es dependiente de las actividades que se realicen; en el caso del personal dedicado a la síntesis y el embalaje de estos materiales se considera que la inhalación es principal vía de exposición (Shi et al., 2013). Diferentes NM son utilizados en la industria, pudiendo destacar las NP de óxidos metálicos como el  $\text{TiO}_2$  y el  $\text{ZnO}$ , cuya producción destaca por ser de los NM más sintetizados dadas sus características y múltiples usos (Seabra & Durán, 2015). En orden de conocer el efecto de estas NP sobre la viabilidad, la respuesta inflamatoria y los niveles de las proteínas del surfactante, diferentes ensayos fueron realizados para determinar sus posibles efectos toxicológicos en un modelo celular de epitelio alveolar humano y a continuación se presenta el análisis de los hallazgos obtenidos tras esta exposición.

##### **4.1 Caracterización de las NP de $\text{TiO}_2$ y $\text{ZnO}$ .**

La caracterización de las diferentes propiedades fisicoquímicas de los NM dentro del análisis toxicológico es de gran importancia, puesto que, como ya se ha mencionado estas propiedades son las que permiten a estos materiales presentar diferentes características que en algunas áreas pueden ser deseables, pero que, en el caso de las interacciones con organismos biológicos, estas pueden generar diversos efectos adversos (Powers et al., 2012).

Dentro de la toxicología, múltiples técnicas han sido empleadas para la determinación de las propiedades de las NP, sin embargo, la elección de las técnicas adecuadas para determinar estas propiedades depende de diversos factores como el tipo de exposición

a realizar, el o los medios donde estas partículas pueden interactuar entre otras. Basados en este conocimiento, se decidió emplear tres técnicas (la microscopía electrónica de transmisión, la dispersión dinámica de la luz y la velocimetría de laser tipo Doppler), que permitieron determinar algunas de las características de las NP de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$  que fueron empleadas en este estudio.

La técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) nos permitió conocer algunas de las características de estas NP previo a su interacción con el medio biológico. Las NP de  $\text{TiO}_2$  (cómo se muestra en la Figura 8) presentaron un tamaño primario de 22 nm con una forma tetraédrica en la mayor parte de su composición, así como una gran cantidad de aglomerados y una composición elemental de Ti y O. En el caso de las NP de  $\text{ZnO}$ , estas presentaron una morfología hexaédrica, con un tamaño primario promedio de 16 nm, un gran número de aglomeraciones y los elementos Zn y O como principales constituyentes de su composición (Figura 9).

Distintas investigaciones han descrito cómo algunas características como el tamaño, la composición o la forma de las NP pueden influir en la toxicidad de estos NM. Al comparar el efecto producido por NP de  $\text{ZnO}$  con distintas formas (nano-barras o nano-esferas de diferentes tamaños primarios), se observó una mayor toxicidad producida por las nano-barras denotando la importancia de la forma y el tamaño de los materiales en sus efectos biológicos (Luo et al., 2015); la composición de diferentes partículas de óxidos metálicos ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{ZnO}$  y  $\text{Y}_2\text{O}_3$ ) ha demostrado, de manera dependiente a su composición, su capacidad de producir inflamación en células del endotelio vascular (Gojova et al., 2007). El conocimiento de la composición elemental, la forma de las NP, así como su tamaño primario permite conocer un poco acerca del posible comportamiento y la capacidad de estas NP para generar su toxicidad.

A pesar de que el tamaño primario sea considerado en algunos estudios, debido al comportamiento de las NP en los diferentes medios y su capacidad de aglomerarse, es considerado de gran importancia la determinación de ciertas características como el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta que estas partículas presentan en el

medio de exposición para poder asociar su efecto citotóxico directamente a estas propiedades, y destacando las propiedades de aglomeración (Kato et al., 2009). Dada la importancia de estos parámetros, así como de la estabilidad de la dispersión de las NP tanto de TiO<sub>2</sub> como de ZnO en agua y en el medio de exposición (medio de cultivo Ham's F-12), se realizó un protocolo de dispersión de estas NP mediante sonicado, el cual permitió la correcta dispersión de ambos materiales en los medios empleados (como se muestra en la Tabla 6), permitiendo de esta forma conocer las características de las partículas en el medio, así como el mejor tiempo a emplear para su mayor estabilidad y dispersión. Particularmente, las NP de TiO<sub>2</sub> presentaron un diámetro hidrodinámico en agua muy parecido a su tamaño primario (~17 nm) y un potencial zeta de 0.163 mV, estos valores no presentaron una gran diferencia a pesar del tiempo de sonicado utilizado. Liao y colaboradores (2009) determinaron el potencial zeta de diferentes tipos de NP de TiO<sub>2</sub> a diferentes pH y observaron que en el pH cercano a 7, este NP presenta un potencial cercano al cero o negativo, coincidiendo con los valores obtenidos en nuestro análisis. Las NP de ZnO presentaba aglomeraciones, las cuales se pudieron determinar por el aumento del diámetro hidrodinámico (alrededor de los 280 nm en todos los tiempos de sonicado, Tabla 6) de estas comparado con su tamaño primario (16 nm en promedio), y un potencial zeta constante (30.566 mV). Valores similares de diámetro primario y potencial zeta en agua ya habían sido mostrados para las NP de ZnO (Ivask et al., 2015), demostrando cómo estas NP pueden aglomerarse en diferentes medios y una carga positiva en agua, la cual puede verse modificada al entrar en contacto con los diferentes componentes del medio de cultivo.

Posterior a esta caracterización, las suspensiones de NP fueron disueltas en medio de cultivo a una concentración menor al 10% v/v de la suspensión de NP; en donde nuevamente el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta fueron determinados a diferentes temporalidades (Tabla 7), de acuerdo con los tiempos de exposición de estas NP al modelo celular empleado (0, 24 y 48 h). En medio de cultivo, las NP de TiO<sub>2</sub> presentaron un diámetro hidrodinámico alrededor de los 370 nm, el cual no presentó una gran variación con respecto al tiempo; este aumento del diámetro hidrodinámico en el medio puede estar asociado tanto a su carga como a la

composición del medio, los cuales pueden favorecer la interacción de las NP con las proteínas y los otros componentes del medio del cultivo, que pueden llevar a la formación de aglomerados compuestos por las NP, las proteínas del medio, así como el mismo medio encapsulado en estos aglomerados. Este efecto, ha sido observado en diferentes NP, y se considera que el tamaño de los aglomerados puede ser dependiente de la carga de la NP (Kendall et al., 2014). Al analizar la interacción de las NP de ZnO con el medio de cultivo, se observó un incremento en el diámetro hidrodinámico (alrededor de los 370 nm) en comparación con el diámetro observado en agua, sin embargo, al analizar las temporalidades de 24 y 48 horas, una disminución considerable fue observada, llevando a un diámetro hidrodinámico final de 145.3 nm tras las 48 horas en el medio de cultivo. Diferentes investigaciones han determinado la posible solubilidad de las NP de ZnO dependiente del pH del medio así como del tamaño de las partículas (Mudunkotuwa et al., 2012), esta disminución en el tamaño de los aglomerados podría sugerir la posible solubilidad de las NP de ZnO, sin embargo, para poder llegar a esa conclusión, sería necesario realizar más determinaciones como el posible aumento de iones  $Zn^{+2}$  en el medio y el posible cambio de pH en el medio de cultivo.

Distintas investigaciones han relacionado la carga de las NP en el medio con su internalización en las células, donde se ha observado que una carga negativa dificulta la internalización de estas NP, en ocasiones llevando a la disminución de la toxicidad de estas NP (Roy et al., 2014); la determinación del potencial zeta de ambas NP en el medio de cultivo presentó una mínima variación con respecto al tiempo, encontrándose alrededor de -12 mV, este valor negativo podría afectar la internalización de ambas NP, influenciado posiblemente la toxicidad de estas, sin embargo, la integración de esta característica con los ensayos biológicos es necesaria para poder atribuir al potencial zeta este posible efecto.

## **4.2 Exposición *in vitro* a las células A549 con las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO.**

### **4.2.1 Determinación de la viabilidad celular.**

Como ya se ha mencionado, la exposición de los individuos ocupacionalmente expuestos a NP puede darse principalmente por vía inhalatoria. En la búsqueda de un posible efecto sobre los mecanismos celulares producido por las NP en el sistema respiratorio, se implementó el uso de la línea celular de epitelio pulmonar humano A549 como modelo biológico. Lo anterior basado en lo mencionado por diferentes autores, quienes han determinado los efectos generales producidos por los NM, que pueden llevar a la muerte celular (Nel et al., 2009; Oberdörster et al., 2005), se decidió determinar un intervalo de concentraciones de exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO que no presentaran un potencial citotóxico para estas células durante el tiempo de exposición; esto, mediante el análisis de diferentes reportes que de la misma forma que este trabajo utilizaron concentraciones crecientes de estos NM en condiciones muy similares a las nuestras y no observaron un efecto citotóxico importante sobre este modelo (Saptarshi et al., 2015; Tedja et al., 2011; Wang et al., 2015), de esta forma, se estableció un intervalo de concentración de 2.5 a 20 µg/mL y de 25 a 200 µg/mL para las NP de ZnO y TiO<sub>2</sub>, respectivamente.

Para confirmar el hecho de que las concentraciones utilizadas de ambas nanopartículas no generaban daño sobre la viabilidad de estas células, los ensayos de MTS y PI fueron realizados. En los tiempos analizados, las NP de TiO<sub>2</sub> sólo presentaron una disminución en la viabilidad relevante posterior a las 48h en la concentración más elevada, la cual pudo ser observada en la prueba de MTS y PI (Figuras 11 y 13), donde se observó una disminución en el metabolismo de alrededor del 20%, concordando con un aumento en la muerte celular de aproximadamente el 25% de las células. Al comparar las concentraciones utilizadas con las de otros estudios, se ha observado que este tipo de NP pueden o no presentar toxicidad, al usar las mismas concentraciones o concentraciones superiores (hasta 1000 µg/mL) a las nuestras (Biola-Clier et al., 2017; Tedja et al., 2011) dependiendo de las condiciones de tratamiento; el hecho de que exista una disminución del suero fetal bovino en el medio de exposición a las NP, así como el tipo de medio empleado aún

tratándose de la misma línea celular, pueden producir ciertos cambios en los resultados observados sobre la viabilidad de las células. Mucho se ha discutido acerca de la posible actividad antioxidante de el suero en la exposición a las NP, el cual podría enmascarar o disminuir el verdadero efecto y el daño pro-oxidante producido por las NP, es por ello, que debe ser tomado en consideración el uso de las concentraciones de este en los protocolos utilizados para exposiciones a NP. A pesar de que el efecto citotóxico sólo se haya presentado en la máxima concentración empleada, esto es indicativo de que en la exposición a concentraciones inferiores de estas NP no exista un daño en la maquinaria celular, que pueda llegar a desencadenar efectos perjudiciales para la homeostasis de las células.

Los ensayos realizados sobre la exposición a las NP de ZnO presentaron un ligero aumento de la actividad metabólica de las células A549 tras 12 y 24 horas de exposición, sin embargo este aumento no fue biológicamente relevante (Figura 12); en concordancia con lo anterior, el ensayo de PI no mostró un cambio significativo en el porcentaje de células muertas con respecto al control (Figura 14); el incremento del metabolismo registrado, puede hacer solo referencia a la necesidad de las células de una mayor producción de energía y de diferentes macromoléculas (cómo proteínas), para poder contrarrestar el efecto producido por las NP. Otras investigaciones que han trabajado con NP de ZnO cómo la realizada por Ivansk y colaboradores (2015), los cuales determinaron el valor de la IC<sub>50</sub> para las NP de ZnO, el cual mostró que era necesaria una concentración de 22.4 µg/mL de este NM para producir el 50% de la muerte de las células A549; al hacer un comparativo entre las concentraciones utilizadas en nuestro ensayo y la IC<sub>50</sub> reportada en la literatura, se puede observar que nuestras concentraciones son inferiores a lo reportado, comprobando así que las concentraciones empleadas de las NP de ZnO no presentan un riesgo citotóxico para el modelo celular utilizado.

#### **4.2.2 Determinación de la generación intracelular de ROS**

Uno de los principales mecanismos de daño con los cuales se asocia a las NP en general es la producción de especies reactivas de oxígeno dadas distintas características de estas partículas cómo su capacidad catalítica, la liberación de iones

metálicos, su oxido-reducción, la producción de reacciones tipo Fenton entre otras que pueden desencadenar un proceso oxidante dentro de los modelos biológicos (Auffan et al., 2009). Con base en las características tanto del TiO<sub>2</sub> y del ZnO como agentes catalíticos, pero también con la capacidad de liberar iones Zn<sup>+2</sup> al medio circundante (Zhuang & Hanagata, 2012), se determinó la generación intracelular de dos especies reactivas de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mediante el uso de fluorocromos específicos para estas especies. La determinación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> dio como resultado el aumento de ambas especies desde las 3 horas de exposición a este material y hasta las 24 horas que se realizó esta determinación (Figuras 15 y 17). Este efecto de producción de ROS ha sido reportado anteriormente, donde Andersson y colaboradores (2011), mostraron la capacidad de las NP de TiO<sub>2</sub> conocidas como P25 (80% anatasa, 20% rutilo) para producir O<sub>2</sub><sup>-</sup> comparado con otras NP de TiO<sub>2</sub> con distinta morfología; de la misma forma se ha reportado que este tipo de NP (P25) presenta una capacidad para producir especies reactivas a diferentes temporalidades (Ekstrand-Hammarström et al., 2012); nuestros resultados presentaron esta misma tendencia a la producción constante de especies reactivas, puesto que, como se muestra en las Figuras 15 y 17 las NP de TiO<sub>2</sub> produjeron ambas especies reactivas durante los tiempos analizados, esto dado por la capacidad catalítica que se atribuye a esta mezcla particular de NP de TiO<sub>2</sub>, destacando el hecho de que el material empleado en nuestra investigación coincide con las características de los materiales utilizados otras investigaciones. El estudio de otras formas (anatasa o rutilo) de NP de TiO<sub>2</sub> han mostrado que a pesar de producir especies reactivas, es necesario el uso de una mayor concentración de NP para producir las ROS (Aueviriyavit et al., 2012); de esta misma manera, modelos *in vivo* han mostrado los diferentes efectos que pueden ser producidos por las diferentes estructuras de las NP de TiO<sub>2</sub> (anatasa, rutilo, anatasa/rutilo), donde se han atribuido otros efectos como la inflamación y la inducción de diferentes genes, los cuales también pueden ser dependientes de la forma, del tamaño y de las modificaciones en la superficie de las NP (recubrimiento hidrofílico o hidrofóbico) empleadas, es de esta forma, como se puede comprobar que las características físico-químicas de las NP y sus mezclas pueden impactar sobre los efectos biológicos producidos, como es el caso de la generación intracelular de ROS,

dado precisamente, por la capacidad catalítica que puede presentar particularmente la mezcla P25.

A diferencia de los efectos observados en las NP de TiO<sub>2</sub>, las NP de ZnO mostraron una mucho menor producción de ROS en los tiempos analizados, estas NP sólo presentaron un aumento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en las concentraciones superiores de ZnO posterior a 3 horas de exposición, mientras que no se detectó un cambio significativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ninguna de las temporalidades analizadas (figuras 16 y 18). He y colaboradores (2017) observaron este mismo efecto en la cuantificación del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, dónde después de 24 h de exposición a estas NP en condiciones muy similares a las empleadas en este trabajo, la concentración de este anión no se vio incrementada con respecto al control, estos hallazgos sugieren que los posibles efectos tóxicos de estas NP no estén directamente asociados a la producción de ROS, sino posiblemente a otros efectos como la liberación de iones Zn<sup>+2</sup> en el modelo biológico.

#### **4.2.3 Cuantificación de citocinas.**

Nel y colaboradores (2006) en su estudio acerca de los mecanismos de toxicidad de las NP hacen mención de la posible activación de diferentes vías de señalización debido al aumento en la producción de ROS en las diferentes líneas celulares. Se ha observado, que este aumento de la producción de ROS es capaz de activar la vía de NF-κB (Lu et al., 2014), la cual puede llevar a la producción de un efecto inflamatorio sobre las células. Siguiendo los mecanismos anteriores, y una vez determinada la producción de ROS por ambos NM, se procedió a la determinación de los niveles de ciertas citocinas tanto pro como anti inflamatorias.

El análisis de las citocinas tras la exposición a TiO<sub>2</sub> reveló un aumento de la IL-6, la TNF-α y la IL-10 en la concentración más alta empleada para este ensayo a diferentes tiempos (Figuras 23, 27 y 29). Diferentes investigaciones han determinado el efecto inflamatorio de estas NP, un estudio observó el incremento de IL-6 tras 2 h de exposición, pero no un efecto sobre IL-8 o TNF-α (Ursini et al., 2014), mientras que Ekstrand y colaboradores (2012) reportaron el incremento de IL-6 e IL-8 posterior a 24

h de exposición a las NP de TiO<sub>2</sub>; hasta el momento, no se ha reportado el incremento sobre la IL-10 tras la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub>; el incremento principalmente de la IL-6 así como de TNF- $\alpha$ , confirman el efecto sobre la respuesta inflamatoria causada por la exposición a estos NM, la cual podría llevar a diferentes efectos en las células, sin embargo, la presencia de la IL-10 a 24 horas, muestra una posible regulación de ambas citocinas, puesto que esta interleucina es una inhibidora directa tanto de IL-6 como de TNF- $\alpha$ , lo que podría estar indicando una posible disminución de los efectos inflamatorios producidos por estas NP.

La determinación de la producción de citocinas tras la exposición a las NP de ZnO mostró un aumento de la IL-6 en la exposición a 15  $\mu$ g/mL tras 24 h de exposición (figura 24 B); el aumento de la TNF- $\alpha$  a 15  $\mu$ g/mL tras 48 h de exposición (figura 30 C); y el incremento de IL-10 tras 48 h de exposición en la concentración de 10  $\mu$ g/mL (figura 28 C). Generalmente, las NP de ZnO se han visto asociadas al incremento en los niveles tanto del RNAm como de la proteína de la IL-8 a 4, 6 y 24 h de exposición a estos NM (Cho et al., 2012; Saptarshi et al., 2015), sin embargo, en el caso de nuestra investigación, se observó el aumento de IL-6 y TNF- $\alpha$ , las cuales están principalmente asociadas a una respuesta inflamatoria, así como un aumento de la IL-10, citocina antiinflamatoria que se encarga de regular los efectos de las dos anteriores.

La presencia de la IL-10 durante y después del aumento de la IL-6 y TNF- $\alpha$ , sugiere la inhibición de estas citocinas y con ello la posible disminución de la inflamación por ser un inhibidor de ambas citocinas proinflamatorias, pero también, su presencia habla de una posible respuesta Th2 por parte de las células en busca de combatir a un posible agente extracelular (Filella et al., 2003), las NP de TiO<sub>2</sub> o de ZnO.

Los efectos sobre la inducción de las citocinas pro-inflamatorias tras la exposición a las NP, generalmente se han visto asociados al proceso inflamatorio producido en primera entrada por la respuesta inmune innata (Petarca et al., 2015); diferentes investigaciones tanto *in vitro* cómo *in vivo*, han mostrado que dependiendo del tipo de

NP la generación de distintas citocinas puede llevar a la producción del inflamosoma, a una inflamación crónica que se han asociado hasta enfermedades inmunes (Petrarca et al., 2015). En el caso de esta investigación, ambas NP presentaron el incremento de IL-6 y TNF- $\alpha$ , que han sido asociadas a la diferenciación de células inmunes así como a la activación de células fagocíticas (Turner et al., 2014), este hecho podría conllevar por lo tanto a una segunda fase de la respuesta inmune, la cual de tratarse de un sistema biológico más complejo podría llevar a una respuesta inmune adaptativa, donde la participación de la IL-10, otra de las citocinas detectadas en nuestro modelo podría estar actuando en un proceso de regulación (por ser una citocina anti-inflamatoria) al inhibir a IL-6 y TNF- $\alpha$ , pero también, esta citocina es capaz de dirigir la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th2. La producción de citocinas tras la exposición a las NP es muy variada, y dependiendo del tipo de citocinas producidas y el modelo biológico empleado, estas pueden llevar a una respuesta inmune adquirida distinta (Rahman et al., 2017). Es por ello, que el análisis de las citocinas producidas por la exposición a las NP es esencial, puesto que este, permitirá conocer la respuesta inmune que estas NP pueden llegar a desencadenar; a pesar de que en nuestro caso, ambas NP hayan llevado a la producción de las mismas citocinas, el tiempo en el que estas se produjeron y las concentraciones de estas citocinas, pueden llevar a desencadenar respuestas distintas a largo plazo dentro del epitelio alveolar, hecho que debe ser tomado en cuenta para la toxicidad específica de cada NP.

#### **4.2.4 Determinación de la concentración de las proteínas del surfactante (SP)**

Los principales efectos atribuidos a las NP como son la generación de ROS, la respuesta inflamatoria y la muerte celular, han sido caracterizados para un gran número de NM y particularmente, este trabajo lo ha hecho con las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO. Los resultados que se han mostrado hasta ahora, prueban que a pesar de no existir la muerte de las células A549 tras la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> o de ZnO, se ha presentado una disrupción en las células por la interacción con las NP; la literatura hasta el momento menciona el efecto provocado por estas NP en macromoléculas

cómo el ADN y algunas proteínas de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B o MAP cinasas, así cómo el daño en ciertos organelos como la mitocondria y el retículo endoplásmico, entre otros (Cho et al., 2012; Wang et al., 2015; Zhuang y Hanagata, 2012); sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el posible efecto que las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO puedan producir sobre las proteínas del surfactante. Se ha asociado el incremento de las citocinas pro-inflamatorias a la disrupción de las proteínas del surfactante (Whitsett y Glasser, 1998), a pesar de ello, la asociación entre la liberación de citocinas pro-inflamatorias por la exposición a las NP y estas proteínas no ha sido realizada. Con base en lo anterior, se realizó la determinación de los niveles de las SP (SP-A, SP-B y SP-D) tras la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> o de ZnO.

Los resultados obtenidos de la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> mostraron una disminución de SP-A (Figura 31), un aumento de la SP-B (Figura 33) y una disminución de la SP-D (Figura 35). Estos mismos resultados se presentaron en la exposición a las NP de ZnO, destacándose el hecho de que los resultados aparecieron en tiempos más cortos para esta NP (Figuras 32, 34 y 36).

El efecto sobre las proteínas del surfactante en la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO es muy similar, partiendo del hecho de que tanto SP-A como SP-D se vieron disminuidas y SP-B mostró un aumento en ambas exposiciones, sin embargo, en el caso de la exposición a las NP de ZnO, el efecto sobre las SP parece presentarse a en tiempos más cortos (desde las 12 h), y mantenerse a lo largo del tiempo (la disminución de SP-A y SP-D en todos los tiempos analizados).

La disminución de la SP-A y de SP-D puede estar asociada a diferentes factores. Uno de ellos es la posible interacción de las proteínas del surfactante pulmonar con las NP. Se ha observado que dependiendo del tipo de NP de óxido metálico, la SP-A puede formar parte del recubrimiento de estas NP en distintas proporciones (Schulze et al., 2011), la determinación de la corona de proteínas del surfactante pulmonar sobre distintas NP (recubiertas de PEG, PLGA o lípidos), realizada por Raesch y colaboradores (2015) mostraron que tanto SP-D cómo SP-A se encuentran dentro de

esta corona en distintas proporciones dependiendo del tipo de NP. De esta forma haciendo notar que tanto SP-A como SP-D pueden encontrarse adheridas a las NP de TiO<sub>2</sub> o de ZnO, y comenzar a disminuir su concentración dentro de la capa del surfactante formada por las células A549. Es importante recordar, que esta posible unión de SP-A y SP-D a las NP puede estar dada por su función en la respuesta inmune innata, donde ambas proteínas se encargan de opsonizar a los patógenos presentes dentro del surfactante (Pérez-Gil, 2008), para poder ser identificados y destruidos por las células inmunes.

Otro de los efectos observado por la interacción de la SP-A con las NP es la facilidad de esta proteína para generar o disgregar aglomerados de NP dependiente de su carga, donde las NP con carga positiva pueden disminuir su diámetro y aquellas con carga neutra formar aglomerados de mayor tamaño (McKenzie et al., 2015), el posible cambio en el tamaño de los aglomerados de nuestras NP puede llevar a favorecer el depósito y la interacción de las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO con la superficie del cultivo celular. Se ha sugerido que la presencia de SP-D puede favorecer la internalización de diferentes NP en las células A549 (Kendall et al., 2013); por tanto, si las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO se encuentran recubiertas con la SP-A y la SP-D, el depósito y la ingesta de estos NM se verán favorecidos, pudiendo desencadenar de manera más rápida sus efectos tóxicos sobre estas células.

De igual forma, la interacción entre la SP-A, la SP-D y las NP, cómo se ha observado en los aglomerados de surfactante pulmonar; se presentaría una disminución de estas proteínas en la interface agua/aire favoreciendo su síntesis; sin embargo, el aumento de las citocinas pro-inflamatorias ha mostrado ser un factor importante en la disminución de la síntesis de SP-A y SP-D, particularmente se ha asociado el aumento de la IL-6 con la disminución de la síntesis de SP-A (Doumanov et al., 2014). El ensayo de la determinación de las citocinas realizado en este trabajo mostró un aumento tanto de IL-6 como TNF- $\alpha$ , llevando entonces a una disminución en la síntesis de *novo* de SP-A y posiblemente de SP-D. La disminución en la síntesis y el secuestro de estas proteínas por las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO llevarían a los efectos observados en nuestros experimentos; donde se podría pensar que el proceso de recaptura y reciclaje de las

SP se vería afectado por no poder disponer de las proteínas del surfactante dada su unión a las NP.

Igualmente, es importante considerar el daño que la interacción de las NP con las SP pudiera llegar a producir, puesto que se sabe que la interacción entre las NP y las macromoléculas puede llevar a cambios en su estructura y a la posible pérdida de su función; por lo tanto, en el caso de que la SP-A o la SP-D pudieran ser recuperadas de la superficie de las NP, estas proteínas no podrían ser reutilizadas en la formación del surfactante dada la posible pérdida de su función.

Diferentes efectos y enfermedades han sido relacionados a la disminución de SP-A y SP-D a corto y largo plazo. El efecto de las NP sobre la capacidad de SP-A y SP-D de defender a las células epiteliales contra el virus de la Influenza A ha demostrado que la presencia de diferentes NP puede llevar a la inhibición de la función de estas proteínas (McKenzie et al., 2014), este cambio en las funciones de SP-A y SP-D por su “secuestro” a tan sólo unas horas de la exposición a las NP puede llevar a la susceptibilidad del individuo a diferentes infecciones a corto plazo, generando una vulnerabilidad del individuo. Un estudio epidemiológico reportó los niveles tanto de SP-D como de SP-A en personal de una fábrica de síntesis de este NM, dónde tras realizar el análisis de estas muestras observaron la disminución significativa de SP-D comparada con pacientes no expuestos, mientras que SP-A no mostró un cambio significativo (Zhao et al., 2018). Nuestro estudio en cierta forma confirma las observaciones realizadas en los pacientes, puesto que a pesar de que sean modelos distintos, los resultados concuerdan para el caso de la SP-D; además, este estudio demuestra cómo la exposición en personas en contacto constante con las NP pueden presentar una disminución en diferentes parámetros cardiopulmonares como lo son los niveles de las proteínas del surfactante, estos cambios en la función y la concentración de las SP podría llevar a largo plazo a diferentes enfermedades crónicas del pulmón.

Además de la disminución de SP-A y SP-D, un incremento en la concentración de SP-B fue observado tras la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> o de ZnO. Generalmente, SP-B se ha visto asociada más a los procesos biofísicos de la región alveolar, permitiendo que este tejido resista los cambios de presión y formando la mielina tubular que da lugar a la capa de surfactante (Pérez-Gil, 2008); algunas investigaciones han sugerido que un incremento en la concentración de la SP-B puede presentarse tras la disminución de cualquiera de las otras proteínas del surfactante como una respuesta de protección, así como una posible respuesta en contra de la inflamación producida en el tejido (Kingma y Jobe, 2012). En nuestro estudio, el incremento de los niveles de SP-B puede estar relacionado a dos de los acontecimientos observados; el primero, el aumento de las citocinas pro-inflamatorias en la exposición a ambas NP, que tal como se mencionó, SP-B puede incrementarse como un medio de defensa y de disminución de la respuesta inflamatoria; en un segundo momento, la disminución de SP-A y SP-D pudo llevar a un aumento de los niveles de SP-B como medio de defensa por parte de las células epiteliales de tipo II para disminuir la falta de las otras proteínas por su interacción con las NP. Aunque este aumento se haya registrado, la SP-B no es capaz de sustituir a las otras SP, puesto que cada SP presenta funciones muy específicas y esenciales para el tejido; específicamente, SP-A y SP-D son necesarias para llevar a cabo procesos como la opzonización de patógenos para su posterior eliminación por células inmunes, así como el favorecer la recaptura de los pequeños agregados provenientes de la capa del surfactante pulmonar; ambas funciones, no pueden ser realizadas por la SP-B, y por tanto la homeostasis de el tejido no puede ser recuperada. Esta pérdida en el balance de las SP, como ya se ha mencionado, puede conllevar a un daño en el tejido, que de no ser sanado podría desencadenar múltiples eventos fisiopatológicos.

La disrupción de las proteínas del surfactante, pero sobre todo la disminución de SP-A y SP-D se ha visto asociada a diferentes padecimientos como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en seres humanos (Griese, 1999). Efectos muy similares han sido observados en animales de laboratorio tras una exposición prolonga a los NM, donde se ha observado el desarrollo de enfermedades

cómo asma, EPOC, enfisema, mesotelioma y posiblemente cáncer pulmonar (Lu et al., 2014). A pesar de que el modelo empleado en nuestros experimentos no fue realizado a largo plazo, los efectos sobre las células A549 tras la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> o de ZnO concuerdan con lo ya observado en personas expuestas a estos materiales; es por ello, que en cierto grado, estos resultados podrían ser extrapolados hacia un efecto a largo plazo de estas NP sobre el tejido, donde como menciona la literatura, la falta de estas proteínas puede desencadenar procesos en los cuales el tejido se puede ver comprometido por la falta de protección contra agentes externos, pero también en la pérdida de las propiedades biofísicas con las que contribuyen estas proteínas, lo cual llevaría a la aparición de fibrosis, pérdida de la elasticidad del tejido, y posiblemente hasta la aparición de enfermedades crónicas, antes mencionadas, como se ha observado en los modelos animales.

#### **4.2.5 Influencia de las características de las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO en la disrupción de las SP.**

Como se ha mencionado anteriormente, las características fisicoquímicas de las NP pueden influenciar los efectos causados sobre los diferentes modelos biológicos. En nuestro caso, se emplearon dos NP con características similares, pero que dependiendo del medio en el que se encuentren, estas características pueden llegar a variar. Anteriormente se había mencionado la capacidad que presenta el ZnO para disolverse y formar iones Zn<sup>+2</sup>. Se ha mostrado que dependiendo del tamaño de estas NP y el pH del medio (Bian et al., 2011; Mudunkotuwa et al., 2012), puede presentarse una mayor disolución; este efecto, ha sido también estudiado en los distintos medios de cultivo empleados, donde se ha observado una disolución de alrededor del 30%. Actualmente, se ha propuesto que la toxicidad producida por estas NP esta directamente relacionada con la producción de estos iones Zn<sup>+2</sup> (Liu et al., 2016); los cuales son producidos desde el momento en el que la NP entra en contacto con el medio, y que pueden llevar a una respuesta más rápida en la toxicidad de las células, si es comparado con otras NP como las de TiO<sub>2</sub>. En nuestro caso, al trabajar con ambas NP se observaron respuestas similares; sin embargo, la respuesta presentada sobre la disrupción de las proteínas del surfactante A, B y D, apareció desde las 12 h

en el caso de las NP de ZnO, y esta disrupción continuó a lo largo del tiempo, a diferencia de lo mostrado por las NP de TiO<sub>2</sub>, donde estas sólo presentaron disminución en tiempos puntuales y posterior a las 24 horas de exposición. Esta diferencia, tanto en el tiempo cómo en la duración de los efectos entre ambas NP hace referencia a la posibilidad de un mecanismo de acción distinto por parte de ambas NP, dónde cómo se mencionó, la estabilidad de estas, así cómo la producción de iones metálicos (cómo el Zn<sup>+2</sup>) pueden llevar a efectos distintos sobre la misma línea celular.

Ha sido demostrado, que aquellas NP capaces de solubilizarse en pH ácido, pueden llevar al daño lisosomal y la producción de inflamación por esta vía (Cho et al., 2012), observando de esta forma, cómo a diferencia de las NP poco solubles, las NP de ZnO producen su efecto infamatorio por efectos sobre el lisosoma y no por la producción de especies reactivas; esta inflamación, cómo ya se había mencionado, puede dar lugar a la disrupción de las proteínas del surfactante A y D, por un posible efecto en la inhibición de su síntesis.

De esta misma manera, la estabilidad de las NP es un factor que puede intervenir sobre la temporalidad de los efectos observados en los cultivos celulares. Mucho se ha hablado acerca de la diferencia de densidad existente en las NP al encontrarse en el medio de cultivo, dónde al entrar en contacto con este, aquellas NP más estables (cómo las NP de TiO<sub>2</sub>) en nuestro caso, tardan más tiempo en depositarse y entrar en contacto con las NP; a diferencia de aquellas NP solubles, las cuales a pesar de formar aglomerados y disminuir su densidad, estos aglomerados tienden a disminuir en tamaño y por tanto a producir un depósito más rápido de estas NP sobre el cultivo celular (DeLoid et al., 2017). Este efecto de la densidad de las NP sobre el momento de interacción de estas con las células, puede llevar a explicar en parte los efectos observados sobre las proteínas del surfactante en nuestro modelo. Para las NP de ZnO, su capacidad de disolución les permite depositarse más rápidamente y presentar un efecto a corto plazo comparado con las NP de TiO<sub>2</sub>, que tardan más tiempo en depositarse, y por lo tanto sus efectos más notorios aparecieron en tiempos más largos.

Es importante, considerar de esta manera los efectos a largo plazo que las diferentes características de las NP pueden causar. Diferentes investigaciones han asociado a los compuestos provenientes de metales, pero sobre todo a los iones de estos a diferentes enfermedades degenerativas del sistema inmune (Petrarca et al., 2015). Este hecho, puede llevar a pensar, en los posibles efectos que las NP de ZnO pueden llegar a presentar dada su solubilidad en modelos más complejos (modelos *in vivo*), o directamente sobre los seres humanos tras una exposición a largo plazo. A diferencia de las NP estables, y por tanto persistentes dentro de los organismos vivos, cómo las NP de TiO<sub>2</sub>, que podrían verse implicadas en otros efectos a largo plazo sobre los diferentes sistemas del organismo cómo el sistema reproductor, sistema respiratorio, sistema cardiovascular, entre otros (Zhang et al., 2014).

#### **4.2.6 Inhibición de la citocina pro-inflamatoria IL-6.**

Con base en investigaciones anteriores, las cuales atribuyen la posible disrupción de la SP-A al incremento de la IL-6 (Doumanov et al., 2014) se llevó a cabo la inhibición de esta citocina mediante el uso de un anticuerpo anti-IL-6, con el propósito de demostrar su posible participación en la disminución de esta proteína como se observó en los resultados anteriores. Esta inhibición fue llevada a cabo en la concentración de 100 µg/mL para TiO<sub>2</sub> (Figura 37), y en 15 µg/mL para ZnO (Figura 38), donde en ambos casos se observó una disminución de la SP-A, y un aumento de la IL-6 a las 24 horas; de esta misma forma, se utilizó a la dexametasona como un control positivo a la inhibición de la respuesta inflamatoria en general. Ya que se ha observado que la dexametasona es capaz de inhibir la respuesta inflamatoria por distintas vías, entre ellas por su unión al receptor de glucocorticoides intracelular  $\alpha$ , desencadenando la producción de ciertas proteínas anti-inflamatorias (Mogensen et al., 2008). Los resultados observados tras la exposición de las NP en las concentraciones señaladas mostraron para ambos casos (exposición a NP de TiO<sub>2</sub> o ZnO) la recuperación de los niveles de la SP-A comparados con los del control en los tratamientos donde se adicionó el anti IL-6 o la dexametasona (figuras 37 y 38). Este efecto sobre la inhibición de la IL-6 mediante el uso de anticuerpos específicos ya ha sido reportado, donde

resultados muy similares sobre su inhibición fueron observados (Dembek et al., 2016). De esta manera comprobando la participación de la IL-6 sobre los niveles de SP-A, pues al ser bloqueada esta interleucina, pudo ser observado un nivel basal de la SP-A. Como ya había sido demostrado, en el caso de la dexametasona, este glucocorticoide, es capaz de inhibir la respuesta inflamatoria producida por ciertos agentes como el LPS o algunos esteres de forbol, donde es capaz de actuar sobre la vía de AP-1 en las células A549 (Patil et al., 2018); la misma vía de señalización que ha sido asociada a la con los efectos producidos por los NM y que lleva la producción de ciertas citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ ). Igualmente, este estudio podría sugerir el uso de la dexametasona y el anti IL-6 como un posible tratamiento control en la inhibición de los efectos producidos por las NP en los modelos celulares.

A pesar de que los resultados mostrados permiten comprobar el posible efecto de la respuesta inflamatoria producida por las NP de TiO<sub>2</sub> o ZnO sobre la producción de las proteínas del surfactante, más investigación es necesaria. Este efecto observado es sólo uno de los muchos posibles que pudieran presentar las células de epitelio alveolar contra los NM, y es importante un análisis más profundo de los efectos a largo plazo que podrían ser desencadenados por la disrupción de las SP. De esta misma forma un análisis más detallado de las características fisicoquímicas de las NP así como de su interacción con el surfactante pulmonar permitiría entender como estas propiedades pueden generar un efecto sobre esas células y de esta manera poder generar un diseño de NP que permitan mantener sus propiedades, pero que a su vez disminuyan la posible toxicidad generada por estas.

## 5. Conclusiones

- ✚ Se determinaron las características fisicoquímicas de las NP de TiO<sub>2</sub>. Confirmándose un tamaño primario promedio de 22 nm y su forma tetraédrica. Su diámetro hidrodinámico (20 nm en agua; 370 en medio) permitió observar la presencia de aglomerados de este material al entrar en contacto con el medio de cultivo, los cuales permanecieron constantes a lo largo del tiempo, mostrando la estabilidad de estas NP. De la misma forma se determinó su potencial zeta en los diferentes medios (0.163 mV en agua; – 12 mV en medio).
- ✚ La caracterización de las NP de ZnO mostró una morfología hexagonal y un tamaño primario promedio de 16 nm. Estas partículas formaron aglomerados en todos los medios analizados (diámetro hidrodinámico de 280 nm en agua y 369 nm en medio de cultivo), y un potencial zeta de 30.566 mV en agua y de – 12 mV en el medio de cultivo. Los aglomerados en medio de cultivo disminuyeron conforme al tiempo, destacando la poca estabilidad de las NP.
- ✚ Los ensayos de viabilidad realizados demostraron la poca toxicidad de las NP TiO<sub>2</sub> y ZnO sobre el modelo celular. Destacándose como citotóxica sólo la concentración más elevada de TiO<sub>2</sub> que fue empleada para estos ensayos (200 µg/mL).
- ✚ La determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno mostró la capacidad de las NP de TiO<sub>2</sub> para producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> en los tiempos analizados, a diferencia de las NP de ZnO, las cuales sólo mostraron la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 3 horas.
- ✚ Ambas NP mostraron su capacidad de inducir la respuesta inflamatoria al llevar a un aumento en la producción de TNF-α, IL-6 (citocinas pro-inflamatorias) e IL-10 (citocina anti-inflamatoria).
- ✚ La exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO causaron una disrupción en los niveles de las proteínas del surfactante, llevando a una disminución de la SP-A, un aumento de la SP-B y una disminución de las SP-D, destacando que estos efectos se presentaron en tiempos más cortos y de manera constante en las NP de ZnO.

- ✚ La inhibición de la actividad de la IL-6 en la exposición a las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO mostró la recuperación de los niveles de la SP-A comprobando de esta forma la participación directa de la IL-6 en la regulación de esta proteína.
- ✚ A pesar de que los efectos observados en ambas NP sean similares, la diferencia del ZnO en la producción de las ROS, la posible solubilidad de esta NP y el hecho de que los efectos de este NM se hayan presentado desde tiempos más cortos a los efectos producidos por las NP de TiO<sub>2</sub>, pueden llevar a desencadenar procesos adversos muy distintos a largo plazo.
- ✚ Es importante considerar el posible efecto a largo plazo de la inflamación producida por este tipo de materiales, el cual podría llevar en un futuro a la pérdida de la elasticidad del tejido alveolar, fibrosis tisular y posiblemente culminar en diferentes enfermedades crónicas.

## 6. Perspectivas

- Determinar la localización de las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO en el interior de las células A549 mediante microscopía electrónica, y asociar su localización con los efectos observados en este trabajo.
- Determinar el efecto de las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO sobre la expresión de los genes de las proteínas del surfactante mediante RT-qPCR.
- Realizar el silenciamiento de las citocinas presentes tras la exposición a ambas NP para determinar su participación sobre la modulación de las SP.
- Determinar los efectos de las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO sobre la respuesta inflamatoria y los niveles de las proteínas del surfactante en un modelo de exposición por nebulización.
- Determinar la formación de la corona de proteínas de surfactante pulmonar de las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO, y como esta puede intervenir en la interacción de las NP con las células y el medio de cultivo.
- Trabajar un modelo de co-cultivo de células epiteliales alveolares (A549) y macrófagos alveolares (THP-1) para determinar los efectos que la exposición a

las NP de TiO<sub>2</sub> u ZnO pueden producir, y cómo estos tipos celulares pueden interactuar para la eliminación de las NP de este medio.

## 7. Referencias

- Ahamed, M., Akhtar, M. J., Raja, M., Ahmad, I., Siddiqui, M. K. J., AlSalhi, M. S., & Alrokayan, S. A. (2011). ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and bax/bcl-2 pathways: Role of oxidative stress. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6), 904–913.
- Andersson, P. O., Lejon, C., Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C., Ahlinder, L., Bucht, A., & Österlund, L. (2011). Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in living lung epithelial cells. *Small*, 7(4), 514–523.
- Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A., & Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2007). Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(2), L259–L271.
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 385–406.
- Aueviriyavit, S., Phummiratch, D., Kulthong, K., & Maniratanachote, R. (2012). Titanium dioxide nanoparticles-mediated in vitro cytotoxicity does not induce Hsp70 and Grp78 expression in human bronchial epithelial A549 cells. *Biological Trace Element Research*, 149(1), 123–132.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V., Jolivet, J.-P., & Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, 4(10), 634–641.
- Aztatzi-Aguilar, O. G., Uribe-Ramírez, M., Narváez-Morales, J., De Vizcaya-Ruiz, A., & Barbier, O. (2016). Early kidney damage induced by subchronic exposure to PM<sub>2.5</sub> in rats. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 68.
- Bartlett, P., & Entzeroth, M. (Eds.). (2006). *Exploiting Chemical Diversity for Drug Discovery*. Royal Society of Chemistry.
- Batenburg, J. J., & Haagsman, H. P. (1998). The lipids of pulmonary surfactant: dynamics and interactions with proteins. *Progress in Lipid Research*, 37(4), 235–76.

- Bedinger, M. (2017). Titanium and titanium dioxide. *Mineral Commodity Summaries*, 1(703), 172–173.
- Bian, S. W., Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T., & Grassian, V. H. (2011). Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: Influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir*, 27(10), 6059–6068.
- Biola-Clier, M., Beal, D., Caillat, S., Libert, S., Armand, L., Herlin-Boime, N., ... Carriere, M. (2017). Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis*, 32(1), 161–172.
- Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8 II), 1221–1229.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Poland, C. A., Duschl, A., Oostingh, G. J., MacNee, W., ... Donaldson, K. (2012). Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology*, 6(1), 22–35.
- Cho, W. S., Duffin, R., Thielbeer, F., Bradley, M., Megson, I. L., MacNee, W., ... Donaldson, K. (2012). Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 126(2), 469–477.
- Coleman, V. A., & Jagadish, C. (2006). Basic Properties and Applications of ZnO. In *Zin Oxide Bulk, Thin Films and Nanostructures Processing, Properties and Applications* (pp. 1–20). Oxford, UK: Elsevier.
- Cory, A., Owen, T., Barltrop, A., & Cory, J. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*, 3, 207–212.
- Davis, J., Wang, A., & Shtakin, J. (2010). Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen. *US EPA: Research Triangle Park*, (November), 13–14.
- DeLoid, G. M., Cohen, J. M., Pyrgiotakis, G., & Demokritou, P. (2017). Preparation, characterization, and in vitro dosimetry of dispersed, engineered nanomaterials.

- Nature Protocols*, 12(2), 355–371.
- Dembek, A., Laggai, S., Kessler, S. M., Czepukojc, B., Simon, Y., Kiemer, A. K., & Hoppstetter, J. (2016). Hepatic interleukin-6 production is maintained during endotoxin tolerance and facilitates lipid accumulation. *Immunobiology*, 222(6), 786–796.
- Dinarello, C. a. (2013). Anti-inflammatory Agents : Present and Future. *Cell*, 140(6), 935–950.
- Donaldson, K., Schinwald, A., Murphy, F., Cho, W. S., Duffin, R., Tran, L., & Poland, C. (2013). The biologically effective dose in inhalation nanotoxicology. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 723–732.
- Doumanov, J., Jordanova, A., Zlatkov, K., Moskova-Doumanova, V., & Lalchev, Z. (2014). Investigation of IL-6 effects on SP-A expression in A549 lung cell line. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26(June), 96–99.
- Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C. M., Andersson, P. O., Lejon, C., Österlund, L., & Bucht, A. (2012). Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology*, 6(6), 623–634.
- Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. (2003). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 41(03), 63–71.
- Gaté, L., Disdier, C., Cosnier, F., Gagnaire, F., Devoy, J., Saba, W., ... Mabondzo, A. (2017). Biopersistence and translocation to extrapulmonary organs of titanium dioxide nanoparticles after subacute inhalation exposure to aerosol in adult and elderly rats. *Toxicology Letters*, 265, 61–69.
- Geiker, M. R., & Andersen, M. M. (2009). Nanotechnologies for sustainable construction. *Sustainability of Construction Materials*, (November), 254–284.
- Geiser, M., & Kreyling, W. G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(i), 2–19.
- Gojova, A., Guo, B., Kota, R. S., Rutledge, J. C., Kennedy, I. M., & Barakat, A. I. (2007). Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: Effect of particle composition. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 403–409.

- Griese, M. (1999). Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*, 13, 1455–1476.
- Haagsman, H. P., & van Golde, L. M. (1991). Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu. Rev. Physiol.*, 53, 441–464.
- Hammond, J. B., & Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. In *Methods in Molecular Biology* (3rd editio, Vol. 3, pp. 17–24).
- He, T., Long, J., Li, J., Liu, L., & Cao, Y. (2017). Toxicity of ZnO nanoparticles (NPs) to A549 cells and A549 epithelium in vitro: Interactions with dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56(October), 233–240.
- Himly, M., Grotz, B., Sageder, M., Geppert, M., & Duschl, A. (2016). Immune Frailty and Nanomaterials: The Case of Allergies. *Current Bionanotechnology*, 2(1), 20–28.
- Houser, B. (2012). Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 118(4), 192–196.
- Hussain, S., Boland, S., Baeza-Squiban, A., Hamel, R., Thomassen, L. C. J., Martens, J. A., ... Marano, F. (2009). Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260(1–3), 142–149.
- Ivask, A., Titma, T., Visnapuu, M., Vija, H., Kakinen, A., Sihtmae, M., ... Kahru, A. (2015). Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In V.itro. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(18), 1914–1929.
- Kathae, A., & Mansoori, G. (2012). *Nanostructured Titanium Dioxide Materials: Properties, Preparation and Applications*. Singapore: World Scientific Publishing.
- Kato, H., Suzuki, M., Fujita, K., Horie, M., Endoh, S., Yoshida, Y., ... Kinugasa, S. (2009). Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment. *Toxicology in Vitro*, 23(5), 927–934.
- Kelso, A. (1998). Cytokines: Principles and prospects. *Immunology and Cell Biology*, 76(4), 300–317.
- Kendall, M., Ding, P., MacKay, R. M., Deb, R., McKenzie, Z., Kendall, K., ... Clark, H. (2013). Surfactant protein D (SP-D) alters cellular uptake of particles and

- nanoparticles. *Nanotoxicology*, 7(5), 963–973.
- Kendall, M., Hodges, N. J., Whitwell, H., Tyrrell, J., & Cangul, H. (2014). Nanoparticle growth and surface chemistry changes in cell-conditioned culture medium. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1661), 20140100–20140100.
- Kingma, P., & Jobe, A. H. (2012). The surfactant system. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*, 29–34.
- Lai, X., Wei, Y., Zhao, H., Chen, S., Bu, X., Lu, F., ... Zhang, J. (2015). The effect of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ZnO nanoparticles on cytotoxicity and glucose metabolism in lung epithelial cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(6), 651–664.
- Lee, G. H., Kawazoe, T., & Ohtsu, M. (2002). Difference in optical bandgap between zinc-blende and wurtzite ZnO structure formed on sapphire (0001) substrate. *Solid State Communications*, 124(5–6), 163–165.
- Liao, D. L., Wu, G. S., & Liao, B. Q. (2009). Zeta potential of shape-controlled TiO<sub>2</sub> nanoparticles with surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 348(1–3), 270–275.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268.
- Liu, J., Feng, X., Wei, L., Chen, L., Song, B., & Shao, L. (2016). The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(4), 348–384.
- Lu, X., Zhu, T., Chen, C., & Liu, Y. (2014). Right or left: The role of nanoparticles in pulmonary diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17577–17600.
- Luo, Y. H., Chang, L. W., & Lin, P. (2015). Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Research International*, 2015(Figure 1).
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- McKenzie, Z., Kendall, M., Mackay, R.-M. A., Tetley, T. D., Morgan, C., Griffiths, M., ... Madsen, J. (2014). Nanoparticles modulate surfactant protein A and D mediated

- protection against influenza A infection in vitro. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1661), 20140049–20140049.
- McKenzie, Z., Kendall, M., Mackay, R. M., Whitwell, H., Elgy, C., Ding, P., ... Madsen, J. (2015). Surfactant protein A (SP-A) inhibits agglomeration and macrophage uptake of toxic amine modified nanoparticles. *Nanotoxicology*, 9(8), 952–962.
- Mendelson, C. R., Gao, E., Li, J., Young, P. P., Michael, L. F., & Alcorn, J. L. (1998). Regulation of expression of surfactant protein-A. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1408(2–3), 132–149.
- Meng, H., Xia, T., George, S., & Nel, A. E. (2009). A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. *ACS Nano*, 3(7), 1620–1627.
- Mitsuhashi, A., Goto, H., Kuramoto, T., Tabata, S., Yukishige, S., Abe, S., ... Nishioka, Y. (2013). Surfactant protein a suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. *American Journal of Pathology*, 182(5), 1843–1853.
- Moezzi, A., McDonagh, A. M., & Cortie, M. B. (2012). Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications. *Chemical Engineering Journal*, 185–186, 1–22.
- Mogensen, T. H., Berg, R. S., Paludan, S. R., & Østergaard, L. (2008). Mechanisms of dexamethasone-mediated inhibition of toll-like receptor signaling induced by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 76(1), 189–197.
- Morimoto, Y., Izumi, H., Yoshiura, Y., Tomonaga, T., Oyabu, T., Myojo, T., ... Sasaki, T. (2016). Evaluation of Pulmonary Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles Following Inhalation and Intratracheal Instillation. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1241.
- Mudunkotuwa, I. a, Rupasinghe, T., Wu, C.-M., & Grassian, V. H. (2012). Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 28(1), 396–403.
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences*, 101(2),

239–253.

- Nandkumar, M. A., Ashna, U., Thomas, L. V., & Nair, P. D. (2015). Pulmonary surfactant expression analysis-Role of cell-cell interactions and 3-D tissue-like architecture. *Cell Biology International*, 39(3), 272–282.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., ... Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8(7), 543–557.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li, N. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311(5761), 622–627.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839.
- Patil, R. H., Naveen Kumar, M., Kiran Kumar, K. M., Nagesh, R., Kavya, K., Babu, R. L., ... Chidananda Sharma, S. (2018). Dexamethasone inhibits inflammatory response via down regulation of AP-1 transcription factor in human lung epithelial cells. *Gene*, 645(December 2017), 85–94.
- Pérez-Gil, J. (2008). Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(7–8), 1676–1695.
- Perez-Gil, J., & Weaver, T. E. (2010). Pulmonary Surfactant Pathophysiology: Current Models and Open Questions. *Physiology*, 25(3), 132–141.
- Petrarca, C., Clemente, E., Amato, V., Pedata, P., Sabbioni, E., Bernardini, G., ... Di Gioacchino, M. (2015). Engineered metal based nanoparticles and innate immunity. *Clinical and Molecular Allergy*, 13(1), 1–12.
- Pietroiusti, A., Stockmann-Juvala, H., Lucaroni, F., & Savolainen, K. (2018). Nanomaterial exposure, toxicity, and impact on human health. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, (November 2017), 1–21.
- Powers, K. W., Carpinone, P. L., & Siebein, K. N. (2012). Characterization of nanomaterials for toxicological studies. *Methods in Molecular Biology*, 926, 13–32.
- Puleston, D. (2015). Detection of mitochondrial mass, damage, and reactive oxygen

- species by flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(9), 830–834.
- Raesch, S. S., Tenzer, S., Storck, W., Rurainski, A., Selzer, D., Ruge, C. A., ... Lehr, C. M. (2015). Proteomic and Lipidomic Analysis of Nanoparticle Corona upon Contact with Lung Surfactant Reveals Differences in Protein, but Not Lipid Composition. *ACS Nano*, 9(12), 11872–11885.
- Rahman, L., Wu, D., Johnston, M., William, A., & Halappanavar, S. (2017). Toxicogenomics analysis of mouse lung responses following exposure to titanium dioxide nanomaterials reveal their disease potential at high doses. *Mutagenesis*, 32(1), 59–76.
- Rankin, J. a. (2004). Biological Mediators of Acute Inflammation. *AACN Clinical Issues*, 15, 3–17.
- Rastogi, R. P., Singh, S. P., Häder, D. P., & Sinha, R. P. (2010). Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(3), 603–607.
- Reimer, L. (1984). *Transmission Electron Microscopy: Physics of image formation and microanalysis*. Springer Berlin Heidelberg.
- Reineke, J. (Ed.). (2012). *Nanotoxicity Methods and Protocols*. Springer.
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458–1461.
- Rogers, K. (2011). *Respiratory System*. Britannica Educational Publishing.
- Roy, R., Kumar, S., Tripathi, A., Das, M., & Dwivedi, P. D. (2014). Interactive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunology Letters*, 158(1–2), 79–87.
- Sans, J. A., Segura, A., Manjón, F. J., Marí, B., Muñoz, A., & Herrera-Cabrera, M. J. (2005). Optical properties of wurtzite and rock-salt ZnO under pressure. *Microelectronics Journal*, 36(10), 928–932.
- Saptarshi, S. R., Duschl, A., & Lopata, A. L. (2015). Biological reactivity of zinc oxide nanoparticles with mammalian test systems: an overview. *Nanomedicine*, 10(13), 2075–2092.
- Saptarshi, S. R., Feltis, B. N., Wright, P. F. A., & Lopata, A. L. (2015). Investigating the

- immunomodulatory nature of zinc oxide nanoparticles at sub-cytotoxic levels in vitro and after intranasal instillation in vivo. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 1–11.
- Schulze, C., Schaefer, U. F., Ruge, C. A., Wohlleben, W., & Lehr, C. M. (2011). Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(3), 376–383.
- Seabra, A., & Durán, N. (2015). Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals*, 5(2), 934–975.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., & Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 15.
- Stec, A., & Hull, R. (Eds.). (2010). *Fire Toxicity*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Tedja, R., Marquis, C., Lim, M., & Amal, R. (2011). Biological impacts of TiO<sub>2</sub> on human lung cell lines A549 and H1299: Particle size distribution effects. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(9), 3801–3813.
- The Nanodatabase. (n.d.). Retrieved May 8, 2018, from <http://nanodb.dk/>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563–2582.
- Ursini, C. L., Cavallo, D., Fresegna, A. M., Ciervo, A., Maiello, R., Tassone, P., ... Iavicoli, S. (2014). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory response in human alveolar and bronchial epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 34(11), 1209–1219.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., & Hull, D. R. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), 1769–1780.
- Varner, K. (2010). State of the Science Literature Review: Nano Titanium Dioxide Environmental Matters. *Environmental Protection Agency, Washington, DC*.
- Vaseem, M., Umar, A., & Hahn, Y. (2010). *ZnO Nanoparticles : Growth, Properties, and Applications. Metal Oxide Nanostructures and Their Applications (Vol. 5)*.

- Wang, L., Wang, L., Ding, W., & Zhang, F. (2010). Acute Toxicity of Ferric Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(12), 8617–8624.
- Wang, Y., Cui, H., Zhou, J., Li, F., Wang, J., Chen, M., & Liu, Q. (2015). Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 5519–5530.
- Whitsett, J. a, & Glasser, S. W. (1998). Regulation of surfactant protein gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408(2–3), 303–311.
- Wright, J. R. (2003). Pulmonary surfactant: A front line of lung host defense. *Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1453–1455.
- Yazdi, A. S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S. K., Tardivel, A., Couillin, I., & Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 and IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19449–19454.
- Zhang, X., Li, W., & Yang, Z. (2015). Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Archives of Toxicology*, 89(12), 2207–2217.
- Zhang, Y., Bai, Y., Jia, J., Gao, N., Li, Y., Zhang, R., ... Yan, B. (2014). Perturbation of physiological systems by nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, 43(10), 3762–3809.
- Zhao, L., Zhu, Y., Chen, Z., Xu, H., Zhou, J., Tang, S., ... Jia, G. (2018). Cardiopulmonary effects induced by occupational exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 12(2), 169–184.
- Zhuang, F., & Hanagata, N. (2012). Synergic Toxicity of Solid Particles and Released Zinc from Zinc Oxide Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells, 4(2), 90–112.