

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

# "ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TOXICIDAD POR LA EXPOSICIÓN A NANOPARTÍCULAS DE Ag O TIO₂ EN EMBRIÓN DE PEZ CEBRA Y EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE HUMANO"

Tesis que presenta:

## L. N. ANDREA CÁZARES MORALES

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias

en la Especialidad de Toxicología

## Directoras de tesis:

Dra. Andrea De Vizcaya Ruíz

Dra. Denhi Schnabel Peraza

Ciudad de México, Agosto 2020

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN y en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. Andrea De Vizcaya Ruíz y la Dra. Denhi Schnabel Peraza. Este trabajo fue financiado por SINANOTOX, Conacyt-PROBLEMAS-2017-01-4710.

### RESUMEN

La categorización de los nanomateriales facilita la evaluación de riesgo, y estos pueden clasificarse en NM activos o pasivos. Este trabajo se enfoca en la evaluación de la toxicidad de nanopartículas (NPs) activas, la que depende principalmente de su composición química, y tienen una alta tasa de disolución, por ejemplo, las NPs de plata (NPs-Ag); mientras que los efectos tóxicos de las NPs pasivas no se relacionan con respuestas celulares específicas, como las NPs de dióxido de titanio (NPs-TiO<sub>2</sub>). Una vez dentro del organismo, las NPs pueden translocarse al sistema cardiovascular donde puede dañar el endotelio vascular. Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) son un modelo confiable y sencillo para evaluar la nanotoxicidad en este tipo de tejido. El pez cebra (Danio rerio) tiene un sistema cardiovascular similar al de los mamíferos, y tiene un rápido desarrollo embrionario, por lo que es utilizado en estudios nanotoxicológicos. En el presente trabajo se pretendió comparar los efectos de NPs con diferentes mecanismos de toxicidad, un tipo de NP activa y otra pasiva en embriones de pez cebra (EPC) y células HUVEC. Ambas NPs fueron caracterizadas en seco y en húmedo, previo a la exposición de los modelos en las mismas concentraciones. En EPC se determinó supervivencia, tasa de eclosión y anormalidades del desarrollo. En las células HUVEC se evaluó la actividad metabólica con el ensayo MTS y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) con DCFDA, como indicadores de citotoxicidad. En nuestro estudio se observó que las características fisicoquímicas de las NPs no correspondían totalmente a las reportadas por el fabricante. Pero, se determinó que las NPs mantienen su tamaño y dispersión en los medios de exposición (agua de pez y medio de cultivo celular) hasta por 96 h. La exposición a NPs-Ag o NPs-TiO<sub>2</sub> no afectaron la supervivencia y la eclosión de los EPC, pero se detectaron edemas y falta de coloración en los embriones expuestos a las NPs-TiO2. La viabilidad de las células HUVEC disminuyó con ambas NPs; en las expuestas a NPs-Ag se detectó la generación intracelular de ROS. El recubrimiento de PVP de las NPs jugó un papel importante al facilitar el ingreso de las NPs a las células HUVEC e incrementar la actividad fotocatalítica de las NPs-TiO<sub>2</sub>. De acuerdo con nuestros resultados y a la comparación con la literatura, se sugiere que la causa de los efectos observados por las NPs-Ag o de las NPs-TiO<sup>2</sup>, se debe a sus diferentes mecanismos de toxicidad, como activas y pasivas, respectivamente. Nuestros resultados usando modelos relacionados con el endotelio vascular mostraron la susceptibilidad que la exposición a estas NPs podría ejercer y tener repercusiones en el sistema cardiovascular. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmarlo.

Palabras clave: NPs-Ag, NPs-TiO<sub>2</sub>, *Danio rerio*, HUVEC.

## ABSTRACT

Nanoparticle (NPs) categorization can facilitate risk evaluation. They can be categorized as active or passive NPs. Active NPs toxicity depends on its chemical composition, and elicit acute effects, such is the case of silver NPs (Aq NPs) for example. While toxic effects of passive NPs are not related with a specific cell response, like titanium dioxide NPs (TiO<sub>2</sub> NPs). Once inside the organism, these NPs can reach the cardiovascular system where they will directly interact with endothelial cells and cause damage. The most reliable and simple *in vitro* model to evaluate nanotoxicity are the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Additionally, the in vivo model of zebrafish (Danio rerio) shares similarities with mammalian cardiovascular system, and has a fast-embryonic development, so it is also commonly used to evaluate NPs toxicity. This study aimed to compare the effects of two NPs with different toxicity mechanisms in zebrafish embryos (ZE) and HUVEC cells. Both NPs were characterized physiochemically in dry and wet conditions, prior to exposure, and the same NPs mass concentration were used in both models. Survival, hatching rate, and development of abnormalities were registered for ZE. In HUVEC cells, metabolic activity was determined by MTS, and reactive oxygen species (ROS) generation with DCFDA, as cytotoxicity biomarkers. It found that physicochemical characteristics were inconsistent with the information given by the manufactured supplier. But it was determined that both NPs were in accordance to their size and dispersion state in media for 96 h. Survival and hatching were unaltered by neither Ag-NPs nor TiO<sub>2</sub>-NPs, however, oedemas and lack of pigmentation were recorded in ZE exposed to TiO<sub>2</sub> NPs. HUVEC cell viability was decreased with both NPs; ROS generation was reported in cells exposed to Ag NPs. NPs PVP coating played a pivotal role by facilitating NPs uptake into HUVEC cells, and by increasing TiO<sub>2</sub> NPs photoactivity. When compared to the literature, our results suggest that the observed effects caused by Aq-NPs or TiO2-NPs were due to their different toxicity mechanisms as active and passive NPs, respectively. This indicates that NPs could affect the cardiovascular system if exposed to them. Nevertheless, more studies are needed to confirm the hereby presented findings.

Key words: Ag NPs, TiO2 NPs, Danio rerio, HUVEC.

## DEDICATORIA

A mi familia

### AGRADECIMIENTOS

A mis directoras y comité de tesis, por su apoyo y tiempo brindados durante mi trabajo de tesis. A la Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz, por haberme dado la confianza y la oportunidad de trabajar en el Laboratorio 26. A la Dra. Denhi Schnabel Peraza, por recibirme en su grupo de trabajo, y por su asesoría con el pez cebra. A la Dra. Betzabet Quintanilla Vega y al Dr. Arnulfo Albores Medina por sus sugerencias y por ayudarme a ver mi trabajo desde otros ángulos.

Al Dr. Gabriel Luna Bárcena de CINVESTAV-Querétaro por la caracterización de las nanopartículas. A la Biol. T. Marisela Uribe Ramírez por el entrenamiento y supervisión en las técnicas de cultivo celular MTS, LDH, azul de tripano, la determinación de ERO, Western Blot y técnicas analíticas, y apoyo en el Laboratorio. A la Dra. Aidée Solorio por sus enseñanzas en cultivo celular.

A los doctores del Departamento de Toxicología, por su guía y sus enseñanzas que me han proporcionado ayudándome a continuar mi formación como científica.

Al M.C. Arturo Jiménez por su amistad, por sus consejos y por no cansarse de mis preguntas. A Jaime López por ayudarme cuando aún no podía reconocer un embrión fertilizado y cuando tenía demasiado trabajo en mis manos. A Rebeca Montero por su amistad y compañía durante estos dos años.

A mis padres y a mi hermana por siempre haberme dado su apoyo incondicional para cumplir mis sueños y por haberme alentado a llegar hasta donde estoy. A José Antonio Flores por todas sus revisiones,por ayudarme a ponerle palabras a mis ideas, y por desvelarse conmigo.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y al Consejo de Ciencia y Tecnología, por admitirme en el Programa de Maestría en Toxicología y por su patrocinio, así como por las oportunidades de estancias.

Al Sistema Nacional de Nanotoxicología por permitirme contribuir con mi trabajo a esta iniciativa nacional y por proporcionar las nanopartículas utilizadas. Al Departamento de Toxicología y al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por el apoyo en las instalaciones y equipos que me permitieron desarrollar mi proyecto, el cual concluye en el presente trabajo.

# INDICE

RESUM	EN	ii
Palabra	s clave: NPs-Ag, NPs-TiO2, Danio rerio, HUVEC.ABSTRACT	ii
DEDICA	TORIA	iv
AGRAD	ECIMIENTOS	v
INDICE		vi
LISTA D	E TABLAS	viii
LISTA D	E FIGURAS	ix
ABREVI	ATURAS	x
1. IN		1
1.1.	Alcance actual de la nanotecnología	1
1.2.	Nanotoxicología	1
1.3.	NPs de interés	4
1.4.	Modelos de estudio	8
1.5.	Justificación	11
1.6.	Hipótesis	12
1.7.	Objetivos	12
2. ME	ÉTODOS	13
2.1.	Reactivos	13
2.2.	Diseño experimental	13
2.3.	Caracterización de las NPs	13
2.4.	Estudio <i>in vivo</i>	15
2.5.	Estudio <i>in vitro</i>	16
2.6.	Análisis de resultados	18
3. RE	SULTADOS	19
3.1.	Caracterización de las NPs	19
3.2.	Estudio <i>in vivo</i>	22
3.3.	Estudio in vitro	24
4. DIS	SCUSIÓN	27

4.1.	Caracterización de las NPs	27
4.2.	Estudio <i>in vivo</i>	30
4.3.	Estudio in vitro	35
5. CO	INCLUSIONES	42
6. PE	RSPECTIVAS	43
7. RE	FERENCIAS	44

## LISTA DE TABLAS

Pá	gina
Tabla I. Propiedades fisicoquímicas de las NPs de interés	6
Tabla II. Comparación de características fisicoquímicas y sus efectos esperados.	39

## LISTA DE FIGURAS

F	'ágina
Figura 1. Productos comerciales que contienen NPs y su clasificación	. 2
Figura 2. Estrategia experimental	. 14
Figura 3. Caracterización fisicoquímica de las NPs-Ag y NPs-TiO2	. 20
Figura 4. Determinación del tiempo de dispersión	. 21
Figura 5. Estabilidad de las NPs en solución acuosa	. 21
Figura 6. Sobrevivencia, eclosión y anormalidades del desarrollo en embriones de pez cebra	22
Figura 7. Desarrollo de embriones expuestos a NPs-TiO2	. 23
Figura 8. Citotoxicidad en células HUVEC por exposición a NPs	25
Figura 9. Viabilidad en células HUVEC expuestas a NPs-Ag	25
Figura 10. Generación de ROS en células HUVEC expuestas a NPs-Ag	. 26

## ABREVIATURAS

DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato acetil éster
DH	Diámetro Hidrodinámico
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
DRX	Difracción de rayos X
EC50	Concentración Efectiva 50
EPC	Embriones de Pez Cebra
GBP	Partículas Granulares y Biodurables (Granular Biodurables Particles)
HAR	Alta Relación de Aspecto (High Aspect Ratio)
hpf	Horas post fertilización
HUVEC	Células Endoteliales Humanas de Cordón Umbilical (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
LC50	Concentración Letal 50
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- tetrazolio)
NPs	Nanopartículas
NPs-Ag	Nanopartículas de plata
NPs-TiO <sub>2</sub>	Nanopartículas de dióxido de titanio
PdI	Índice de Polidispersión (Polydispersion Index)
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido (Scanning Electronic Microscopy)
SFB	Suero Fetal Bovino
ZE	Zebrafish Embryos

### 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Alcance actual de la nanotecnología

La nanotecnología ha permitido la creación de materiales que tienen al menos una dimensión en el rango de 1 a 100 nm (He et al., 2019) y una alta relación superficievolumen. Desde hace 60 años, que se propuso la manipulación de la materia átomo por átomo, la nanotecnología ha crecido al punto de tener un impacto económico proyectado de 3 billones de dólares en 2020 (He et al., 2019). El uso de las nanopartículas (NPs) ha tomado gran importancia debido a sus novedosas propiedades y aplicaciones, sin embargo, estas cualidades vienen acompañadas de nuevos riesgos que requieren estudio.

La versatilidad de las NPs ha permitido que se expandan por casi cualquier campo de la ciencia y actividad económica. Entre las innovaciones más recientes se incluyen desarrollos en el área de la computación cuántica, química del estado sólido, tejido artificial, celdas solares biomiméticas y nanodispositivos utilizados en diagnósticos médicos y terapéuticos, entre otros (OECD 2017). Gracias a esto, la cantidad de productos que contienen NPs cada vez es mayor. De acuerdo con *"The Nanodatabase"*, actualmente hay 3329 productos en el mercado con nanomateriales. De los cuales el 33.7% contienen NPs de plata (NPs-Ag), el 13.0% NPs de titanio (NPs-Ti) y el 10.9% NPs de dióxido de titanio (NPs-TiO<sub>2</sub>) (Fig. 1). El 61.5% de los productos en los que se encuentran son de uso personal, por lo que las correspondientes pruebas de exposición y toxicidad son imperativas (The Nanodatabase, 2020).

### 1.2. Nanotoxicología

La toxicidad de una NP depende tanto de sus propiedades fisicoquímicas, así como del medio en el que se encuentren dispersadas. El tamaño, la forma, su carga superficial y los recubrimientos juegan un papel crucial en el comportamiento de las NPs (Oberdörster et al., 2005; Baranowska-Wójcik et al., 2019), ya que influencian en su disolución, transporte y destino celular (Baer 2018). No obstante, estas características se pueden modificar de acuerdo con el medio de disolución o para ser dispuestas en un sistema biológico en el que se encuentren, ya que la presencia de sales y moléculas



**Figura 1.** Productos comerciales que contienen NPs y su clasificación. La cantidad de productos que contienen NPs de Ag, Ti o TiO<sub>2</sub> aumenta anualmente. La mayoría de los productos que contiene este tipo de NPs se encuentran clasificados como artículos de salud y bienestar, de casa y jardín, o alimentos y bebidas. (Modificado de The Nanodatabase 2020).

pueden modificar su comportamiento, y por consecuencia, su toxicidad (Cohen et al., 2014). La alta relación superficie-volumen de las NPs, facilita la probabilidad termodinámica de enlazarse con diversas biomoléculas (Wolfram et al., 2015). Esto crea una corona a su alrededor, la cual cambia con el tiempo y el ambiente, modificando la interacción con células (Paunovska et al., 2019).

Por esto, es importante que los estudios de nanotoxicología se realicen a la par del desarrollo tecnológico, para poder evaluar correctamente si un nanomaterial puede o no ser perjudicial. Para esto es crucial conocer las propiedades fisicoquímicas del material, su comportamiento de aglomeración, su biopersistencia y su interacción biológica, las cuales son diferentes para cada nanomaterial. Actualmente, hay poco conocimiento sobre la toxicidad y el riesgo que las NPs pueden conllevar (He et al., 2019).

### 1.2.1. Categorización de los nanomateriales

Para facilitar la evaluación nanotoxicológica se ha propuesto la categorización de las NPs, para apoyar el proceso para una adecuada clasificación y regulación (Gebel et al., 2014). Las propiedades fisicoquímicas no son suficientes para predecir los efectos adversos, por lo que la categorización también incluye respuestas y efectos biológicos, así como su biopersistencia (BAuA 2013; Gebel et al., 2014; Arts et al., 2015). De acuerdo con este sistema de clasificación los nanomateriales pueden clasificarse en: a) solubles; b) fibrosos persistentes; c) activos y; d) pasivos. La modificación de la superficie, por recubrimientos o cargas, puede hacerlos cambiar de categoría. Habrá situaciones en las que un nanomaterial no pueda ser claramente asignado a una categoría, ya sea por las características propias del material o por el efecto que tiene el recubrimiento, sin embargo, esta estrategia presenta una alternativa adecuada.

Se consideran nanomateriales solubles a aquellos que tienen una solubilidad mayor a 100 mg/mL en agua, tomando en cuenta la definición de solubilidad para sustancias químicas de la Farmacopea Europea (BAuA, 2013). Para estos nanomateriales, la composición química es lo más importante para la evaluación del riesgo, como las NPs de cloruro de cinc (Arts et al., 2015). Por otro lado, los fibrosos persistentes son fibras rígidas respirables nanoestructuradas con alta persistencia y razón de aspecto (HAR, por sus siglas en inglés). Estos materiales provocan efectos similares a los asbestos, principalmente por su biopersistencia y forma (Gebel et al., 2014). Se incluye a todas las estructuras fibrosas rígidas respirables que tengan las dimensiones de fibras de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (> 5 mm de longitud, <3 mm de diámetro, relación de aspecto >3:1) (Gebel et al., 2014). Ejemplo de estos son algunos nanotubos de carbono multipared (Arts et al., 2015). Se debe considerar que las fibras no deben estar pegadas o aglomeradas, ya que de estarlo

podrían superar los 3 mm de diámetro. Esto evitaría que tuvieran toxicidad tipo asbesto al no poder alcanzar a ingresar en el tracto respiratorio (Gebel et al., 2014).

La toxicidad de los nanomateriales activos, o con propiedades toxicológicas específicas, es mediada específicamente por las propiedades químicas de sus componentes, como la tasa de disolución, reactividad de superficie, dispersabilidad o efectos celulares (Arts et al., 2015). Esto puede ser por la liberación de componentes tóxicos, por la presencia de grupos químicos reactivos en su superficie o propiedades catalíticas de superficie (Gebel et al., 2014), como es el caso de las NPs de plata (NPs-Ag) y de óxido de zinc (NPs-ZnO), donde ambas liberan iones (BAuA 2013). Para los nanomateriales en esta categoría, cada uno debe evaluarse individualmente, ya que cualquier cambio en la composición química, tamaño o forma puede alterar su toxicocinética (Gebel et al., 2014). Por último, los nanomateriales pasivos, o biopersistentes sin propiedades toxicológicas específicas, incluyen a las NPs granulares y biodurables (GBP, por sus siglas en inglés). Su toxicidad no se debe a alguna interacción química de superficie y no disparan algún efecto celular específico, por el contrario, su toxicidad depende de la partícula por sí misma; además, no se mantienen bien dispersas en fluidos biológicos. A esta categoría pertenecen las NPs-TiO<sub>2</sub>, NPs de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y el negro de carbón, antiguamente se les llamaba sustancias inertes.

### 1.3. NPs de interés

Para este trabajo las NPs-Ag y NPs-TiO<sub>2</sub> son de interés debido a su abundancia y a que tienen diferentes mecanismos de nanotoxicidad. Durante la última década, estas NPs han sido las más utilizadas en productos a los cuales podemos estar fácilmente expuestos. Además, al estar clasificadas con mecanismos de toxicidad diferentes, se enriquece la comparación de sus efectos en modelos biológicos. A pesar de que ya se han asociado efectos tóxicos a ambas NPs, su estudio sigue siendo relevante por la variedad de factores que pueden influenciar estos resultados.

### 1.3.1. NPs de plata

La plata, símbolo químico Ag, es un conductor perteneciente a la familia de metales de transición. En su forma metálica, tiene una estructura cristalina cúbica centrada en las caras, en la Tabla I se enlistan otras de sus propiedades fisicoquímicas. Dentro de las NPs metálicas, las NPs-Ag son de las más manufacturadas y aplicadas comercialmente debido a sus propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas (He et al., 2019). La popularidad de las NPs-Ag se debe a su gran gama de aplicaciones. Se utilizan en el empacado de alimentos, suplementos alimenticios, textiles, electrónicos, electrodomésticos, cosméticos, dispositivos médicos y desinfectantes de agua, debido a sus propiedades antimicrobianas y plasmónicas (Schluesener et al., 2013). Estas últimas se refieren a la cuantización de las oscilaciones del plasma en la superficie de la plata.

La información de estudios en modelos *in vitro* indica que la plata es tóxica para células de mamíferos, sin embargo, la respuesta depende del tipo celular y del tipo de plata y/o NPs-Ag que entra en contacto con la célula (Fewtrell 2014). En el caso de la nanoplata, esta puede penetrar las células y generar citotoxicidad, posiblemente por alguno de los siguientes mecanismos: causando estrés oxidante, respuestas inflamatorias, daño molecular y al ADN, disrupción mitocondrial y cambios en la morfología celular (Rezvani et al., 2019). Como se mencionó anteriormente, las NPs-Ag pueden liberar iones durante un proceso de oxidación cooperativo, en el que es necesario la presencia de oxígeno y de protones disueltos. Durante este proceso se generan intermediarios de peróxido, generando ROS: Esto puede llevar a que las células estén expuestas a una mezcla dinámica y compleja de NPs, iones y complejos ion-ligando (Smith et al., 2018).

### 1.3.2. NPs de dióxido de titanio

El titanio, símbolo químico Ti, es el noveno elemento más abundante en la corteza terrestre. Debido a su gran afinidad al oxígeno y a otros elementos, el Ti no se encuentra en la naturaleza en estado metálico. El estado de oxidación más común para el Ti es el <sup>+</sup>4, donde se encuentra como dióxido de titanio (IV), presentando propiedades distintas a su estado elemental. El TiO<sub>2</sub> tiene tres estructuras cristalinas conocidas: la anatasa, el rutilo y la brookita (Allen et al., 2016; Pandey et al., 2018). Debido a su actividad fotocatalítica, la anatasa tiene un mayor número de aplicaciones industriales, pero, también es la forma más tóxica, puede producir ROS al ser irradiada con luz UV (Weir et al., 2012). Las NPs-TiO<sub>2</sub> han sido ampliamente estudiadas como agente desinfectante, así como aditivo alimenticio (pigmento de color blanco) y potenciador de sabor (He et al.,

2019). Además, se utilizan en protección ambiental en el tratamiento de aguas residuales o combustión de gas, como material antibacteriano para descontaminación, como catalizador en síntesis orgánica, en la ingeniería de construcción, en fármacos y dispositivos médicos, para la producción de pesticidas y fertilizantes, en el procesamiento y empaquetamiento de alimentos, y en cosméticos (Shi et al., 2013; Lim et al., 2015; Heringa et al., 2016; Jovanović et al., 2016; Samat et al., 2016; Pandey et al., 2018).

Algunos estudios han mostrado que NPs-TiO<sub>2</sub> pueden ser tóxicas y afectar negativamente el sistema cardiovascular (Baranowska-Wójcik et al., 2019). Pueden inducir especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), iniciando peroxidación de lípidos, disfunción mitocondrial, y degradación de ADN (Akter et al., 2018). Por consiguiente, esto genera respuestas inflamatorias y la sobreexpresión de citocinas inflamatorias en el torrente sanguíneo tras la exposición a las NPs-TiO<sub>2</sub> (Trouiller et al., 2009; Gui et al., 2011).

Propiedades	Ag	Ti	TiO <sub>2</sub>
fisicoquímicas			anatasa
Configuración	[Kr]	[Ar] 3d <sup>2</sup> 4s <sup>2</sup>	N/A
electrónica	4d <sup>10</sup> 5s <sup>1</sup>		
Punto de fusión (K)	1234.93	1943	2116
Punto de ebullición	2435	3560	3245
(K)			
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	10.5	4.506	4.26
Afinidad electrónica	125.62	7.62	153.41
(kJ/mol)			
Estructura cristalina	Cúbica	Hexagonal	Tetragonal
	centrada en las	compacta	
	caras		

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas de las NPs de interés.

### 1.3.3. Exposición a NPs

La masificación de la producción y uso de los nanomateriales propicia la exposición a ellos por distintas rutas (respiratoria, oral o dérmica), lo cual podría ser un riesgo potencial para la salud y el ambiente (Baranowska-Wójcik et al., 2019). Sin importar la ruta de exposición, es probable que tras la ingesta de NPs, éstas terminen en el torrente sanguíneo y en contacto con el sistema vascular (Cao et al., 2017; Baranowska-Wójcik et al., 2019; Rezvani et al., 2019). Sin embargo, se carece de datos nanotoxicológicos concluyentes sobre su impacto en las células sanguíneas y en tejidos endoteliales, así como los correspondientes mecanismos de daño.

La luz de los vasos sanguíneos está cubierta por una capa delgada de células endoteliales que juegan un papel muy importante en la regulación del tono vascular, en la trombogenicidad, homeostasis, reclutamiento de monocitos, y transporte de hormonas (Cao et al., 2017). El estudio de este tipo de células ha despertado interés debido a que son un probable primer punto de contacto y a que su interacción con las NPs podría ayudar a comprender los efectos *in vivo* (Setyawati et al., 2015). Debido a esto, en la nanotoxicología han surgido distintos modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para estudiar los efectos de las NPs en las células endoteliales.

A pesar de que las NPs-Ag pueden fácilmente pasar a través de la barrera hematoencefálica, hay poca información sobre sus diversos mecanismos de acción en la fisiología humana (Akter et al., 2018). Se ha visto que, en medio de cultivo, las NPs-Ag de 20 nm en concentraciones mayores de 9 mg/mL pueden generar más de 1 mg/mL de iones de plata en menos de una hora (Munusamy et al., 2915). Por otro lado, se ha reportado que la presencia de ciertos recubrimientos como la polivinilpirrolidona (PVP) puede disminuir la cinética de liberación de los iones de plata, disminuyendo su toxicidad (J. Liu et al., 2010; Y. Li et al., 2012; X. Wang et al., 2014). En células HepG2 y Caco2, la exposición a las NPs-Ag de 20 nm causa toxicidad dosis-dependiente, daño al ADN, disrupción mitocondrial y estrés oxidante (Jiao et al., 2014). En un estudio con NPs-Ag de distintos tamaños (5, 20 y 50 nm) en células A549, SGC-7901, HepG2 y MCF-7 se observó que los valores de la concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) son tamaño-dependiente y que a menor tamaño de partícula más sencillo es que entren a la célula (W. Liu et al., 2010). Las células HNEK tratadas con distintas concentraciones de NPs-Ag presentan

una disminución en la viabilidad, el metabolismo y el potencial de proliferación y migración (Szmyd et al., 2012).

Por otro lado, al exponer a la línea endotelial HMEC-1 a NPs-TiO<sub>2</sub> (rutilo) NPs de 3 y 30 nm, se encontró que causan 13 y 15% de citotoxicidad, respectivamente, y que ambas son genotóxicas (Bayat et al., 2015). En las células HEL-30, las NPs-TiO<sub>2</sub> anatasa de varios tamaños provocan necrosis y baja producción de ROS, mientras que en forma de rutilo se observa apoptosis y alta producción intracelular de ROS (Braydich-Stolle et al., 2009). Sin embargo, también se ha reportado apoptosis por acción del retículo endoplasmático (Koeneman et al., 2010) y autofagia por estrés oxidante (Hamilton et al., 2009; Mironava et al., 2010; Wu et al., 2011; Halamoda et al., 2012; Stern et al., 2012; Moosavi et al., 2016).

### 1.4. Modelos de estudio

### 1.4.1. Danio rerio

La mayoría de los estudios de toxicidad de las NPs se enfocan en las respuestas in vitro, mientras que la información de la toxicidad en organismos completos o in vivo es menor (Duncan 2011). El uso de vertebrados es necesario para poder detectar interacciones patofisiológicas complejas, pero algunos modelos presentan más complicaciones que otros. Por ejemplo, el uso de roedores y de primates no humanos es costoso, además de que tienen un desarrollo relativamente lento, su desarrollo embrionario es inaccesible y requieren de mucho espacio para su manejo (Haque et al., 2018). Por lo que el uso de vertebrados como el pez cebra (Danio rerio) destaca como una eficiente alternativa al ser una especie pequeña, de bajo costo y rápido desarrollo (Dooley et al., 2000; Haque et al., 2018). Asimismo, presentan una alta tasa de fecundación y una sola hembra puede producir hasta 300 huevos (Ribas et al., 2014). El pez cebra se ha usado por décadas como un excelente organismo modelo (Schnabel et al., 2019), el cual ha sido utilizado para el modelado de mecanismos bioquímicos y moleculares de enfermedades humanas (Nel et al., 2013). El pez cebra y el humano comparten el 70% de similitud en su genoma (Howe et al., 2013; Kettleborough et al., 2013), por lo que muchos procesos fisiológicos se conservan y son similares, incluyendo

el sistema vascular. Estos antecedentes validan el uso del pez cebra como modelo endotelial.

Este modelo ha sido utilizado para estudios nanotoxicológicos. En el caso de las NPs-Ag, los efectos adversos en organismos acuáticos dependen de la biodisponibilidad de los iones de plata libres (Rezvani et al., 2019). Varios estudios han indicado que los embriones de pez cebra absorben las NPs-Ag y presentan efectos en su desarrollo (Rezvani et al., 2019). Estudios en el pez cebra con NPs-Ag de 24 nm se observó genotoxicidad, estrés oxidante e inmunotoxicidad (J, Gao et al., 2015). Cuando los embriones de esta especie son expuestos a las NPs-Ag se generan cambios morfológicos como escoliosis y cuerpos cortos (Abramenko et al., 2018), anormalidades del ritmo cardiaco (Y. Gao et al., 2016), disminución de la supervivencia (Osborne et al., 2013), alteraciones en el tiempo de eclosión, inducción de proteínas pro-apoptóticas como Bax y citocromo C y disminución de proteínas antiapoptóticas como Bcl2 (I. Khan et al., 2019). La concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>) a las 48 h de exposición de NPs-Ag es de 2.9 mg/mL para adultos y de 2.7 mg/mL en embriones de pez cebra, en estos últimos se detectaron malformaciones; por otro lado, la LC<sub>100</sub> a las 96 h fue de 10.0 mg/mL (Kovrižnych et al., 2013).

Por otro lado, en embriones de pez cebra expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub> rutilo se observó una inhibición de la eclosión a 100 mg/mL; las NPs ingresaron a los embriones por endocitosis ya que se observaron invaginaciones y formación de vacuolas (Bayat et al., 2015). Con otras NPs-TiO<sub>2</sub> recubiertas con citrato, se observó toxicidad foto y dosis dependiente, y la disminución del tamaño de <del>la</del> partícula aumentó la producción de ROS. Otros autores han indicado que a dosis menores a 25 ng/mL no hay efectos tóxicos (Osborne et al., 2013). La LC<sub>50</sub> a las 48 h de exposición de NPs-TiO<sub>2</sub> es mayor a 1600 mg/mL tanto para adultos como para embriones, en ningún caso se reportaron efectos teratogénicos (Kovrižnych et al., 2013).

### 1.4.2. Células endoteliales humanas de cordón umbilical HUVEC

Las células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) se encuentran entre los modelos *in vitro* más usados para estudios en células endoteliales (Cao et al., 2017). A pesar de que las células HUVEC solo están presentes en una etapa breve de la vida humana, son células fáciles de obtener y requieren de poco mantenimiento (Marin et al., 2001; Baudin et al., 2007). Además, expresan marcadores endoteliales importantes como las moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la proteína de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y selectinas (molécula de adhesión), así como moléculas asociadas con la fisiología celular (Boerma et al., 2006; Caniuguir et al., 2016). A pesar de que no son células fagocíticas como los macrófagos, a las células HUVEC pueden ingresar las NPs mediante fagocitosis y macropinosis (Setyawati et al., 2015), aunque la principal ruta para la internalización de las NPs es la endocitosis mediada por clatrinas y caveolinas (Cao et al., 2017). Por estas razones, las células HUVEC son un buen modelo endotelial para estudiar su interacción con NPs, y se decidió utilizarlas en este estudio para complementar los resultados observados en el pez cebra.

Al igual que el pez cebra, ya existen estudios de toxicidad de nanomateriales en las células HUVEC. Se sabe que los iones de plata dañan membranas, inducen ROS y alteran la función mitocondrial, lo que resulta en la liberación de señales apoptogénicas y la subsecuente muerte celular (Almofti et al., 2003; J. Liu et al., 2010; Park et al., 2011; Beer et al., 2012; Gliga et al., 2014). En las células HUVEC, las NPs-Ag de 65 nm, en dosis de 1.5 a 2.5 mg/mL, inhiben la proliferación, causan daño celular, apoptosis e inflamación (J. Shi et al., 2014). En este estudio se determinó que el daño y la disfunción fueron provocadas por la vía de activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (IKK/NF- κB). En otro estudio en células HUVEC expuestas a NPs-Ag de 20-25 nm (0-100 mg/mL) también se encontró reducción en el número de células y aumento de células apoptóticas, además hubo cambios morfológicos y alteración del ciclo celular, generación intracelular de ROS, expresión de Bax, citocromo C, caspasa 3 y 9 y disminución de la expresión de Bcl2 (A. Kham et al., 2019). También se han hecho estudios en co-cultivos con células endoteliales utilizando las líneas EA.hy926, Calu-3 y Thp-1 expuestas a NPs-Ag esféricas de 50 nm ± 4 nm (3 y 30 mg/mL) donde se observó que las membranas de las células se encontraban comprometidas, así como una absorción y translocación efectiva de las NPs por el modelo de barrera (X. Zhang et al., 2019). También, con la línea celular endotelial EA.Hy926 expuesta a NPs-Aq <100 nm con cubierta de PVP, se encontraron cambios en la expresión de 299 genes por el método de electroforesis de dos dimensiones y análisis MALDI-TOF (Komorowski et al., 2019).

Al utilizar modelos in vitro e in vivo se tienen varias ventajas. Por un lado, el modelo *in vitro* asegura el contacto entre las NPs y las células endoteliales, al tiempo que permite medir las respuestas en ausencia de otros metabolitos y procesos *in vivo*. Por el contrario, el modelo de pez cebra permite simular las condiciones de un organismo, para tener un mejor acercamiento del impacto que las NPs pueden tener en el sistema vascular. En este trabajo se realizará un estudio comparativo de los efectos de las NPs-Ag y NPs-TiO<sub>2</sub>, las cuales tienen propiedades toxicológicas específicas y no específicas, respectivamente. Como modelo de estudio se utilizó el pez cebra, como un modelo *in vivo* endotelial reducido y se complementó con un sistema *in vitro* de células HUVEC. Con este estudio se pretende tener un mejor entendimiento sobre la respuesta en un tipo celular endotelial que generan las NPs activas y pasivas. Esto ayudará a dilucidar los efectos tóxicos que tendrán este tipo de NPs en los humanos, así como los posibles mecanismos de acción.

### 1.5. Justificación

La exposición a nanomateriales es cada vez más común debido a su producción y presencia en productos comerciales. Las NPs-Ag y las NPs-TiO<sub>2</sub> son de los nanomateriales más utilizados en este tipo de productos, por lo que la determinación de sus efectos tóxicos es esencial. Debido a las diferencias en los mecanismos de acción de estas NPs, se espera que también exhiban efectos tóxicos diferentes.

Indistintamente de la vía de exposición a las NPs, se ha reportado la presencia de éstas en vía sistémica, por lo que se considera importante evaluar su toxicidad en modelos endoteliales, debido a que éste será uno de los primeros puntos de contacto que tendrán al entrar en el torrente sanguíneo. Distintos estudios han reportado que las NPs-Ag y las NPs-TiO<sub>2</sub> generan estrés oxidante y muerte celular. Recientemente se estableció la caracterización de las NPs de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y en modelos comparativos. En este estudio se realizó la evaluación de su toxicidad en embriones de *Danio rerio*, un sistema *in vivo* reducido altamente utilizado para estudios toxicológicos que comparte similitudes en su sistema circulatorio con el del ser humano. Este se complementó con el uso de células HUVEC, un modelo *in vitro* de células endoteliales. Con esto se pueden comparar los efectos de las NPs en un organismo completo con la respuesta celular endotelial especifica.

## 1.6. Hipótesis

La exposición del embrión de pez cebra y células endoteliales de humano a NPs-Ag o NPs-TiO<sub>2</sub> disminuirá la viabilidad de acuerdo con sus mecanismos de toxicidad.

## 1.7. Objetivos

## 1.7.1. Objetivo General

Evaluar la viabilidad del embrión de pez cebra y de células endoteliales de acuerdo con los mecanismos de toxicidad de las NPs-Ag y NPs-TiO<sub>2</sub>.

## 1.7.2. Objetivos Específicos

- Realizar la caracterización fisicoquímica de las NPs-Ag y NPs-TiO<sub>2</sub>.
- Caracterización a las NPs-Ag y NPs-TiO<sub>2</sub> en una suspensión acuosa.
- Evaluar la viabilidad de los embriones de pez cebra después de la exposición a las NPs.
- Evaluar la viabilidad de las células HUVEC después de la exposición a las NPs.

### 2. MÉTODOS

### 2.1. Reactivos

Las NPs-Ag (99.99% Ag, 20 nm, con 0.2% de PVP) y las NPs-TiO<sub>2</sub> (99.98% anatasa, 30 nm, con PVP) se obtuvieron de *US Research Nanomaterials, Inc* (EUA), las células HUVEC de ATCC (EUA), los embriones de *Danio rerio* del Instituto de Biotecnología, (Cuernavaca, Mor., México), la *Sea Salt Instant Ocean* (EUA), la mezcla de nutrientes F-12K, la heparina, el suplemento para crecimiento de células endoteliales, y el DCFDA de Sigma-Aldrich (EUA), el suero fetal bovino, la penicilina-estreptomicina, la L-glutamina y el antimicótico de Gibco (EUA) y el *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* de Promega (EUA).

### 2.2. Diseño experimental

El siguiente trabajo está divido en tres etapas metodológicas, como se muestra en la Figura 2: I) Caracterización fisicoquímica: seca y húmeda de las NPs, II) Estudio *in vivo* usando el pez cebra como modelo, y III) Estudio *in vitro* en células humanas endoteliales de cordón umbilical (HUVEC). Después de la caracterización de las NPs, se prosiguió con las pruebas en los modelos biológicos para evaluar la viabilidad e inducción de efectos tóxicos.

### 2.3. Caracterización de las NPs

### 2.3.1. Caracterización fisicoquímica de las NPs

La caracterización fisicoquímica de las NPs-Ag (99.99% Ag, 20 nm, con 0.2% de PVP) y las NPs-TiO<sub>2</sub> (99.98% anatasa, 30 nm, con PVP) se realizó en la Unidad de CINVESTAV-Querétaro bajo la supervisión del Dr. Gabriel Luna. Las NPs fueron analizadas mediante difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia UV-vis (Vargas et al. 2019). En este trabajo llevamos a cabo la caracterización húmeda de los materiales, la cual consiste en determinar el comportamiento de las NPs en soluciones acuosas y se describe a continuación.



**Figura 1:** Etapas metodológicas realizadas en el siguiente trabajo: (arriba) caracterización seca y húmeda de las NPs, (centro) estudio *in vivo* en modelo de pez cebra, (abajo) estudio *in vitro* en células HUVEC.

## 2.3.2. Preparación y determinación de la estabilidad de las NPs en suspensión

## 2.3.2.1. Principio

La dispersión de las NPs en sistemas coloidales es bifásica, no se asienta con el tiempo y se caracteriza por el movimiento Browniano de las partículas. Esta dispersión es necesaria para realizar la evaluación de la toxicidad en modelos biológicos debido a que representa el comportamiento que las NPs podrían tener al interactuar con éstos. Esta debe de contar con las siguientes características: A) las NPs deben estar disgregadas y mantener un tamaño nanométrico; B) ser homogénea con respecto al

tamaño de la partícula; C) mantener la estabilidad de las NPs para evitar que éstas se aglomeren y se precipiten, la cual se determinan mediante la medición del tamaño de la NP, la polidispersión y la carga superficial. Para las NPs con carga ocurren interacciones entre las superficies, las moléculas y los iones llevando a la generación de capas de absorción en las mismas. Bajo estas condiciones, la dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) permite conocer el tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersión de las NPs (Bhattacharjee et al., 2016).

### 2.3.2.2. Procedimiento

Se preparó una suspensión stock de 1 000 µg/mL de cada NP en agua destilada. Las soluciones se dispersaron en baño de hielo con un pulso de 60, 90, 120, 150 o 180 s con un ultrasonicador de punta (GEX 130PB). Se tomó 1 mL de las dispersiones de NPs y se colocó en una celda desechable para determinar el diámetro hidrodinámico (DH) y el índice de polidispersión (PdI). De manera similar, 1 mL se utilizó para medir el ZP en una celda de capilaridad desechable. Las muestras se analizaron utilizando un Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instrument Ltd). Cada muestra se midió por triplicado. Se compararon los valores obtenidos para determinar el tiempo de dispersión.

Las NPs se dispersaron y se diluyeron para obtener una concentración final de 100 µg/mL de NPs en agua destilada, medio de mantenimiento de pez cebra o medio de cultivo de células HUVEC. Se midió el DH y PdI de cada dilución por 5 días consecutivos. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

### 2.4. Estudio in vivo

Los embriones de pez cebra son un modelo probado y ampliamente utilizado para toxicidad aguda, en los cuales ya se han realizado estudios de nanotoxicidad (Haque et al., 2018). Tiene la ventaja de tener un 70% de similitud con el ADN humano, además es de rápido desarrollo embrionario, y los huevos son suficientemente grandes y transparentes, para ser observados en microscopio.

# 2.4.1. Cuidado de los peces, recolección de los embriones de pez cebra y exposición

Los peces adultos *Danio rerio* se mantuvieron en un sistema de cultivo de flujo cerrado. El cuarto de cultivo se mantuvo a 28°C con un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h obscuridad y los peces fueron alimentados cuatro veces al día. Para obtener los embriones, los peces adultos fueron cruzados y durante el siguiente ciclo de luz se recuperaron los huevos. Estos fueron lavados, separados y cultivados en agua de embrión (Sea Salt Instant Ocean a 60 µg/mL en agua destilada) a 28°C por 4 h o hasta el estadio de esfera.

Se siguió el protocolo 236 de la OECD (OECD, 2013) de "Ensayo de toxicidad aguda en embriones" (FET) para la evaluación de los efectos tóxicos y teratogénicos. Los embriones en estadio de esfera se colocaron en una placa de 48 pozos, a una densidad de 10 embriones por pozo. El agua de embrión se retiró y se sustituyó por 300 µL de los tratamientos preparados de acuerdo con el apartado 2.4.2 de este trabajo, y se incubaron a 28°C. Usando un estereomicroscopio los embriones fueron monitoreados diariamente hasta por 72 hpf (horas post fertilización) registrando la viabilidad, eclosión y anormalidades del desarrollo.

### 2.5. Estudio in vitro

### 2.5.1. Cultivo celular y exposición a las NPs

La línea de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC por sus siglas en inglés) se cultivó en medio F-12 suplementado con 1 mg/mL de heparina, 1% de suplemento de crecimiento para células endoteliales, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de antimicótico y 20% de suero fetal bovino (SFB). Las células se propagaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, el medio se reemplazó cada 48 h, o 72 h si no se encontraban a una confluencia mayor al 50%. Las células HUVEC se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 12 000 células/cm<sup>2</sup>, con 100 µL de medio y se incubaron por 24 h. Las NPs se prepararon como se describió anteriormente, y se diluyeron en medio de cultivo con 1% de SFB. Se descartó el medio de cultivo y se sustituyó con 200 µL de NPs y se incubaron hasta por 24 h para la

evaluación de los parámetros de citotoxicidad. Las NPs se prepararon como se describió anteriormente y se diluyeron en medio de cultivo con 1% de SFB.

## 2.5.2. Ensayo de evaluación metabólica celular

## 2.5.2.1. Principio

Este ensayo permite medir el metabolismo mitocondrial utilizando la sal de tetrazolio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), el cual, indirectamente refleja el número de células viables y se interpreta como la viabilidad celular con respecto al control. El MTS es una sal de tetrazolio que es reducida a cristales morados de formazán por la enzima succinato deshidrogenasa de la mitocondria. La intensidad del color se correlaciona positivamente con el número de células viables. (Wang et al. 2010).

## 2.5.2.2. Procedimiento

Después de 6 y 24 h de exposición a las NPs, se retiraron 100  $\mu$ L del medio y se reservaron para el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). Se agregaron 10  $\mu$ L de *CellTiter 96 A Queous One Solution Cell Proliferation Assay* a cada pozo y se incubó por 2 h protegido de la luz a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. La absorbancia se midió a 490 nm usando el lector de placas Infinite®200 PRO (TECAN).

## 2.5.3. Detección intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS)

## 2.5.3.1. Principio

El 2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato acetil éster (DCFDA) es una sonda fluorescente sensible al peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el DFCDA pasa de ser un compuesto permeable no fluorescente a uno impermeable fluorogénico (DCF) por acción de esterasas inespecíficas (Khan et al., 2019).

## 2.5.3.2. Procedimiento

Se adicionó 2  $\mu$ L de DCFDA a cada pozo inmediatamente después de los tratamientos sin suero fetal bovino (SFB). Como control se añadió 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ M a un pozo con células sin exposición a las NPs. Se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por

0.5, 1, 3, 6 y 24 h con y sin NPs a las concentraciones antes mencionadas. Para cuantificar la fluorescencia se excitó a 515 nm y se midió a 480 nm.

### 2.6. Análisis de resultados

Todos los experimentos se realizaron por cuatriplicado en al menos tres experimentos independientes, y los resultados se expresan como promedios ± desviación estándar. El análisis y la significancia estadísticos se realizaron con el programa Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc.). La distribución normal de los datos se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre grupos se analizaron con ANOVA de una vía para los datos con distribución normal con prueba post-hoc Bonferroni, mientras que para aquellos con distribución no normal se usó la prueba de Kruskal Wallis. Se consideró que hay una diferencia estadísticamente significativa cuando p<0.05.

### 3. RESULTADOS

### 3.1. Caracterización de las NPs

### 3.1.1. Caracterización fisicoquímica de las NPs

La caracterización fisicoquímica de las NPs-Ag y de las NPs-TiO2 se realizó en la Unidad de Cinvestav-Querétaro. La morfología, el tamaño y el estado de aglomeración de las NPs se determinó con SEM (Fig. 3 a, b, e y f). Las NPs-Ag tienen mostraron una forma poliédrica y distribución de tamaño de 26 a 59 nm, con un máximo de 37 nm (Fig. 3 a, b). Por otro lado, las NPs-TiO<sub>2</sub> mostraron forma poliédrica, su tamaño está en el rango de 18 a 36 nm, con un máximo de partícula en 24 nm (Fig. 3 e y f). A pesar de que ambas NPs pasaron por un proceso de dispersión, se observaron aglomeradas, por lo que parte del siguiente trabajo se dedicó a su dispersión. En el análisis de DRX se muestran las estructuras de las NPs que son cristalinas, se observó que las NPs-Ag tienen la estructura perteneciente a la plata metálica y las NPs-TiO<sub>2</sub> se encuentran en fase anatasa (Fig. 3 c y g). Similarmente, la espectrofotometría UV-Vis confirmó las estructuras de ambas NPs (Fig. 3 d y h). Las NPs-Ag presentaron una banda de absorción con máximos en 368 y 426 nm, correspondiente con al plasmón de resonancia de la plata. Mientras que en las NPs-TiO<sub>2</sub> se identificó un único pico máximo a 282 nm, el cual es característico de la fase anatasa; además, se encontró la banda de energía prohibida que fue Eg = 3.07 eV.

### 3.1.2. Estabilidad de las NPs en suspensión

Para asegurar que las NPs no se encontraban agregadas cuando están suspendidas en el medio acuoso, las NPs fueron sonicadas por distintos intervalos para establecer el tiempo óptimo de dispersión. Mediante DLS se determinó el diámetro hidrodinámico y el PdI (Fig. 4). En ambas NPs se observó que el menor tamaño de partícula tiene un menor PdI, lo cual se presenta a los 60 s de sonicación, por lo que este tiempo se utilizó para dispersarlas en el resto del trabajo. Bajo estas condiciones se analizó la estabilidad de las NPs en el agua de embrión y en el medio F-12K hasta por 96 h (Fig. 5). En el agua de embrión, las NPs-Ag disminuyen ligeramente el PdI, mientras,



**Figura 3.** Caracterización fisicoquímica de las NPs-Ag (a-d)y NPs-TiO<sub>2</sub> (e-h). a-b, e-f) Micrografías de SEM que muestran la forma de las NPs y ayudan a determinar la distribución del tamaño. c) Análisis de DRX que comprobó la presencia de las NPs-TiO<sub>2</sub> en fase anatasa y g) las de NPs-Ag como plata metálica. d, h) La espectroscopia UV-Vis confirmó la composición de ambas NPs.



**Figura 4**. Determinación de tiempo de dispersión. Las NPs-Ag (rojo) y NPs-TiO<sub>2</sub> (verde) se dispersaron en agua destilada utilizando pulsos de sonicado de distinta duración. El diámetro hidrodinámico (línea continua) y el PdI (línea punteada) se utilizaron para establecer la estabilidad de la suspensión. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM.



**Figura 5**. Estabilidad de las NPs en a-b) agua de embrión y c-d) medio F-12K hasta por 96 h. Las NPs-Ag (rojo) y NPs-TiO<sub>2</sub> (verde) se dispersaron en agua destilada con un único pulso de 60 s, posteriormente se diluyeron en el medio correspondiente. El diámetro hidrodinámico (línea continua) y el PdI (línea punteada) se utilizaron para establecer la estabilidad de la suspensión. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM.

el tamaño permanece casi sin alteraciones (Fig. 5a). Para las NPs-TiO<sub>2</sub> estas aumentaron ligeramente su tamaño, al igual que el PdI (Fig. 5b).

### 3.2. Estudio in vivo

### 3.2.1. Sobrevivencia, eclosión y anormalidades del desarrollo

Los embriones de *Danio rerio* (pez cebra) se expusieron a 5, 15, 25, 50 y 100  $\mu$ g/mL de NPs-Ag y NPs-TiO<sub>2</sub> y se monitorearon cada 24 y hasta por 72 hpf con un estereomicroscopio (Fig. 6). Las NPs-Ag no modificaron la sobrevivencia de los embriones en ninguna de las concentraciones empleadas, no se alteró la tasa de eclosión



**Figura 6.** Sobrevivencia, eclosión y anormalidades del desarrollo en embriones expuestos a NPs. Los embriones se expusieron a distintas concentraciones de NPs-Ag (rojo) y de NPs-TiO<sub>2</sub> (verde) hasta por 72 hpf (a, c). Se cuantificó la eclosión de los embriones con ayuda de un estereomicroscopio (b, d). Los embriones tratados con NPs-TiO<sub>2</sub> desarrollaron edemas (e) y falta de pigmentación (f). Se realizaron tres experimentos independientes por cuadriplicado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM.



**Figura 7**. Desarrollo de embriones expuestos a NPs-TiO<sub>2</sub> hasta por 72 hpf. Se presentan imágenes de embriones que muestran la aparición de edemas (flecha amarilla) y falta de pigmentación (círculo rojo). Las fotografías fueron tomadas con la cámara AxioCam MRc 5 acoplada a un estereomicroscopio con los embriones eutanizados y colocados sobre una cama de agar.

de los embriones ni se observaron anormalidades morfológicas (Fig. 6: a y b). No obstante, se observó aglomeración de las NPs-Ag alrededor del corion en todas las concentraciones. De manera similar, las NPs-TiO<sub>2</sub> tampoco modificaron la sobrevivencia ni la eclosión de los embriones de manera significativa, sin embargo, se observaron alteraciones en el desarrollo embrionario (Fig 6: c- f). Los embriones expuestos a las NPs-TiO<sub>2</sub> modificaron su ritmo de eclosión, presentaron edemas, y presentan menos pigmentación que el grupo control (Fig. 6 c-f, Fig. 7). Estos cambios se observaron en las concentraciones altas, pero no en la máxima (Fig. 6 d-f). En la figura 7 se presentan fotografías representativas de estas observaciones, donde se puede observar el desarrollo de los embriones hasta las 72 hpf, tanto del grupo control como del grupo tratado en la concentración más alta. A las 24 hpf no hubo cambios morfológicos, sin embargo, a las 48 hpf ya es evidente la falta de pigmentación en todo el embrión, así como abultamientos entre la cabeza y el vitelo (Fig. 7 panel superior). A las 72 hpf la falta de pigmentación es más evidente en la zona del vitelio y en los ojos, asimismo el edema se ve más avanzado y parece estar modificando la función cardiaca (Fig. 7 panel inferior). Al no presentarse algún tipo de alteración en los embriones expuestos a las NPs-Ag, se decidió que las siguientes pruebas solo se realizaron con las NPs-TiO<sub>2</sub>, en las cuales hubo alteración de la eclosión y modificaciones morfológicas.

### 3.3. Estudio in vitro

### 3.3.1. Viabilidad

Las células HUVEC se expusieron a 5, 15, 25, 50 o 100  $\mu$ g/mL de NPs-Ag y de NPs-TiO<sub>2</sub> por 24 h, y se determinó la viabilidad mediante la actividad metabólica con MTS (Fig. 8). La exposición a las NPs-Ag disminuyó la actividad metabólica de manera dosisdependiente, a partir de la concentración 15  $\mu$ g/mL, se observó una disminución en la viabilidad por debajo del 50% (Fig. 8a) y se determinó una IC<sub>50</sub> de 11.42  $\mu$ g/mL. Por otro lado, las células tratadas con las NPs-TiO<sub>2</sub> también mostraron una disminución en la viabilidad donde la IC<sub>50</sub> determinada fue de 18.17  $\mu$ g/mL. El experimento se repitió con 1.25, 2.5, 5, 10 y 20  $\mu$ g/mL de NPs-Ag y se determinó la viabilidad a las 6 y 24 h (Fig. 9). A las 6 h de tratamiento, las células no mostraron algún cambio en su actividad



**Figura 8**. Citotoxicidad en células HUVEC por exposición a NPs. Las células HUVEC se expusieron a distintas concentraciones de NPs-Ag (rojo) y NPs-TiO<sub>2</sub> (verde) por 24 h. La actividad de metabólica de la célula se determinó con MTS. Se realizaron tres experimentos independientes por cuadriplicado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM.



**Figura 9.** Viabilidad de células HUVEC expuestas a las NPs-Ag. La actividad de las células se midió a las a) 6h y b) 24 h. Se realizaron tres experimentos independientes por cuadriplicado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM.

metabólica (Fig. 9 a). Congruentemente con lo observado en el experimento anterior, a las 24 h de exposición la viabilidad solo disminuyó en la concentración de 20 µg/mL (Fig. 9 b). De acuerdo con estos datos, la toxicidad de las NPs-Ag en células HUVEC es tiempo- y dosis-dependiente.



**Figura 10.** Determinación de condiciones para pruebas de viabilidad. Las células HUVEC fueron expuestas a los tratamientos por 6 h cuando se midió a) la actividad metabólica con MTS. b) La generación de ROS se midió a distintos tiempos con 1% de SFB midiendo la fluorescencia de DCFDA.

### 3.3.2. Generación de ROS

Para evaluar la generación ROS es necesario que la cantidad de SFB en el medio sea igual o menor al 1% con el propósito de aumentar la sensibilidad del modelo biológico. Por esto, se determinó la viabilidad de las células y la capacidad para generar ROS con medio al 0.5 y 1% de SFB (Fig. 10). Los resultados indican que con el SFB al 1% se disminuye un 20% la actividad metabólica, mientras que con 0.5% de SFB las células no son viables a partir de la concentración de 2.5 µg/mL (Fig. 10 a). Al evaluar el estrés oxidante mediante la fluorescencia de DCFH-DA, se observó que la mayor producción de ROS fue en la concentración de 10 µg/mL a las 3 h de exposición, donde la citotoxicidad es de 15% (Fig. 10 b). La generación de ROS en las células HUVEC expuestas a NPs-Ag fue tiempo- y dosis-dependiente.

### 4. DISCUSIÓN

El creciente uso de las NPs en productos accesibles para el consumidor aumenta el riesgo de exposición a ellas, por lo que analizar su toxicidad resulta imperativo. Debido a la gran diversidad de nanomateriales que existen actualmente, la categorización de éstos de acuerdo con su ruta de exposición, propiedades fisicoquímicas y modo de acción podría facilitar su evaluación toxicológica. En este trabajo se compararon los efectos de las NPs-Ag y de NPs-TiO<sub>2</sub>, las cuales tiene mecanismos tóxicos activos y pasivos, respectivamente, en modelos *in vivo* e *in vitro* del sistema cardiovascular. Nuestros resultados mostraron que las NPs-TiO<sub>2</sub> afectan el desarrollo embrionario del pez cebra. Mientras que en las células HUVEC, ambas NPs disminuyeron la viabilidad, aunque solo las NPs-Ag generaron ROS. Estos resultados resaltan la importancia de evaluar las distintas NPs en diversos modelos debido a las características particulares que cada uno presenta.

### 4.1. Caracterización de las NPs

### 4.1.1. Caracterización fisicoquímica de las NPs

Con el fin de evaluar el potencial tóxico de las NPs en sistemas biológicos, es necesario realizar una caracterización completa y precisa de las partículas. Ésta debe incluir las propiedades fisicoquímicas como la distribución de tamaño, forma, estado de dispersión y propiedades químicas (Powers et al., 2006). Por lo que, previo al estudio de la toxicidad de las NPs en el pez cebra y en las células HUVEC, se realizó la caracterización fisicoquímica en la Unidad de Cinvestav-Querétaro, por el grupo del Dr. Gabriel Luna Bárcena.

El análisis de SEM indicó que ambas NPs son poliédricas (Fig. 3 a), lo cual se ha visto que facilita su internalización en las células en comparación con otras formas menos redondeadas. Además, *in vivo* pueden tener preferencia a acumularse en otros tejidos, como el bazo (Adamo et al., 2017). El mismo análisis de SEM mostró que las NPs se encuentran aglomeradas a pesar de haber sido dispersadas por ultrasonido, efecto que es más evidente en las NPs-Ag. La aglomeración de las NPs puede disminuir su área superficial y aumentar el tamaño de la partícula, lo que podría resultar en una menor interacción con su medio. El estrés mecánico puede deshacer la aglomeración (Ashraf

et al., 2018), por lo que parte del siguiente apartado se dedicó a esta característica. Por otro lado, el tamaño determinado por SEM difiere con el especificado por el fabricante (Fig. 3 b). Las NPs-Ag tiene una amplia distribución de tamaño, casi dos veces mayor a la de las NPs-TiO<sub>2</sub> (Fig. 3 f). Las poblaciones de partículas con tamaño disperso dificultan el análisis nanotecnológico, ya que no se puede atribuir el efecto biológico observado a un tamaño específico de NPs. La dispersión de tamaño puede deberse a que las NPs se encuentren agregadas, y no solamente aglomeradas, es decir, formando colectivos de NPs fuertes y densos (Ashraf et al., 2018), aunque la amplia dispersión de tamaño también puede ser resultado del proceso de síntesis. Sin embargo, la presencia del PVP puede ocultar el tamaño real de las NPs-Ag, por lo que para poder eliminar el efecto del recubrimiento se sugiere realizar la caracterización por TEM.

La composición y estructura química se determinó con el análisis de DRX y se confirmó con la espectrofotometría UV-vis (Fig. 3 c-h). En el patrón de difracción se identificaron las estructuras de plata metálica y de TiO<sub>2</sub> anatásico, lo cual corresponde a lo especificado por el fabricante. En la curva de absorción UV-vis de las NPs-Ag se observa que hay poca definición de la banda de absorción de 426 nm, en conjunto con la baja absorbancia, lo que es un indicativo de interferencia, en este caso del recubrimiento de PVP. Asimismo, se ha reportado que un plasmón de resonancia con varios picos se debe a la presencia de NPs con tamaños y formas variadas, así como aglomeradas (I. Khan et al., 2019). Por el contrario, en el espectro de las NPs-TiO<sub>2</sub> sólo se identificó la banda correspondiente a la fase de anatasa, sin que hubiera interferencia del PVP. A partir de la espectrofotometría UV-vis se obtuvo la banda prohibida (bandgap) de las NPs-TiO<sub>2</sub>, la cual es la diferencia de energía entre la banda de valencia y la banda de conducción en semiconductores y aislantes. Se ha visto que la superposición de la banda prohibida con los niveles de potencial redox celular (-4.12 a -4.84 eV) está fuertemente correlacionado con la inducción de ROS, estrés oxidante, y efectos proinflamatorios en modelos in vitro e in vivo (H. Zhang et al., 2012). Sin embargo, en este caso, la banda prohibida de las NPs-TiO<sub>2</sub> no se superpone con el potencial redox celular. No obstante, nos permite confirmar la presencia de PVP en las NPs-TiO2. La banda prohibida reportada en la literatura para NPs-TiO2 en fase de anatasa con recubrimiento de PVP es de 3.08 eV (W. Wang et al., 2003).

De los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica en seco se aprecia que el PVP puede llegar jugar un papel importante tanto en la interacción entre las NPs individualmente, como con los modelos biológicos. El PVP es un polímero voluminoso no tóxico y no iónico conformado por una parte hidrofóbica y otra hidrofílica (Koczkur et al., 2015). Se utiliza para prevenir la aglomeración de las NPs debido a la fuerza repulsiva que proviene de sus cadenas hidrofóbicas de carbono al extenderse en el disolvente. Sin embargo, estas mismas cadenas pueden funcionar como aglutinante promoviendo la aglomeración, lo que explicaría el estado aglomerado observado en las NPs-Ag (Slistan-Grijalva et al., 2008; Koczkur et al., 2015). Por otro lado, se ha visto que concentraciones bajas de PVP en las NPs-TiO<sub>2</sub> puede aumentar su actividad fotocatalítica, lo que tendría repercusiones en los modelos biológicos (W. Wang et al., 2003). Asimismo, el uso de polímeros anfifílicos, como el PVP, puede prolongar el tiempo de circulación *in vivo*, al evitar la opsonización, lo que permite que aumente su capacidad para interactuar con el organismo (Adamo et al., 2017).

En este estudio, realizar la caracterización en seco de las NPs nos permitió identificar y confirmar las características fisicoquímicas de las NPs. Contar con una caracterización fisicoquímica completa de las NPs permite comparar los resultados obtenidos en este trabajo con otros. Es importante señalar que establecer estas características no es suficiente para predecir efectos tóxicos, pero ayuda a su interpretación.

### 4.1.2. Estabilidad de las NPs en suspensión

A pesar de que la mayoría de los efectos tóxicos de las NPs son resultado de las propiedades fisicoquímicas, éstas pueden modificarse al estar en un medio de cultivo o fluido fisiológico (Oberdörster et al., 2005; Deloid et al., 2017). En este tipo de ambiente las NPs pueden desarrollar una corona de proteínas que modifican el tamaño de partícula y su aglomeración (Stone et al., 2017; Mohammadinejad et al., 2019). En este trabajo se observó que el comportamiento de las partículas cambió dependiendo de la NP y del medio en el que se encontraran.

Debido a que las NPs mostraron tendencia a la aglomeración de acuerdo con la caracterización fisicoquímica, fue importante asegurar su dispersión en los medios de exposición. Se optó por la técnica de sonicado con punta ya que presenta ventajas en

comparación con otras. Esta técnica tiene alta intensidad de sonicado y tiene mayor eficiencia que el sonicador de baño. Además, estas características permiten resultados reproducibles, en los que se pueden controlar parámetros como la amplitud y la temperatura. Las NPs se dispersaron en agua destilada a distintos períodos de tiempo con un sonicador de punta y se midió el tamaño hidrodinámico y el PdI por DLS (Fig. 4). El primero indica el tamaño de las NPs estando en una solución acuosa, incluyendo el núcleo inorgánico, el recubrimiento y la capa de solvente que se adhiere a la superficie. Mientras que el PdI describe la distribución de tamaño de las NPs en el medio, y es un indicador de la precisión de la medición, ya que el DLS tiene limitantes al analizar grupos con altos PdI (Cleland et al., 2016). Se determinó que el mejor tiempo de sonicado es aquel en el que se obtiene el menor tamaño hidrodinámico con el menor PdI. En este punto se espera que las NPs estén lo más dispersas posible y que la distribución de tamaño sea angosta.

Una vez que se tiene a las NPs dispersas, estas se diluyeron en el agua de embrión o en el medio de cultivo celular F-12K, donde no se modificó su comportamiento de manera significativa (Fig. 5). Las NPs-Ag disminuyeron su diámetro hidrodinámico en ambos medios, siendo el cambio más drástico en el agua de embrión. La reducción en el tamaño puede deberse a que al ser una NP activa puede perder masa en forma de iones (Gebel et al., 2014; Akter et al., 2018; I. Khan et al., 2019). Por otro lado, el contenido de proteínas en el medio F-12K podría estar ocultando la degradación de las NPs-Ag, por conformar en él un mayor tamaño de corona de proteína. En cambio, las NPs-TiO<sub>2</sub> aumentaron de tamaño, lo cual se puede relacionar con que al ser una NPs pasiva, la interacción de su superficie con su ambiente es mínima (Gebel et al., 2014; Arts et al., 2015). Sin embargo, la diferencia de tamaño también podría ser producto de la formación de la corona de proteína, ya que el mayor tamaño de diámetro hidrodinámico se encuentra cuando las NPs están en medio F-12K. Aun así, con los parámetros medidos en estas condiciones, las NPs se mantyvieron del mismo tamaño y con la misma dispersión durante toda la exposición.

### 4.2. Estudio in vivo

Una vez establecidas las características intrínsecas de las NPs y su comportamiento en los medios de exposición, se prosiguió a la evaluación de su toxicidad

30

en embriones de pez cebra. Este modelo *in vivo* es ampliamente utilizado para estudios preclínicos y toxicológicos debido a sus similitudes con la biología de mamíferos, principalmente en su sistema cardiovascular, nervioso y digestivo. Además de demostrarse que el pez cebra puede emplearse para predecir efectos en mamíferos, presenta ventajas como ser pequeño, de fácil manejo y rápido desarrollo (Haque et al., 2018). En las pruebas realizadas en este trabajo no se vio alterada la viabilidad ni la tasa de eclosión en los embriones expuestos a estas NPs, sin embargo, las NPs-TiO<sub>2</sub> generaron anormalidades en el desarrollo.

### 4.2.1. Sobrevivencia, eclosión y anormalidades del desarrollo

De acuerdo con la literatura, se esperaba que las NPs-Ag provocaran la muerte y alteraciones morfológicas, por ser NPs activas con liberación de iones plata (Ag<sup>+</sup>) (Lee et al., 2007; I. Khan et al., 2019). La falta de efectos puede deberse a que la agregación de las NPs-Ag evitó que hubiera una respuesta (Fig. 6 a-b). Principalmente debido a que en la caracterización fisicoquímica se advierte la tendencia a la agregación y aglomeración de estas NPs. En los experimentos realizados se observó una acumulación de las NPs-Ag en el corion, por lo que se presume que no lograron interactuar con el embrión como se esperaba. El corion es una membrana acelular que recubre al embrión hasta las 72 hpf, tiene un espesor de 1.5-2.5 µm y está compuesto de tres capas perforadas por canales de poros de 0.5 a 0.7 µm (Bonsignorio et al., 1996; Pelka et al., 2016). Aunque la permeabilidad del corion ha sido pobremente caracterizada, algunos reportes han indicado que puede actuar como una barrera impidiendo el ingreso de las NPs metálicas (Mandrell et al., 2012). En otros estudios se ha reportado que del total de las NPs-Ag a las que se expone un embrión de pez cebra, ~65% se encuentra asociado al corion. Esto puede deberse a la agregación de las NPs-Ag o a cambios de especie por efecto de la sal del medio. Según Lee et al. (2007), las NPs-Ag se difunden a través de los poros del corion por movimiento Browniano, y pueden permanecer en el poro entre 0.1 a 15 s. Sin embargo, algunas NPs pueden permanecer atrapadas por tiempos prolongados en los poros, fungiendo como sitios de nucleación y agregación para otras NPs. Eventualmente, esto da formación a las NPs-Ag de mayor tamaño que pueden obstruir los canales, negando el tránsito a otras NPs (Lee et al., 2007).

Por otro lado, una falta de biodisponibilidad de Ag<sup>+</sup> también pudo evitar que hubiera efectos observables. Aunque se estima que la disolución de la plata es de hasta 38% en el agua de embrión (Böhme et al., 2017), en este trabajo fue menor a 27%, investigaciones previas mostraron que la presencia de sales modifica su especiación. Dado que los Ag<sup>+</sup> pueden actuar como análogo de Na<sup>+</sup> al interactuar con ligandos aniónicos, se facilita la transición de Ag<sup>+</sup> a sales de cloro (CI) (Galvez et al., 1997). Debido a que los complejos Ag-CI negativamente cargados tienen menor afinidad por las membranas biológicas en comparación con los complejos de Ag<sup>+</sup> positivamente cargados, su biodisponibilidad para traspasar la membrana disminuye (Auffan et al., 2014). Otros estudios mostraron que la oxidación y la disolución de las NPs-Ag es inhibida por la precipitación del ion CI<sup>-</sup> en sus superficies formando una capa de AgCI, esto significa que hay una menor cantidad de Ag<sup>+</sup> disponible (Ho et al., 2010; X. Li et al., 2010). Similarmente, el recubrimiento de PVP también puede disminuir la biodisponibilidad de los Ag<sup>+</sup> mediante la formación de los complejos O- Ag<sup>+</sup>+ o N- Ag<sup>+</sup> (X. Wang et al., 2014).

En resumen, la falta de efectos en los embriones de pez cebra expuestos a las NPs-Ag observados en nuestro estudio puede ser resultado de factores como: 1) la agregación de las NPs obstruyendo los poros; y 2) la poca biodisponibilidad de los Ag<sup>+</sup> por cambios en la especiación y por la formación de complejos con el PVP. A pesar de esto, se espera que un porcentaje de las NPs-Ag logró penetrar el corion para interactuar con el embrión, aunque no fue lo suficiente para generar una respuesta. Por esto no se excluye la posibilidad de que existan efectos más sutiles en órganos que no fueron analizados en este trabajo, o que tengan algún impacto en etapas más maduras del desarrollo del pez cebra.

Por el contrario, los embriones expuestos a las NPs-TiO<sub>2</sub> sufrieron anormalidades en el desarrollo (Fig. 6 e-d). De acuerdo con otros estudios, estas NPs no afectaron la viabilidad ni la tasa de eclosión de los embriones (Y. J. Wang et al., 2014; Tang et al., 2019), pero generaron efectos reportados previamente como edemas y falta de pigmentación (M. Kim et al., 2017; Chakraborty et a., 2016). Las respuestas observadas muestran una tendencia ascendente, excepto en las concentraciones más altas, donde los efectos son menos severos. Esto puede ser producto de aglomeración por un mayor número de NPs. La concentración inicial de las NPs-TiO<sub>2</sub> influye en sus arreglos de aglomeración y en el tiempo de contacto. En un estudio realizado por Shih et al. (2016) se reportó que en concentraciones menores a 80 µg/mL, las NPs-TiO2 atraviesan rápidamente el corion en las primeras 2 h de exposición. Posterior a esto, el flujo de las NPs disminuye, no obstante, el tiempo de contacto con el corion aumenta, posiblemente atribuible a la formación de aglomerados (Y. J. Wang et al., 2014; Shih et al., 2016). Estos aglomerados podrían estar generando un efecto similar a lo observado en los embriones expuestos a las NPs-Aq, donde la falta de respuesta en la concentración más alta puede deberse a la obstrucción de los poros del corion. Por lo anterior, a concentraciones altas de las NPs, se reducen las probabilidades de interactuar con el embrión por efecto de la aglomeración. Una vez dentro del embrión las NPs-TiO<sub>2</sub> pueden distribuirse a través del tejido de los embriones, hasta en tamaños de 1 µm (K. Kim et al., 2014). Incluso se ha reportado que estas NPs pueden cruzar la barrera hematoencefálica (Chakraborty et al., 2016), sin embargo, otros estudios han demostrado que las NPs-TiO<sub>2</sub> tienen bajo potencial para ser internalizadas por el pez cebra (Faria et al., 2014), sugiriendo que los efectos observados pueden deberse a la generación de ROS.

Las NPs-TiO<sub>2</sub> utilizadas en este trabajo son fotocatalíticas, absorben fotones y producen pares hueco-electrón que interactúan con el agua y el oxígeno formando ROS. Por lo anterior, tienen la capacidad de inducir estrés oxidante y generar muerte celular en los embriones de pez cebra (Bar-ilan et al., 2012; Ma et al., 2013; M. Kim et al., 2014; Shih et al., 2016; Chakraborty et al., 2016). Se ha reportado que las NPs-TiO<sub>2</sub> aumentan los niveles de la enzima superóxido dismutasa en las primeras 24 h de exposición y que pueden generar ROS sin que sea necesaria la presencia de luz (Faria et al., 2014). Además, se ha observado que las NPs-TiO<sub>2</sub> pueden ser genotóxicas en concentraciones mayores a 0.1  $\mu$ g/mL (Rocco et al., 2015). Como parte de los efectos observados, la falta de pigmentación afectó la cantidad e intensidad de las manchas en el cuerpo del pez cebra, pero también la coloración del ojo (Fig. 7). El desarrollo de ojos grises, en lugar del negro característico, se ha asociado con el aumento en la expresión de los genes *p53* y *bax* (K. Tim et al., 2013), lo que sugiere que las NPs-TiO<sub>2</sub> pueden generar muerte celular, probablemente por la vía de apoptosis. La pigmentación puede alterarse debido a distintos factores como la temperatura (Kulkeaw et al., 2011), radiación ionizante (Y.

Wang et al., 2018), y la presencia de NPs (K. Kim et al., 2013; Haque et al., 2018). Por lo que la disrupción en los patrones de pigmentación puede ser consecuencia del estrés oxidante (Gong et al., 2018). Las diferencias en la pigmentación de los embriones podrían indicar que se encuentran en etapas distintas del desarrollo, lo cual podría deberse a la que las NPs-TiO<sub>2</sub> provocan un retraso en la pigmentación, o la falta de sincronización en los embriones, sin embargo, en este trabajo esto último es poco probable debido a que los embriones fueron seleccionados individualmente para asegurar que estuvieran en la misma etapa de desarrollo, por lo que el retraso en el desarrollo embrionario puede ser atribuible a su interacción con las NPs-TiO<sub>2</sub>.

A pesar de no ser significativa, la presencia de edema en el corazón de los embriones puede ser indicativo de daño al sistema cardiovascular. La aparición de edemas ha sido previamente adjudicada a la presencia de ROS, aunque también podrían ser producto de la interferencia física por las NPs-TiO<sub>2</sub> (Ma et al., 2013). Esto último se respalda con el hecho de que las NPs pasivas no permanecen dispersas en fluidos biológicos (Arts et al., 2015), lo que significa que las NPs-TiO<sub>2</sub> se agregan hasta ingresar al embrión, provocando obstrucción en el sistema cardiovascular. Por otro lado, la exposición repetida a bajas dosis de NPs-TiO<sub>2</sub> produce toxicidad acumulativa que resulta en mortalidad después de varias semanas (M. Kim et al., 2014). A pesar de que la viabilidad no se alteró, malformaciones como edemas podrían afectarla en el futuro. De acuerdo con lo observado y la literatura consultada, la falta de pigmentación puede ser una respuesta al estrés oxidantes y a la muerte celular generados por las NPs-TiO<sub>2</sub>. Mientras que, el edema puede tener la misma causa que la pigmentación, no se excluye que pueda ser consecuencia de la obstrucción de las NPs-TiO<sub>2</sub> en el sistema cardiovascular. La falta de efectos en la concentración más alta se atribuye a la aglomeración de las NPs en el exterior del corion.

En una comparación entre las NPs utilizadas en este estudio, la diferencia de efectos observados en los embriones puede atribuirse al tipo de NP a la que se expusieron. De acuerdo con la caracterización húmeda, ambas NPs tenían el diámetro hidrodinámico adecuado para atravesar el corion, por la que la aglomeración observada pudo deberse a la interacción con material orgánico presente en el medio que puede aumentar el tamaño hidrodinámico de las NPs-Ag (Lowry et al., 2012). Aunado en esto,

las NPs-Ag utilizadas tienen mayor tendencia a la agregación que las NPs-TiO<sub>2</sub>, conforme a la caracterización en seco. Además, las NPs-Ag perdieron su capacidad como NP activa por el alto contenido de sales en el medio, lo cual pudo promover su disolución. Aunque son necesarias otras pruebas para verificar la especiación de la plata en el agua de embrión. En cambio, las NPs-TiO<sub>2</sub> solo sufrieron aglomeración en la concentración más alta, lo que facilitó que a dosis menores pudieran interactuar con el embrión. El carácter fotocatalítico tuvo un papel importante en la inducción de la toxicidad por la generación de ROS que podría haber conducida a la muerte celular y genotoxicidad. De igual modo, la aparición de edemas por obstrucción es posible debido su carácter biopersistente. Debido a que gran parte de los resultados pueden adjudicarse a la interferencia del corion con las NPs, se propone realizar exposiciones en embriones decorionados. También se sugiere ampliar la observación de las respuestas del pez cebra a otros órganos y en periodos mayores de tiempo. A pesar de la necesidad de más pruebas para aseverar los efectos observados, el modelo de embrión de pez cebra resultó efectivo para la evaluación nanotoxicológica en este trabajo.

### 4.3. Estudio in vitro

Pese a que las NPs no afectaron la viabilidad del pez cebra, no se descarta la posibilidad de que se haya afectado el sistema cardiovascular. El estudio *in vitro* permite tener un mejor acercamiento sobre la interacción que tendrían las NPs en el endotelio vascular, en el que los mecanismos de un organismo entero no intervienen. Las células HUVEC son un modelo *in vitro* confiable y sencillo de células endoteliales para predecir y evaluar la toxicidad de las NPs en el endotelio vascular (Cao et al., 2017). Al exponer las células HUVEC a las NPs en las mismas concentraciones que en los embriones de pez cebra se detectó una mayor sensibilidad de este modelo, determinada por la disminución de la viabilidad en las células y por la generación de ROS.

### 4.3.1. Viabilidad

Ambas NPs disminuyeron la viabilidad de las células de manera dosisdependiente, aunque las NPs-Ag fueron más agresivas (Fig. 8). Las células HUVEC disminuyeron la actividad metabólica a menos de la mitad en concentraciones mayores a 5 µg/mL, hasta llegar a menos del 10% de viabilidad en las dosis más altas. Por el contrario, la actividad metabólica de las células expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub> disminuyó de manera paulatina, donde en la concentración máxima las células tenían el 30% de la viabilidad. De acuerdo con las características de las NPs, los efectos observados eran los esperados, ya que las NPs activas suelen tener efectos más agudos que las pasivas (Gebel et al., 2014; Arts et al., 2015). Aunque se espera que ambas NPs induzcan la muerte celular vía apoptosis (Cao et al., 2017; Rahmani et al., 2018; Mohammadinejad et al., 2019), la diferencia en la potencia del efecto puede deberse a que lo hagan por distintos mecanismos. Se ha sugerido que las NPs-TiO<sub>2</sub> la inducen la muerte celular mediante la desestabilización de la membrana lisosomal y la peroxidación de lípidos por causa de la alta generación de ROS (Hussain et al., 2010). Mientras que, para las NPs-Ag se propone que las ROS provocan arresto celular y disrupción mitocondrial (I. Khan et al., 2019). Esto explicaría porque las NPs-Ag ocasionan mayor daño en el metabolismo celular.

Las IC<sub>50</sub> determinadas en este trabajo fueron inferiores a lo esperado, ya que este valor fue entre 2 y 3 veces más bajo de acuerdo con otros reportes en células HUVEC (Ucciferri et al., 2014). Las IC<sub>50</sub> son incluso menor si se contrastan con otras líneas celulares que pueden tener valores casi 6 veces más grandes para las NPs-Ag (Çiftçi et al., 2013) y casi 300 veces para las NPs-TiO<sub>2</sub> (Sha et al., 2013). Lo anterior apunta a que el endotelio vascular es especialmente sensible a la exposición a NPs, pudiendo tener mayores repercusiones en exposiciones repetidas o por tiempos prolongados. Por otro lado, la presencia del PVP pudo incrementar la toxicidad. Según la caracterización fisicoquímica de este trabajo, el recubrimiento de PVP aumentó la actividad fotocatalítica de las NPs-TiO<sub>2</sub> promoviendo la generación de ROS. Asimismo, se ha observado que las NPs recubiertas con PVP son más fácilmente absorbidas por las células endoteliales e inducen significativamente el incremento de apoptosis (Mohamed et al., 2017).

### 4.3.2. Generación de ROS

En tiempos menores de exposición a las NPs-Ag, la viabilidad de las células HUVEC permanece inalterada (Fig. 9), por lo que se decidió utilizar un rango menor de concentración y de tiempo para evaluar la generación de ROS. A causa de que el protocolo para este ensayo indica que el SFB no debe ser mayor al 1% se repitió el ensayo de viabilidad con la concentración indicada. Al exponer a las células HUVEC a

las NPs con el SFB al 1% se observó una disminución del 20% de la viabilidad para todas las concentraciones (Fig. 10 a). En contraste, la viabilidad disminuyó abruptamente cuando la exposición se llevó a cabo con el SFB al 0.5%; sin embargo, la viabilidad de las células que no se expusieron a las NPs-Ag, pero si a la falta de SFB se mantuvo al máximo. Con esto se aseguró que las células HUVEC siguen siendo viables hasta por 24 h a concentraciones menores o iguales a 1% de SFB. Se decidió realizar la determinación de ROS a la concentración de 1% de SFB debido que la mayoría de las células seguían siendo viables incluso con las NPs-Ag. La generación máxima de ROS se reportó a las 3 h para todas las concentraciones evaluadas menos la más alta de 15 µg/mL (Fig. 10 b). Esto podría atribuirse a que su pico máximo se encontraba en un tiempo en el que no se realizó una medición. No obstante, el hecho de que todos los puntos de esta medición se encontraban por debajo del control, indica que es más probable que las células en esas condiciones no tuvieran la capacidad de inducir la generación de ROS en esas condiciones.

Acorde con la literatura, las NPs-Ag pueden inducir la generación de ROS en las células HUVEC. Las NPs-Ag pueden cruzar la membrana celular y localizarse en el citoplasma, donde en concentraciones mayores a 1 µg/mL pueden aumentar la citotoxicidad (J. Shi et al., 2014). Esto se ha visto que lleva al aumento de ROS que culmina con la muerte celular vía apoptosis (Ucciferri et al., 2014). En el caso de las NPs-TiO<sub>2</sub>, la generación de ROS depende de la estructura cristalina, puesto que al utilizarse rutilo no se modifican los niveles de ROS intracelular (Bayat et al., 2015)., pero al haberse trabajado con NPs-TiO2 en fase anatasa se hubiera esperado que produjeran niveles similares, o incluso mayores, de ROS que las NP-Ag. Con estos resultados se confirma la generación de ROS como parte del mecanismo de toxicidad de las NPs-Ag, sustentando la teoría de que estas NPs pueden desencadenar la muerte celular vía apoptosis. Sin embargo, estos datos deben considerarse con reserva debido a que las condiciones experimentales son distintas. El rico contenido proteico que aporta el SFB en las condiciones iniciales permite la generación de una corona de proteína que secuestra por mayor tiempo a las NPs-Ag (Escamilla-Rivera et al., 2016; Baer et al., 2018), razón por la cual a las 6 h no se observan cambios en la viabilidad. Para poder comparar los efectos es necesario realizar las mediciones de la viabilidad y la

determinación de la IC<sub>50</sub> con el SFB al 1%. Con esto se esperaría reducir la concentración del tóxico y los tiempos empleados paras observar efectos.

En resumen, ambas NPs alteraron la viabilidad de las células HUVEC, aunque solo se pudo determinar la generación de ROS por parte de las NPs-Ag. Por lo que en el caso de las NPs-Ag, la muerte celular se puede relacionar con la generación de ROS. Es necesario realizar más pruebas para confirmar la generación de ROS por parte de las NPs-TiO<sub>2</sub>. De acuerdo con otros autores, la diferencia en la potencia de los efectos podría deberse a que el mecanismo de toxicidad es distinto. Es difícil comparar los modelos utilizados entre sí, ya que el embrión de pez cebra al ser un organismo cuenta con mecanismo de defensa que las células en cultivo no tienen. Esto sostiene la hipótesis de que las NPs provocan efectos según su mecanismo de toxicidad. En este sentido, las células HUVEC resultaron ser un modelo más sensible a las NPs que el embrión de pez cebra, teniendo en cuenta que se utilizaron las mismas concentraciones en un tiempo menor de exposición. Con este estudio se resaltó la importancia de realizar la caracterización completa de las NPs, tanto seca como húmeda. Al analizar los efectos biológicos se observó que gran parte de estos pueden ser atribuidos a las características fisicoquímicas de las NPs (Tabla II). En el caso de las NPs-Ag, se confirma que son activas debido a su capacidad de liberación de iones y su alta reactividad. El primero fue confirmado por su estructura cristalina que corresponde a la plata metálica, la cual es la que puede liberar iones. Además, el DH de las NP-Ag disminuyó al estar en el agua de embrión, probablemente por la pérdida de masa en forma de iones. Sin embargo, la alta reactividad de las NPs-Ag solo pudo probarse en las células HUVEC, ya que el recubrimiento de PVP generó interferencia en el pez cebra. Por otro lado, las NPs-TiO2 se clasifican como pasivas principalmente por su biopersistencia. Esta se comprobó con la determinación del DH que muestra un ligero aumento en ambos medios, así como su tendencia a la aglomeración. La posible obstrucción del endotelio vascular en el modelo de pez cebra, también puede ser consecuencia de ser una NP pasiva. A pesar de que muestra cierta reactividad por su capacidad fotocatalítica, no se considera una cualidad de activa, ya que no se trata de una característica de superficie.

NPs-Ag		NPs-TiO <sub>2</sub>	
Característica	Efecto biológico	Característica	Efecto biológico
Forma poliédrica	Facilitó el ingreso de las NPs a la célula	Forma poliédrica	Facilitó el ingreso de las NPs a la célula
Alto estado de aglomeración y de agregación	Disminuyó la interacción con su medio Promovió la acumulación en el corión	Bajo estado de aglomeración	Se aglomeraron a concentraciones altas Pudo aumentar la aglomeración dentro del pez cebra generando obstrucción
Diámetro de 28 a 59 nm, alta dispersión de tamaño	Dificulta atribuir los efectos observados a un tamaño de partícula especifico	Diámetro de 18 a 36 nm, baja dispersión de tamaño	Facilitó su ingreso a través de los poros del corion
Estructura cristalina correspondiente a plata metálica	La liberación de Ag <sup>+</sup> pudo generar ROS La presencia de sales disminuyó la biodisponibilidad de Ag <sup>+</sup>	Estructura cristalina correspondiente deTiO₂ anatásico	Generó ROS por actividad fotocatalítica

**Tabla II.** Comparación de características fisicoquímicas y efectos esperados.

Al revisar la literatura existente, resalta la gran cantidad de discrepancias e inclusive contradicciones que hay sobre la toxicidad de las NPs. La causa de estas inconsistencias no es clara (Cao et al., 2017), por lo que se ha sugerido que es necesario identificar y controlar los parámetros relevantes que permitan la reproducibilidad de la toxicidad de las NPs, tanto *in vivo* como *in vitro* (Azhdarzadeh et al., 2015). Esto permitiría tener un mejor consenso sobre la información existente.

Tabla II. Continuación.

NPs-Ag	NPs-TiO <sub>2</sub>		
Característica	Efecto biológico	Característica	Efecto biológico
Recubrimiento de PVP	Promovió la aglutinación de las NPs	Recubrimiento de PVP	Pudo aumentar la actividad fotocatalítica
	Pudo aumentar su tiempo de circulación en el pez cebra		Pudo aumentar su tiempo de circulación en
	Disminuyo la biodispopibilidad de Agt		el pez cebra Facilitó el ingreso de las
	Facilitó el ingreso de las NPs a la célula		NPs a la célula
Bandgap	N/A	Bandgap	No interfiere con el
N/A		Eg = 3.07 eV	potencial redox celular, no se espera inducción de ROS por esta vía
El DH disminuyó 26.8% en agua de embrión	Probablemente por la liberación de Ag⁺ al medio	El DH aumentó 15.5% en agua de embrión	Posible aglomeración en agua de embrión
El DH aumentó 33.5% en medio F-12K	Posible aglomeración y/o formación de corona de proteínas	El DH aumentó 7.6% en medio F-12K	Posible aglomeración y/o formación de corona de proteínas

En conclusión, este trabajo contribuyó para confirmar que la categorización de las NPs como activas o pasivas puede ayudar para predecir los efectos observados, ya que las NPs-Ag mostraron el comportamiento característico de las NPs pasivas al liberar Ag<sup>+</sup>, disminuir su DH en el agua de embrión y tener alta reactividad de superficie en las células HUVEC. Mientras que las NPs-TiO<sub>2</sub> tienen efectos pasivos al ser biopersistentes en ambos medios, carecen de un efecto celular específico, y pudieron obstruir el endotelio vascular del pez cebra. Además, se recalcó la importancia de realizar una categorización completa previo a la exposición de sistemas biológicos. Puesto que ésta ayudó a

interpretar las repercusiones toxicológicas que estas NPs tienen por sus características fisicoquímicas. Por último, se evidencia que la exposición a estas NPs podría tener repercusiones al endotelio vascular humano de llegar a estar en contacto con este.

### 5. CONCLUSIONES

Este trabajo se enfocó a identificar si las NPs-Ag y las NPs-TiO<sub>2</sub> alteraban la viabilidad de embriones de pez cebra y de células endoteliales de acuerdo con sus mecanismos de toxicidad.

- 1) Al exponer a los dos modelos a las NPs de Ag o TiO<sub>2</sub>, no se modificó la viabilidad de los embriones de pez cebra, mientras que la viabilidad sí disminuyó en las células HUVEC. Sin embargo, se sugiere que la causa de los efectos observados es diferente para cada NP. Se esperaba que las NPs-Ag y las NPs-TiO<sub>2</sub> tuvieran efectos tóxicos propios de las NPs activas y pasivas, respectivamente. Por lo que las NPs-Ag debían tener efectos más severos que las NPs-TiO<sub>2</sub>, por la acción de los Ag<sup>+</sup>.
- El trabajo fue complementado con la caracterización seca y húmeda de las NPs, que permitió identificar los aspectos más relevantes para poder interpretar los efectos biológicos observados.
- 3) Nuestros resultados indicaron que las NPs-Ag no tuvieron un efecto en el modelo *in vivo*, probablemente por la falta de biodisponibilidad por la agregación y cambio de especiación de la plata. Mientras que, en las células, el medio permitió que los iones de Ag<sup>+</sup> generaran ROS, alterando la viabilidad.
- 4) Por el otro lado, la exposición a NPs-TiO<sub>2</sub> se relacionó con la aparición de edemas y falta de coloración. Esto aumentó la hipótesis de que las NPs-TiO<sub>2</sub> pueden alterar el endotelio vascular y generar muerte celular en el pez cebra.
- 5) La viabilidad de las células HUVEC disminuyó por la exposición a las NPs-TiO<sub>2</sub>, aunque no se pudo determinar que esto fuera por el aumento de ROS.
- 6) El PVP jugó un papel importante como potenciador de la toxicidad, principalmente en las NPs-TiO<sub>2</sub> al aumentar su actividad fotocatalítica. Además, podría haber favorecido el ingreso de ambas NPs a las células HUVEC. Para tener un mejor entendimiento de estos resultados, se recomienda realizar más estudios que puedan confirmar lo descrito anteriormente.

### 6. PERSPECTIVAS

Para culminar con el trabajo se propone:

- La realización de otras pruebas que confirmen los resultados expuestos aquí. Para el estudio *in vivo*, se sugiere que se realice un análisis de microscopía electrónica de transmisión. Esto verificaría si las NPs efectivamente llegaron a los tejidos del pez cebra, su localización, ayudando a identificar órganos "blanco" y evaluar el daño ultraestructural.
- Con respecto a las NPs-Ag, determinar su disolución y su especiación confirmaría si el agua de embrión disminuye su biodisponibilidad.
- También, se plantea retirar el corion de los embriones previo a la exposición para determinar cuál es el papel de esta membrana en los efectos observados.
- 4) Mientras que en el estudio *in vitro*, es imperativo determinar la generación de ROS de las NPs-TiO<sub>2</sub> en las células HUVEC. Por consiguiente, se recomienda repetir los ensayos de viabilidad utilizando el SFB al 1%, para poder compararlos con la generación de ROS.
- 5) Debido a que los resultados obtenidos sugieren que puede haber muerte celular, se propone evaluarla por citometría de flujo. Esto serviría tanto como técnica secundaria para evaluar la viabilidad y para determinar el tipo de muerte celular, necrosis o apoptosis. De igual manera, la inmunodetección de proteínas apoptóticas en el pez cebra y en las células HUVEC permitiría una mejor comparación de las respuestas entre ambas especies, y en comparativa de los dos tipos de NPs.

### 7. REFERENCIAS

- Abramenko, Natalia B., Tatiana B. Demidova, Evgeny V. Abkhalimov, Boris G. Ershov, Eugene Yu Krysanov, and Leonid M. Kustov. 2018. "Ecotoxicity of Different-Shaped Silver Nanoparticles: Case of Zebrafish Embryos." *Journal of Hazardous Materials* 347: 89–94. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.060.
- Adamo, Giorgia, Simona Campora, and Giulio Ghersi. 2017. "Functionalization of Nanoparticles in Specific Targeting and Mechanism Release." In *Nanostructures for Novel Therapy*, 57–80. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46142-9/00003-7.
- Akter, Mahmuda, Md Tajuddin Sikder, Md Mostafizur Rahman, A. K.M.Atique Ullah, Kaniz Fatima Binte Hossain, Subrata Banik, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, and Masaaki Kurasaki. 2018. "A Systematic Review on Silver Nanoparticles-Induced Cytotoxicity: Physicochemical Properties and Perspectives." *Journal of Advanced Research* 9: 1–16. https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008.
- Allen, Rebecca. 2016. "The Cytotoxic and Genotoxic Potential of Titanium Dioxide (TiO 2) Nanoparticles on Human SH-SY5Y Neuronal Cells in Vitro." *The Plymouth Student Scientist* 9 (92): 5–28.
- Almofti, Mohamad Radwan, Tomokazu Ichikawa, Kikuji Yamashita, Hiroshi Terada, and Yasuo Shinohara. 2003. "Silver Ion Induces a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria and Release of Apoptogenic Cytochrome C." *Journal of Biochemistry* 134 (1): 43–49. https://doi.org/10.1093/jb/mvg111.
- Arts, Josje H.E., Mackenzie Hadi, Muhammad Adeel Irfan, Athena M. Keene, Reinhard Kreiling, Delina Lyon, Monika Maier, et al. 2015. "A Decision-Making Framework for the Grouping and Testing of Nanomaterials (DF4nanoGrouping)." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71 (2): S1–27. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.03.007.
- Ashraf, Muhammad Aqeel, Wanxi Peng, Yasser Zare, and Kyong Yop Rhee. 2018. "Effects of Size and Aggregation / Agglomeration of Nanoparticles on the Interfacial / Interphase Properties and Tensile Strength of Polymer Nanocomposites." *Nanoscale Reseach Letters* 13 (214): 1–7. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s11671-018-2624-0.
- Auffan, Melanie, Cole W Matson, Jerome Rose, Mariah Arnold, Olivier Proux, Barbara Fayard, Wei Liu, et al. 2014. "Salinity-Dependent Silver Nanoparticle Uptake and Transformation by Atlantic Killifish ( Fundulus Heteroclitus) Embryos." *Nanotoxicology* 8 (S1): 167–76. https://doi.org/10.3109/17435390.2013.869627.
- Azhdarzadeh, Morteza, Amir Ata Saei, Shahriar Sharifi, Mohammad J Hajipour, Alaaldin M Alkilany, Mohammad Sharifzadeh, Fatemeh Ramazani, Sophie Laurent, Alireza Mashaghi, and Morteza Mahmoudi. 2015. "Nanotoxicology: Advances and Pitfalls in Research Methodology." Nanomedicine 10 (18): 2931–52.
- Baer, Donald R. 2018. "The Chameleon Effect: Characterization Challenges Due to the Variability of Nanoparticles and Their Surfaces." *Frontiers in Chemistry* 6 (May): 1–7. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00145.
- Bar-ilan, Ofek, Kacie M Louis, Sarah P Yang, Joel A Pedersen, Robert J Hamers, Richard E Peterson, and Warren Heideman. 2012. "Titanium Dioxide Nanoparticles Produce Phototoxicity in the Developing Zebra Fish." *Nanotoxicology* 6 (6): 670–79. https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604438.
- Baranowska-Wójcik, Ewa, Dominik Szwajgier, Patryk Oleszczuk, and Anna Winiarska-Mieczan. 2019. "Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health—a Review." *Biological Trace Element Research*, 20–31. https://doi.org/10.1007/s12011-019-01706-6.
- BAuA. 2013. "Announcements on Hazardous Substances Manufactured Nanomaterials Announcement 527" 527 (BekGS 527): 1–27. http://www.baua.de/en/Topics-from-A-to-Z/Hazardous-Substances/TRGS/Announcement-

527.html;jsessionid=5208C23A837B260D7B2F355EBF9ED81E.1\_cid353.

- Baudin, Bruno, Arnaud Bruneel, Nelly Bosselut, and Michel Vaubourdolle. 2007. "A Protocol for Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells." *Nature Protocols* 2 (3): 481–85. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54.
- Bayat, Narges, Viviana R. Lopes, Julia Schölermann, Lasse Dahl Jensen, and Susana Cristobal. 2015. "Vascular Toxicity of Ultra-Small TiO2 Nanoparticles and Single Walled Carbon Nanotubes in Vitro and in Vivo." *Biomaterials* 63: 1–13. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.044.
- Beer, Christiane, Rasmus Foldbjerg, Yuya Hayashi, Duncan S. Sutherland, and Herman Autrup. 2012. "Toxicity of Silver Nanoparticles-Nanoparticle or Silver Ion?" *Toxicology Letters* 208 (3): 286–92.

https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002.

- Bhattacharjee, Sourav. 2016. "DLS and Zeta Potential What They Are and What They Are Not?" *Journal* of Controlled Release 235: 337–51. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- Boerma, Marjan, Gregory R. Burton, Junru Wang, Louis M. Fink, Robert E. McGehee, and Martin Hauer-Jensen. 2006. "Comparative Expression Profiling in Primary and Immortalized Endothelial Cells: Changes in Gene Expression in Response to Hydroxy Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Inhibition." *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 17 (3): 173–80. https://doi.org/10.1097/01.mbc.0000220237.99843.a1.
- Böhme, Steffi, Marta Baccaro, Matthias Schmidt, Annegret Potthoff, Hans-joachim Stärk, Thorsten Reemtsma, and Dana Kühnel. 2017. "Metal Uptake and Distribution in the Zebrafish (Danio Rerio) Embryo: Differences between Nanoparticles and Metal Ions." *Environmental Science Nano* 4 (5): 985–1200. https://doi.org/10.1039/c6en00440g.
- Bonsignorio, Daniele, Lucia Perego, Luca Del Giacco, and Franco Cotelli. 1996. "Structure and Macromolecular Composition of the Zebrafish Egg Chorion." *Zygote* 4: 101–8.
- Braydich-Stolle, Laura K., Nicole M. Schaeublin, Richard C. Murdock, Jingkun Jiang, Pratim Biswas, John J. Schlager, and Saber M. Hussain. 2009. "Crystal Structure Mediates Mode of Cell Death in TiO2 Nanotoxicity." *Journal of Nanoparticle Research* 11 (6): 1361–74. https://doi.org/10.1007/s11051-008-9523-8.
- Caniuguir, Andres, Bernardo J. Krause, Cherie Hernandez, Ricardo Uauy, and Paola Casanello. 2016. "Markers of Early Endothelial Dysfunction in Intrauterine Growth Restriction-Derived Human Umbilical Vein Endothelial Cells Revealed by 2D-DIGE and Mass Spectrometry Analyses." *Placenta* 41: 14–26. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.02.016.
- Cao, Yi, Yu Gong, Liangliang Liu, Yiwei Zhou, Xin Fang, Cao Zhang, Yining Li, and Juan Li. 2017. "The Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) as an in Vitro Model to Assess the Toxicity of Nanoparticles to Endothelium: A Review." *Journal of Applied Toxicology* 37 (12): 1359– 69. https://doi.org/10.1002/jat.3470.
- Chakraborty, Chiranjib, Ashish Ranjan Sharma, Garima Sharma, and Sang Soo Lee. 2016. "Zebrafish: A Complete Animal Model to Enumerate the Nanoparticle Toxicity." *Journal of Nanobiotechnology* 14 (65): 1–13. https://doi.org/10.1186/s12951-016-0217-6.
- ÇIFTÇI, Hakan, Mustafa TÜRK, Uğur Tamer, Siyami Karahan, and Yusuf Menemen. 2013. "Silver Nanoparticles: Cytotoxic, Apoptotic, and Necrotic Effects on MCF-7 Cells." *Turkish Journal of Biology* 37 (5): 573–81. https://doi.org/10.3906/biy-1302-21.
- Cleland, Andrew N, Jean-Luc Fraikin, Peter Meinhold, and Franklin Monzon. 2016. "NANOPARTICLE CHARACTERIZATION – One Size Does Not Fit All: Nanoparticle Size Analysis for Nanomedicine Applications." *Drug Development and Delivery* April.
- Cohen, Joel, Zhaoxia Ji, Tian Xia, and Philip Demokritou. 2014. "An Integrated Approach for the in Vitro Dosimetry of Engineered Nanomaterials," 1–12.
- Deloid, Glen M., Joel M. Cohen, Georgios Pyrgiotakis, and Philip Demokritou. 2017. "Preparation, Characterization, and in Vitro Dosimetry of Dispersed, Engineered Nanomaterials." *Nature Protocols* 12 (2): 355–71. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.172.
- Dooley, Kimberly, and Leonard I. Zon. 2000. "Zebrafish: A Model System for the Study of Human Disease." *Current Opinion in Genetics and Development* 10 (3): 252–56. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00074-5.
- Duncan, Timothy V. 2011. "Applications of Nanotechnology in Food Packaging and Food Safety: Barrier Materials, Antimicrobials and Sensors." *Journal of Colloid And Interface Science* 363 (1): 1–24. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017.
- Escamilla-Rivera, V., M. Uribe-Ramírez, S. González-Pozos, O. Lozano, S. Lucas, and A. De Vizcaya-Ruiz. 2016. "Protein Corona Acts as a Protective Shield against Fe3O4-PEG Inflammation and ROS-Induced Toxicity in Human Macrophages." *Toxicology Letters* 240 (1): 172–84. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.018.
- Faria, Melissa, José M Navas, Amadeu M V M Soares, and Carlos Barata. 2014. "Oxidative Stress Effects of Titanium Dioxide Nanoparticle Aggregates in Zebrafish Embryos." *Science of the Total Environment, The* 470–471: 379–89. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.055.
- Fewtrell, Lorna. 2014. *Silver: Water Disinfection and Toxicity*. Aberystwyth: Aberystwyth University. http://www.who.int/water\_sanitation\_health/dwq/chemicals/Silver\_water\_disinfection\_toxicity\_201 4V2.pdf.

- Galvez, Fernando, and Chris M Wood. 1997. "The Relative Importance of Water Hardness and Chloride Levels in Modifying the Acute Toxicity of Silver to Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss)." *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (11): 2363–68.
- Gao, Jiejun, Maria S. Sepúlveda, Christopher Klinkhamer, Alexander Wei, Yu Gao, and Cecon T. Mahapatra. 2015. "Nanosilver-Coated Socks and Their Toxicity to Zebrafish (Danio Rerio) Embryos." *Chemosphere* 119: 948–52. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.031.
- Abramenko, Natalia B., Tatiana B. Demidova, Evgeny V. Abkhalimov, Boris G. Ershov, Eugene Yu Krysanov, and Leonid M. Kustov. 2018. "Ecotoxicity of Different-Shaped Silver Nanoparticles: Case of Zebrafish Embryos." *Journal of Hazardous Materials* 347: 89–94. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.060.
- Adamo, Giorgia, Simona Campora, and Giulio Ghersi. 2017. "Functionalization of Nanoparticles in Specific Targeting and Mechanism Release." In *Nanostructures for Novel Therapy*, 57–80. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46142-9/00003-7.
- Akter, Mahmuda, Md Tajuddin Sikder, Md Mostafizur Rahman, A. K.M.Atique Ullah, Kaniz Fatima Binte Hossain, Subrata Banik, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, and Masaaki Kurasaki. 2018. "A Systematic Review on Silver Nanoparticles-Induced Cytotoxicity: Physicochemical Properties and Perspectives." *Journal of Advanced Research* 9: 1–16. https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008.
- Allen, Rebecca. 2016. "The Cytotoxic and Genotoxic Potential of Titanium Dioxide (TiO 2) Nanoparticles on Human SH-SY5Y Neuronal Cells in Vitro." *The Plymouth Student Scientist* 9 (92): 5–28.
- Almofti, Mohamad Radwan, Tomokazu Ichikawa, Kikuji Yamashita, Hiroshi Terada, and Yasuo Shinohara. 2003. "Silver Ion Induces a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria and Release of Apoptogenic Cytochrome C." *Journal of Biochemistry* 134 (1): 43–49. https://doi.org/10.1093/jb/mvg111.
- Arts, Josje H.E., Mackenzie Hadi, Muhammad Adeel Irfan, Athena M. Keene, Reinhard Kreiling, Delina Lyon, Monika Maier, et al. 2015. "A Decision-Making Framework for the Grouping and Testing of Nanomaterials (DF4nanoGrouping)." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71 (2): S1–27. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.03.007.
- Ashraf, Muhammad Aqeel, Wanxi Peng, Yasser Zare, and Kyong Yop Rhee. 2018. "Effects of Size and Aggregation / Agglomeration of Nanoparticles on the Interfacial / Interphase Properties and Tensile Strength of Polymer Nanocomposites." *Nanoscale Reseach Letters* 13 (214): 1–7. https://doi.org/10.1186/s11671-018-2624-0.
- Auffan, Melanie, Cole W Matson, Jerome Rose, Mariah Arnold, Olivier Proux, Barbara Fayard, Wei Liu, et al. 2014. "Salinity-Dependent Silver Nanoparticle Uptake and Transformation by Atlantic Killifish ( Fundulus Heteroclitus) Embryos." *Nanotoxicology* 8 (S1): 167–76. https://doi.org/10.3109/17435390.2013.869627.
- Azhdarzadeh, Morteza, Amir Ata Saei, Shahriar Sharifi, Mohammad J Hajipour, Alaaldin M Alkilany, Mohammad Sharifzadeh, Fatemeh Ramazani, Sophie Laurent, Alireza Mashaghi, and Morteza Mahmoudi. 2015. "Nanotoxicology: Advances and Pitfalls in Research Methodology." Nanomedicine 10 (18): 2931–52.
- Baer, Donald R. 2018. "The Chameleon Effect: Characterization Challenges Due to the Variability of Nanoparticles and Their Surfaces." *Frontiers in Chemistry* 6 (May): 1–7. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00145.
- Bar-ilan, Ofek, Kacie M Louis, Sarah P Yang, Joel A Pedersen, Robert J Hamers, Richard E Peterson, and Warren Heideman. 2012. "Titanium Dioxide Nanoparticles Produce Phototoxicity in the Developing Zebra Fish." *Nanotoxicology* 6 (6): 670–79. https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604438.
- Baranowska-Wójcik, Ewa, Dominik Szwajgier, Patryk Oleszczuk, and Anna Winiarska-Mieczan. 2019. "Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health—a Review." *Biological Trace Element Research*, 20–31. https://doi.org/10.1007/s12011-019-01706-6.
- BAuA. 2013. "Announcements on Hazardous Substances Manufactured Nanomaterials Announcement 527" 527 (BekGS 527): 1–27. http://www.baua.de/en/Topics-from-A-to-Z/Hazardous-Substances/TRGS/Announcement-

527.html;jsessionid=5208C23A837B260D7B2F355EBF9ED81E.1\_cid353.

- Baudin, Bruno, Arnaud Bruneel, Nelly Bosselut, and Michel Vaubourdolle. 2007. "A Protocol for Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells." *Nature Protocols* 2 (3): 481–85. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54.
- Bayat, Narges, Viviana R. Lopes, Julia Schölermann, Lasse Dahl Jensen, and Susana Cristobal. 2015.

"Vascular Toxicity of Ultra-Small TiO2 Nanoparticles and Single Walled Carbon Nanotubes in Vitro and in Vivo." *Biomaterials* 63: 1–13. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.044.

- Beer, Christiane, Rasmus Foldbjerg, Yuya Hayashi, Duncan S. Sutherland, and Herman Autrup. 2012. "Toxicity of Silver Nanoparticles-Nanoparticle or Silver Ion?" *Toxicology Letters* 208 (3): 286–92. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002.
- Bhattacharjee, Sourav. 2016. "DLS and Zeta Potential What They Are and What They Are Not?" *Journal* of Controlled Release 235: 337–51. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- Boerma, Marjan, Gregory R. Burton, Junru Wang, Louis M. Fink, Robert E. McGehee, and Martin Hauer-Jensen. 2006. "Comparative Expression Profiling in Primary and Immortalized Endothelial Cells: Changes in Gene Expression in Response to Hydroxy Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Inhibition." *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 17 (3): 173–80. https://doi.org/10.1097/01.mbc.0000220237.99843.a1.
- Böhme, Steffi, Marta Baccaro, Matthias Schmidt, Annegret Potthoff, Hans-joachim Stärk, Thorsten Reemtsma, and Dana Kühnel. 2017. "Metal Uptake and Distribution in the Zebrafish (Danio Rerio) Embryo: Differences between Nanoparticles and Metal Ions." *Environmental Science Nano* 4 (5): 985–1200. https://doi.org/10.1039/c6en00440g.
- Bonsignorio, Daniele, Lucia Perego, Luca Del Giacco, and Franco Cotelli. 1996. "Structure and Macromolecular Composition of the Zebrafish Egg Chorion." Zygote 4: 101–8.
- Braydich-Stolle, Laura K., Nicole M. Schaeublin, Richard C. Murdock, Jingkun Jiang, Pratim Biswas, John J. Schlager, and Saber M. Hussain. 2009. "Crystal Structure Mediates Mode of Cell Death in TiO2 Nanotoxicity." *Journal of Nanoparticle Research* 11 (6): 1361–74. https://doi.org/10.1007/s11051-008-9523-8.
- Caniuguir, Andres, Bernardo J. Krause, Cherie Hernandez, Ricardo Uauy, and Paola Casanello. 2016. "Markers of Early Endothelial Dysfunction in Intrauterine Growth Restriction-Derived Human Umbilical Vein Endothelial Cells Revealed by 2D-DIGE and Mass Spectrometry Analyses." *Placenta* 41: 14–26. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.02.016.
- Cao, Yi, Yu Gong, Liangliang Liu, Yiwei Zhou, Xin Fang, Cao Zhang, Yining Li, and Juan Li. 2017. "The Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) as an in Vitro Model to Assess the Toxicity of Nanoparticles to Endothelium: A Review." *Journal of Applied Toxicology* 37 (12): 1359– 69. https://doi.org/10.1002/jat.3470.
- Chakraborty, Chiranjib, Ashish Ranjan Sharma, Garima Sharma, and Sang Soo Lee. 2016. "Zebrafish: A Complete Animal Model to Enumerate the Nanoparticle Toxicity." *Journal of Nanobiotechnology* 14 (65): 1–13. https://doi.org/10.1186/s12951-016-0217-6.
- ÇIFTÇI, Hakan, Mustafa TÜRK, Uğur Tamer, Siyami Karahan, and Yusuf Menemen. 2013. "Silver Nanoparticles: Cytotoxic, Apoptotic, and Necrotic Effects on MCF-7 Cells." *Turkish Journal of Biology* 37 (5): 573–81. https://doi.org/10.3906/biy-1302-21.
- Cleland, Andrew N, Jean-Luc Fraikin, Peter Meinhold, and Franklin Monzon. 2016. "NANOPARTICLE CHARACTERIZATION – One Size Does Not Fit All: Nanoparticle Size Analysis for Nanomedicine Applications." *Drug Development and Delivery* April.
- Cohen, Joel, Zhaoxia Ji, Tian Xia, and Philip Demokritou. 2014. "An Integrated Approach for the in Vitro Dosimetry of Engineered Nanomaterials," 1–12.
- Deloid, Glen M., Joel M. Cohen, Georgios Pyrgiotakis, and Philip Demokritou. 2017. "Preparation, Characterization, and in Vitro Dosimetry of Dispersed, Engineered Nanomaterials." *Nature Protocols* 12 (2): 355–71. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.172.
- Dooley, Kimberly, and Leonard I. Zon. 2000. "Zebrafish: A Model System for the Study of Human Disease." *Current Opinion in Genetics and Development* 10 (3): 252–56. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00074-5.
- Duncan, Timothy V. 2011. "Applications of Nanotechnology in Food Packaging and Food Safety: Barrier Materials, Antimicrobials and Sensors." *Journal of Colloid And Interface Science* 363 (1): 1–24. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017.
- Escamilla-Rivera, V., M. Uribe-Ramírez, S. González-Pozos, O. Lozano, S. Lucas, and A. De Vizcaya-Ruiz. 2016. "Protein Corona Acts as a Protective Shield against Fe3O4-PEG Inflammation and ROS-Induced Toxicity in Human Macrophages." *Toxicology Letters* 240 (1): 172–84. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.018.
- Faria, Melissa, José M Navas, Amadeu M V M Soares, and Carlos Barata. 2014. "Oxidative Stress Effects of Titanium Dioxide Nanoparticle Aggregates in Zebrafish Embryos." *Science of the Total*

Environment, The 470-471: 379-89. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.055.

- Fewtrell, Lorna. 2014. *Silver: Water Disinfection and Toxicity*. Aberystwyth: Aberystwyth University. http://www.who.int/water\_sanitation\_health/dwq/chemicals/Silver\_water\_disinfection\_toxicity\_201 4V2.pdf.
- Galvez, Fernando, and Chris M Wood. 1997. "The Relative Importance of Water Hardness and Chloride Levels in Modifying the Acute Toxicity of Silver to Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss)." *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (11): 2363–68.
- Gao, Jiejun, Maria S. Sepúlveda, Christopher Klinkhamer, Alexander Wei, Yu Gao, and Cecon T. Mahapatra. 2015. "Nanosilver-Coated Socks and Their Toxicity to Zebrafish (Danio Rerio) Embryos." *Chemosphere* 119: 948–52. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.031.
- Gao, Yanfang, Yuzhu Yin, Xiumei Xing, Zhiqiang Zhao, Yao Lu, Yi Sun, Zhixiong Zhuang, Min Wang, Weidong Ji, and Yun He. 2016. "Arsenic-Induced Anti-Angiogenesis via MiR-425-5p-Regulated CCM3." *Toxicology Letters* 254: 22–31. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.023.
- Gebel, Thomas, Heidi Foth, Georg Damm, Alexius Freyberger, Peter Jürgen Kramer, Werner Lilienblum, Claudia Röhl, et al. 2014. "Manufactured Nanomaterials: Categorization and Approaches to Hazard Assessment." *Archives of Toxicology* 88 (12): 2191–2211. https://doi.org/10.1007/s00204-014-1383-7.
- Gliga, Anda R., Sara Skoglund, Inger Odnevall Wallinder, Bengt Fadeel, and Hanna L. Karlsson. 2014. "Size-Dependent Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Lung Cells: The Role of Cellular Uptake, Agglomeration and Ag Release." *Particle and Fibre Toxicology* 11 (1): 1–17. https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11.
- Gong, Guiyi, Lingling Jiang, Qinghua Lin, Wenyuan Liu, Ming-fang He, Jie Zhang, Feng Feng, Wei Qu, and Ning Xie. 2018. "In Vivo Toxic e Ff Ects of 4-Methoxy-5-Hydroxy-Canthin-6-One in Zebra Fi Sh Embryos via Copper Dyshomeostasis and Oxidative Stress." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 204 (October 2017): 79–87. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.11.014.
- Gui, Suxing, Zengli Zhang, Lei Zheng, Yaling Cui, Xiaorun Liu, Na Li, Xuezi Sang, et al. 2011. "Molecular Mechanism of Kidney Injury of Mice Caused by Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles." *Journal of Hazardous Materials* 195: 365–70. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.055.
- Halamoda Kenzaoui, Blanka, Catherine Chapuis Bernasconi, Seher Guney-Ayra, and Lucienne Juillerat-Jeanneret. 2012. "Induction of Oxidative Stress, Lysosome Activation and Autophagy by Nanoparticles in Human Brain-Derived Endothelial Cells." *Biochemical Journal* 441 (3): 813–21. https://doi.org/10.1042/bj20111252.
- Hamilton, Raymond F., Nianqiang Wu, Dale Porter, Mary Buford, Michael Wolfarth, and Andrij Holian. 2009. "Particle Length-Dependent Titanium Dioxide Nanomaterials Toxicity and Bioactivity." *Particle and Fibre Toxicology* 6: 1–11. https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-35.
- Haque, Enamul, and Alister Ward. 2018. "Zebrafish as a Model to Evaluate Nanoparticle Toxicity." *Nanomaterials* 8 (7): 561. https://doi.org/10.3390/nano8070561.
- He, Xiaojia, Hua Deng, and Huey-min Hwang. 2019. "The Current Application of Nanotechnology in Food and Agriculture." *Journal of Food and Drug Analysis* 27 (1): 1–21. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002.
- Heringa, Minne B., Liesbeth Geraets, Jan C.H. van Eijkeren, Rob J. Vandebriel, Wim H. de Jong, and Agnes G. Oomen. 2016. "Risk Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles via Oral Exposure, Including Toxicokinetic Considerations." *Nanotoxicology* 10 (10): 1515–25. https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1238113.
- Ho, Chi-ming, Sammi King-woon Yau, Chun-nam Lok, and Man-ho So. 2010. "Oxidative Dissolution of Silver Nanoparticles by Biologically Relevant Oxidants: A Kinetic and Mechanistic Study." *Chem Asian J* 5: 285–93. https://doi.org/10.1002/asia.200900387.
- Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, et al. 2013. "The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome." *Nature* 496 (7446): 498–503. https://doi.org/10.1038/nature12111.
- Hussain, Salik, Leen C J Thomassen, Ioana Ferecatu, Marie-caroline Borot, Karine Andreau, Johan A Martens, Jocelyne Fleury, Armelle Baeza-squiban, Francelyne Marano, and Sonja Boland. 2010.
   "Carbon Black and Titanium Dioxide Nanoparticles Elicit Distinct Apoptotic Pathways in Bronchial Epithelial Cells." *Particle and Fibre Toxicology* 7 (10): 1–17.
- Jiao, Zhi-hao, Ming Li, Yi-xing Feng, Jia-chen Shi, Jing Zhang, and Bing Shao. 2014. "Hormesis Effects of Silver Nanoparticles at Non-Cytotoxic Doses to Human Hepatoma Cells." *PLoS ONE* 9 (7).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102564.

- Jovanović, Boris, Vladimir J. Čvetković, and Tatjana Lj Mitrović. 2016. "Effects of Human Food Grade Titanium Dioxide Nanoparticle Dietary Exposure on Drosophila Melanogaster Survival, Fecundity, Pupation and Expression of Antioxidant Genes." *Chemosphere* 144: 43–49. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.054.
- Kettleborough, Ross N.W., Elisabeth M. Busch-Nentwich, Steven A. Harvey, Christopher M. Dooley, Ewart De Bruijn, Freek Van Eeden, Ian Sealy, et al. 2013. "A Systematic Genome-Wide Analysis of Zebrafish Protein-Coding Gene Function." *Nature* 496 (7446): 494–97. https://doi.org/10.1038/nature11992.
- Khan, Asif Manzoor, Barbara Korzeniowska, Vladimir Gorshkov, Muhammad Tahir, Henrik Schrøder, Lilian Skytte, Kaare Lund Rasmussen, Surabhi Khandige, Jakob Møller-Jensen, and Frank Kjeldsen. 2019. "Silver Nanoparticle-Induced Expression of Proteins Related to Oxidative Stress and Neurodegeneration in an in Vitro Human Blood-Brain Barrier Model." *Nanotoxicology* 13 (2): 221–39. https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1540728.
- Khan, Imran, Ashutosh Bahuguna, Manigandan Krishnan, Shruti Shukla, Hoomin Lee, Sang Hyun Min, Dong Kyu Choi, et al. 2019. "The Effect of Biogenic Manufactured Silver Nanoparticles on Human Endothelial Cells and Zebrafish Model." *Science of the Total Environment* 679: 365–77. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.045.
- Kim, Ki-tae, and Robert L Tanguay. 2014. "The Role of Chorion on Toxicity of Silver Nanoparticles in the Embryonic Zebrafish Assay." *Environmental Health and Toxicology* 29: 1–6.
- Kim, Ki-Tae, Tatiana Zaikova, James E Hutchison, and Robert L Tanguay. 2013. "Gold Nanoparticles Disrupt Zebrafish Eye Development and Pigmentation." *Toxicological Sciences* 133 (2): 275–88. https://doi.org/10.1093/toxsci/kft081.
- Kim, M. S., K. M. Louis, J. A. Pedersen, R. J. Hamers, R. E. Peterson, and W. Heideman. 2014. "Using Citrate-Functionalized TiO2nanoparticles to Study the Effect of Particle Size on Zebrafish Embryo Toxicity." *Analyst* 139 (5): 964–72. https://doi.org/10.1039/c3an01966g.
- Kim, Min-sik, Melinda Stees, Bala Vamsi K Karuturi, Sivakumar Vijayaraghavalu, Richard E Peterson, and Gary L Madsen. 2017. "Pro-NP <sup>™</sup> Protect against TiO2 Nanoparticle-Induced Phototoxicity in Zebrafish Model: Exploring Potential Application for Skin Care." *Drug Deliv. And Transl. Res.* https://doi.org/10.1007/s13346-017-0374-7.
- Koczkur, Kallum M., Štefanos Mourdikoudis, Lakshminarayana Polavarapu, and Sara E. Skrabalak. 2015. "Polyvinylpyrrolidone (PVP) in Nanoparticle Synthesis." *Dalton Transactions* 44 (41): 17883–905. https://doi.org/10.1039/c5dt02964c.
- Koeneman, Brian A., Yang Zhang, Paul Westerhoff, Yongsheng Chen, John C. Crittenden, and David G. Capco. 2010. "Toxicity and Cellular Responses of Intestinal Cells Exposed to Titanium Dioxide." *Cell Biology and Toxicology* 26 (3): 225–38. https://doi.org/10.1007/s10565-009-9132-z.
- Komorowski, Piotr, Małgorzata Siatkowska, Tomasz Wasiak, Katarzyna Działoszyńska, Sylwia Kotarba, Kinga Kądzioła, Nina Bartoszek, et al. 2019. "Simultaneous Transcriptome and Proteome Analysis of EA.Hy926 Cells under Stress Conditions Induced by Nanomaterials." *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 107 (4): 1024–34. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34195.
- Kovrižnych, Jevgenij A., Ružena Sotńikóva, Dagmar Zeljenková, Eva Rollerová, Elena Szabová, and Soňa Wimmerová. 2013. "Acute Toxicity of 31 Different Nanoparticles to Zebrafish (Danio Rerio) Tested in Adulthood and in Early Life Stages Comparative Study." *Interdisciplinary Toxicology* 6 (2): 67–73. https://doi.org/10.2478/intox-2013-0012.
- Kulkeaw, Kasem, Tohru Ishitani, Takaaki Kanemaru, and Ognen Ivanovski. 2011. "Cold Exposure Down-Regulates Zebrafish Pigmentation." *Genes to Cells* 16: 358–67. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01498.x.
- Lee, Kerry J, Prakash D Nallathamby, Lauren M Browning, Christopher J Osgood, and Xiao-Hong Nancy Xu. 2007. "In Vivo Imahing of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos." *ACS Nano* 1 (2): 133–43. https://doi.org/10.1021/nn700048y.In.
- Li, Xuan, John J Lenhart, and Harold W Walker. 2010. "Dissolution-Accompanied Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles." *Langmuir* 26 (21): 16690–98. https://doi.org/10.1021/la101768n.
- Li, Yang, Ying Liu, Yujian Fu, Taotao Wei, Laurent Le Guyader, Ge Gao, Ru Shi Liu, Yan Zhong Chang, and Chunying Chen. 2012. "The Triggering of Apoptosis in Macrophages by Pristine Graphene

through the MAPK and TGF-Beta Signaling Pathways." *Biomaterials* 33 (2): 402–11. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.091.

- Lim, Jin Hee, Patrick Sisco, Thilak K. Mudalige, Germarie Sánchez-Pomales, Paul C. Howard, and Sean W. Linder. 2015. "Detection and Characterization of SiO2 and TiO2 Nanostructures in Dietary Supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (12): 3144–52. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00392.
- Liu, Jingyu, and Robert H. Hurt. 2010. "Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids." *Environmental Science and Technology* 44 (6): 2169–75. https://doi.org/10.1021/es9035557.
- Liu, Wei, Yuan Wu, Chang Wang, Hong C Li, Thanh Wang, Chun Y Liao, L I N Cui, Q U N F Zhou, Bing Yan, and G U I B Jiang. 2010. "Impact of Silver Nanoparticles on Human Cells: Effect of Particle Size." *Nanotoxicology* 4 (3): 319–30. https://doi.org/10.3109/17435390.2010.483745.
- Lowry, Gregory V, Kelvin B Gregory, Simon C Apte, and Jamie R Lead. 2012. "Transformations of Nanomaterials in the Environment." *Environmental Science and Technology* 46: 6893–99. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099408-6.00002-5.
- Ma, Hongbo, and Stephen A. Diamond. 2013. "Phototoxicity of TiO2 Nanoparticles to Zebrafish (Danio Rerio) Is Dependent on Life Stage." *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (9): 2139–43. https://doi.org/10.1002/etc.2298.
- Mandrell, David, Lisa Truong, Caleb Jephson, Mushfiqur R Sarker, Aaron Moore, Christopher Lang, Michael T Simonich, and Robert L Tanguay. 2012. "Automated Zebrafish Chorion Removal and Single Embryo Placement: Optimizing Throughput of Zebrafish Developmental Toxicity Screens." *Technology Brief* 17 (1): 66–74. https://doi.org/10.1177/2211068211432197.
- Marin, Valérie, Gilles Kaplanski, Sandra Grès, Catherine Farnarier, and Pierre Bongrand. 2001. "Endothelial Cell Culture Protocol to Obtain and Cultivate Human." *Journal of Immunological Methods* 254: 183–90.
- Mironava, Tatsiana, Michael Hadjiargyrou, Marcia Simon, Vladimir Jurukovski, and Miriam H. Rafailovich. 2010. "Gold Nanoparticles Cellular Toxicity and Recovery: Effect of Size, Concentration and Exposure Time." *Nanotoxicology* 4 (1): 120–37. https://doi.org/10.3109/17435390903471463.
- Mohamed, Teba, Sabine Matou-Nasri, Asima Farooq, Debra Whitehead, and May Azzawi. 2017. "Polyvinylpyrrolidone-Coated Gold Nanoparticles Inhibit Endothelial Cell Viability, Proliferation, and ERK1 / 2 Phosphorylation and Reduce the Magnitude of Endothelial-Independent Dilator Responses in Isolated Aortic Vessels." *International Journal of Nanomedicine* 12: 8813–30.
- Mohammadinejad, Reza, Mohammad Amin Moosavi, Shima Tavakol, Deniz Özkan Vardar, Asieh Hosseini, Marveh Rahmati, Luciana Dini, Salik Hussain, Ali Mandegary, and Daniel J. Klionsky. 2019. "Necrotic, Apoptotic and Autophagic Cell Fates Triggered by Nanoparticles." *Autophagy* 15 (1): 4– 33. https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1509171.
- Moosavi, Mohammad Amin, Maryam Sharifi, Soroush Moasses Ghafary, Zahra Mohammadalipour, Alireza Khataee, Marveh Rahmati, Sadaf Hajjaran, Marek J. Łos, Thomas Klonisch, and Saeid Ghavami. 2016. "Photodynamic N-TiO 2 Nanoparticle Treatment Induces Controlled ROS-Mediated Autophagy and Terminal Differentiation of Leukemia Cells." *Scientific Reports* 6 (September): 1–16. https://doi.org/10.1038/srep34413.
- Munusamy, Prabhakaran, Chongmin Wang, Mark H. Engelhard, Donald R. Baer, Jordan N. Smith, Chongxuan Liu, Vamsi Kodali, et al. 2015. "Comparison of 20 Nm Silver Nanoparticles Synthesized with and without a Gold Core: Structure, Dissolution in Cell Culture Media, and Biological Impact on Macrophages." *Biointerphases* 10 (3): 031003. https://doi.org/10.1116/1.4926547.
- Nel, Andre, Tian Xia, Huan Meng, Xiang Wang, Sijie Lin, Zhaoxia Ji, and Haiyuan Zhang. 2013. "Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening." *Accounts of Chemical Research* 46 (3): 607–21. https://doi.org/10.1021/ar300022h.
- Oberdörster, Günter, Eva Oberdörster, and Jan Oberdörster. 2005. "Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles." *Environmental Health Perspectives* 113 (7): 823–39. https://doi.org/10.1289/ehp.7339.
- OECD. 2017. The Next Production Revolution: Implications for Governments and Business. The Next Production Revolution. Paris: OECD Publishing. https://doi.org/10.1787/9789264271036-en.
- Osborne, Olivia J., Blair D. Johnston, Julian Moger, Mohammed Balousha, Jamie R. Lead, Tetsuhiro Kudoh, and Charles R. Tyler. 2013. "Effects of Particle Size and Coating on Nanoscale Ag and TiO

2 Exposure in Zebrafish (Danio Rerio) Embryos." *Nanotoxicology* 7 (8): 1315–24. https://doi.org/10.3109/17435390.2012.737484.

- Pandey, Rajan Kumar, and Vijay Kumar Prajapati. 2018. "Molecular and Immunological Toxic Effects of Nanoparticles." *International Journal of Biological Macromolecules* 107 (PartA): 1278–93. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.110.
- Park, Margriet V D Z, Arianne M. Neigh, Jolanda P. Vermeulen, Liset J J de la Fonteyne, Henny W. Verharen, Jacob J. Briedé, Henk van Loveren, and Wim H. de Jong. 2011. "The Effect of Particle Size on the Cytotoxicity, Inflammation, Developmental Toxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles." *Biomaterials* 32 (36): 9810–17. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085.
- Paunovska, Kalina, David Loughrey, Cory D Sago, Robert Langer, and James E Dahlman. 2019. "Using Large Datasets to Understand Nanotechnology." *Advanced Materials* 1902798: 1–16. https://doi.org/10.1002/adma.201902798.
- Pelka, Katharina E, Kirsten Henn, Andreas Keck, Benjamin Sapel, and Thomas Braunbeck. 2016. "Size Does Matter – Determination of the Critical Molecular Size for the Uptake of Chemicals across the Chorion of Zebrafish (Danio Rerio) Embryos." *Aquatic Toxicology*. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.015.
- Powers, Kevin W., Scott C. Brown, Vijay B. Krishna, Scott C. Wasdo, Brij M. Moudgil, and Stephen M. Roberts. 2006. "Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation." *Toxicological Sciences* 90 (2): 296–303. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj099.
- Rahmani, Kukia N, Y Rasmi, A Abbasi, N Koshoridze, A Shirpoor, G Burjanadze, and E Saboory. 2018. "Bio-Effects of TiO2 Nanoparticles on Human Colorectal Cancer and Umbilical Vein Endothelial Cell Lines." Asian Pac J Cancer Prev 19 (10): 2821–29. https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.10.2821 %/ Creative Commons Attribution License.
- Rezvani, Ehsan, Aran Rafferty, Cormac McGuinness, and James Kennedy. 2019. "Adverse Effects of Nanosilver on Human Health and the Environment." *Acta Biomaterialia*, no. xxxx. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.042.
- Ribas, Laia, and Francesc Piferrer. 2014. "The Zebrafish (Danio Rerio) as a Model Organism, with Emphasis on Applications for Finfish Aquaculture Research." *Reviews in Aquaculture* 6 (4): 209–40. https://doi.org/10.1111/raq.12041.
- Rocco, Lucia, Marianna Santonastaso, Filomena Mottola, Domenico Costagliola, Teresa Suero, Severina Paci, and Vincenzo Stingo. 2015. "Ecotoxicology and Environmental Safety Genotoxicity Assessment of TiO2 Nanoparticles in the Teleost Danio Rerio." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 223–30. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.012.
- Samat, M. H., A. M.M. Ali, M. F.M. Taib, O. H. Hassan, and M. Z.A. Yahya. 2016. "Hubbard U Calculations on Optical Properties of 3d Transition Metal Oxide TiO2." *Results in Physics* 6: 891–96. https://doi.org/10.1016/j.rinp.2016.11.006.
- Schluesener, Jan K., and Hermann J. Schluesener. 2013. "Nanosilver: Application and Novel Aspects of Toxicology." *Archives of Toxicology* 87 (4): 569–76. https://doi.org/10.1007/s00204-012-1007-z.
- Schnabel, Denhi, Jorge Castillo-Robles, and Hilda Lomeli. 2019. "Protein Purification and Western Blot Detection from Single Zebrafish Embryo." *Zebrafish* 16 (6): 505–7. https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1761.
- Setyawati, Magdiel Inggrid, Chor Yong Tay, Dominic Docter, Roland H. Stauber, and David Tai Leong. 2015. "Understanding and Exploiting Nanoparticles' Intimacy with the Blood Vessel and Blood." *Chemical Society Reviews* 44 (22): 8174–99. https://doi.org/10.1039/c5cs00499c.
- Sha, Baoyong, Wei Gao, Yulong Han, ShuQi Wang, Jinhui Wu, Feng Xu, and TianJian Lu. 2013. "Potential Application of Titanium Dioxide Nanoparticles in the Prevention of Osteosarcoma and Chondrosarcoma Recurrence." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 13 (2): 1208–11. https://doi.org/10.1166/jnn.2013.6081.
- Shi, Hongbo, Ruth Magaye, Vincent Castranova, and Jinshun Zhao. 2013. "Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of Current Toxicological Data." *Particle and Fibre Toxicology* 10 (15). https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-15.
- Shi, Junpeng, Xia Sun, Yi Lin, Xiaoyan Zou, Zhanjun Li, Yanyan Liao, Miaomiao Du, and Hongwu Zhang. 2014. "Endothelial Cell Injury and Dysfunction Induced by Silver Nanoparticles through Oxidative Stress via IKK/NF-KB Pathways." *Biomaterials* 35 (24): 6657–66. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.093.

- Shih, Yu-jen, Chia-chi Su, Chiu-wen Chen, Cheng-di Dong, Wen-sheng Liu, and C P Huang. 2016. "Adsorption Characteristics of Nano-TiO2 onto Zebra Fish Embryos and Its Impacts on Egg Hatching." *Chemosphere* 154: 109–17. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.061.
- Slistan-Grijalva, A., R. Herrera-Urbina, J. F. Rivas-Silva, M. Ávalos-Borja, F. F. Castillón-Barraza, and A. Posada-Amarillas. 2008. "Synthesis of Silver Nanoparticles in a Polyvinylpyrrolidone (PVP) Paste, and Their Optical Properties in a Film and in Ethylene Glycol." *Materials Research Bulletin* 43 (1): 90–96. https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2007.02.013.
- Smith, Jordan N., Dennis G. Thomas, Hadley Jolley, Vamsi K. Kodali, Matthew H. Littke, Prabhakaran Munusamy, Donald R. Baer, Matthew J. Gaffrey, Brian D. Thrall, and Justin G. Teeguarden. 2018.
  "All That Is Silver Is Not Toxic: Silver Ion and Particle Kinetics Reveals the Role of Silver Ion Aging and Dosimetry on the Toxicity of Silver Nanoparticles." *Particle and Fibre Toxicology* 15 (1): 1–12. https://doi.org/10.1186/s12989-018-0283-z.
- Stern, Stephan T, Pavan P Adiseshaiah, and Rachel M Crist. 2012. "Autophagy and Lysosomal Dysfunction as Emerging Mechanisms of Nanomaterial Toxicity." *Particle and Fibre Toxicology* 9 (20): 20–35. https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-20.
- Stone, Vicki, Mark R. Miller, Martin J.D. Clift, Alison Elder, Nicholas L. Mills, Peter Møller, Roel P.F. Schins, et al. 2017. "Nanomaterials versus Ambient Ultrafine Particles: An Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge." *Environmental Health Perspectives* 125 (10): 1–17. https://doi.org/10.1289/EHP424.
- Szmyd, Radoslaw, Anna Grazyna, Lukasz Skalniak, Agnieszka Cierniak, Barbara Lipert, Francesca Larese Filon, Matteo Crosera, Julia Borowczyk, and Eliza Laczna. 2012. "Effect of Silver Nanoparticles on Human Primary Keratinocytes." *Biol Chem* 394 (1): 113–23. https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0202.
- Tang, Tianle, Zhang Zhang, and Xiaopeng Zhu. 2019. "Toxic Effects of TiO2 NPs on Zebrafish." International Journal of Environmental Research and Public Health 16 (523). https://doi.org/10.3390/ijerph16040523.
- Trouiller, Benedicte, Ramune Reliene, Aya Westbrook, Parrisa Solaimani, and Robert H. Schiestl. 2009. "Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability in Vivo in Mice." *Cancer Research* 69 (22): 8784–89. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2496.
- Ucciferri, Nadia, Eva Marie Collnot, Birgit K. Gaiser, Annalisa Tirella, Vicki Stone, Claudio Domenici, Claus Michael Lehr, and Arti Ahluwalia. 2014. "In Vitro Toxicological Screening of Nanoparticles on Primary Human Endothelial Cells and the Role of Flow in Modulating Cell Response." Nanotoxicology 8 (6): 697–708. https://doi.org/10.3109/17435390.2013.831500.
- Wang, Wenjie, Mingyuan Gu, and Yanping Jin. 2003. "Effect of PVP on the Photocatalytic Behavior of TiO2 under Sunlight." *Mater Letters* 57: 3276–81. https://doi.org/10.1016/S0167-577X(03)00047-8.
- Wang, Xiang, Zhaoxia Ji, Chong Hyun Chang, Haiyuan Zhang, Meiying Wang, Yu Pei Liao, Sijie Lin, et al. 2014. "Use of Coated Silver Nanoparticles to Understand the Relationship of Particle Dissolution and Bioavailability to Cell and Lung Toxicological Potential." *Small* 10 (2): 385–98. https://doi.org/10.1002/smll.201301597.
- Wang, Ya-Jie, Zi-Zi He, Yang-Wu Fang, Yang Xu, Ya-Nan Chen, Guan-Qun Wang, Yong-Qiang Yang, Zhuo Yang, and Yu-Hao Li. 2014. "Effect of Titaniun Dioxide Nanoparticles on Zebrafish Embryos and Developing Retina." *Int J Ophtalmol* 7 (6): 917–23. https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2014.06.01.
- Wang, Yupei, Yuhong Chen, Xin Zhou, Jing Si, Baoquan Zhao, Xiaotang Ren, Rong Zhou, Lu Gan, and Hong Zhang. 2018. "Early Embryonic Exposure of Ionizing Radiations Disrupts Zebrafish Pigmentation." *Journal of Cellular Physiology*, no. November 2017: 1–10. https://doi.org/10.1002/jcp.26922.
- Weir, Alex, Paul Westerhoff, Lars Fabricius, Kiril Hristovski, and Natalie Von Goetz. 2012. "Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products." *Environmental Science and Technology* 46 (4): 2242–50. https://doi.org/10.1021/es204168d.
- Wolfram, Joy, Motao Zhu, Yong Yang, Jianliang Shen, Emanuela Gentile, Donatella Paolino, Massimo Fresta, et al. 2015. "Safety of Nanoparticles in Medicine." *Curr Drug Targets* 16 (14): 1671–81. https://doi.org/10.1002/adma.201403943.Evaluating.
- Wu, Ya Na, Li Xing Yang, Xuan Yu Shi, I. Chen Li, Joanna M. Biazik, Kyle R. Ratinac, Dong Hwang Chen, Pall Thordarson, Dar Bin Shieh, and Filip Braet. 2011. "The Selective Growth Inhibition of Oral Cancer by Iron Core-Gold Shell Nanoparticles through Mitochondria-Mediated Autophagy."

Biomaterials 32 (20): 4565–73. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.006.

- Zhang, Haiyuan, Zhaoxia Ji, Tian Xia, Huan Meng, Cecile Low-kam, Rong Liu, and Suman Pokhrel. 2012. "Use of Metal Oxide Nanoparticle Band Gap To Develop a Predictive Paradigm for Oxidative Stress and Acute Pulmonary In FI Ammation." ACS Nano, no. 5: 4349–68. https://doi.org/10.1021/nn3010087.
- Zhang, Xiaolu, Xinlei Lu, Limei Yu, Yufeng Gu, and Fuzheng Qu. 2019. "Downregulation of NLRP2 Inhibits HUVEC Viability by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway." *Molecular Medicine Reports* 19 (1): 85–92. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9625.