

# ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

DIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

## **Evaluación de la activación endotelial inducido por $TiO_2$ . Un modelo de co-cultivos múltiple.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA: MARIA DEL PILAR RAMOS GODINEZ

TUTORES: DR. ERNESTO ALFARO MORENO

DRA. GISELA GUTIERREZ IGLESIAS

Diciembre de 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

SIP-14-BIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 28 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

**"Evaluación de la activación endotelial inducido por TIO2. Un modelo de co-cultivo múltiple"**

Presentada por la alumna:

**Ramos**  
Apellido paterno

**Godínez**  
Apellido materno

**Maria del Pilar**  
Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	8	1	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

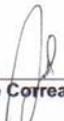
**LA COMISIÓN REVISORA**

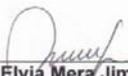
Directores de tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ernesto Alfaro Moreno**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ángel Miliar García**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. José Correa Basurto**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Elvia Mera Jiménez**

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Eleazar Lara Padilla**



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I. P. N.  
SECCION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 28 del mes noviembre del año 2011, el que suscribe Ramos Godínez María del Pilar alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B091810 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias, Dr. Ernesto Alfaro Moreno y cede los derechos del trabajo intitulado "Evaluación de la activación endotelial inducido por TiO<sub>2</sub>. Un modelo de co-cultivo múltiple", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección pilyrg@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María del Pilar Ramos Godínez

Nombre y firma

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL  
LABORATORIO DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL DEL  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA.

BECA CONACYT: 48443

## **AGRADECIMIENTOS:**

**Agradezco a todas y cada una de las personas que me han acompañado en esta gran aventura. (SI LOS PONGO A TODOS VA A SER MAS GRANDE QUE MI TESIS)**

## **GRACIAS:**

- POR ACOMPAÑARME SIEMPRE**
- POR APOYARME DE MANERA INCONDICIONAL**
- POR QUERERME A PESAR DE MÍ**
- POR SER PARTE DE MI VIDA**
- POR AYUDARME A CRECER DE MANERA PERSONAL Y PROFESIONAL.**
- GRACIAS A TODOS Y CADA UNO DE USTEDES:  
FAMILIARES-TUTORES- AMIGOS**

**GRACIAS POR SER PARTE DE MI VIDA**

# INDICE

INDICE.....	6
INDICE DE FIGURAS .....	8
Resumen:.....	9
ABSTRACT .....	10
<b>INTRODUCCION:</b> .....	11
Comunicación celular:.....	11
Células epiteliales:.....	12
Células endoteliales.....	14
Inflamación:.....	15
Moléculas de adhesión.....	16
NANOPARTICULAS:.....	19
Dióxido de Titanio: .....	19
<b>RIESGOS:</b> .....	21
Planteamiento del problema: .....	23
<b>HIPÓTESIS:</b> .....	26
Justificación:.....	26
<b>OBJETIVO GENERAL:</b> .....	27
OBJETIVOS PARTICULARES: .....	28
METODOLOGIA.....	29
OBTENCION DE CÉLULAS ENDOTELIALES:.....	29
CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES .....	29
CULTIVO DE CELULAS EPITELIALES A 549.....	30
CULTIVO DE CELULAS U 937.....	31

COMUNICACIÓN CELULAR .....	31
EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION EXPUESTAS A TiO <sub>2</sub> .....	34
<b>ENSAYO DE CUANTIFICACION DE INTERLEUCINAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVOS CELULARES EXPUESTO A TiO<sub>2</sub> .....</b>	<b>35</b>
<b>CUANTIFICACION DE NITRITOS: .....</b>	<b>36</b>
<b>RESULTADOS:.....</b>	<b>37</b>
COMUNICACIÓN EPITELIO ENDOTELIO:.....	37
Caracterización de las NPs-TiO <sub>2</sub> .....	38
ADHESION DE MONOCITOS: .....	39
EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION TEMPRANA .....	41
Moléculas de adhesión temprana: Selectina E y Selectina P .....	41
EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION TARDIA.....	42
RESULTADOS DETERMINACION DE NITRITOS .....	44
DETECCION DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS.....	45
DISCUSIÓN.....	49
Adhesión de monocitos:.....	50
Expresión de moléculas de adhesión temprana: .....	51
Determinación de nitritos: .....	52
Detección de citocinas pro-inflamatorias: .....	53
CONCLUSIONES: .....	54
BIBLIOGRAFIA: .....	55

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Aparato respiratorio

Figura 2.- Activación endotelial

Figura 3.-Modelo propuesto

Figura 4.-Micrografias células endoteliales-epiteliales

Figura 5.- Caracterización de  $\text{TiO}_2$

Figura 6.- Adhesion de monocitos

Figura 7.-Grafica.- Selectina E

Figura 8.- Grafica.- Selectina P

Figura 9.- Grafica.- ICAM-1

Figura 10.- Grafica VCAM-1

Figura 11.- Grafica.- PCAM-1

Figura 12.- Grafica concentración Nitritos

Figura13.- Grafica  $\text{TNF-}\alpha$

Figura14.- Grafica IL-1

Figura15.- Grafica IL-6

Figura16.- Grafica IL-8

## Resumen:

Cada vez que respiramos introducimos además de aire, los elementos particulados que estén suspendidos en él. En la actualidad se están utilizando en las diferentes industrias materiales con dimensiones nanométricas. En México el principal nanomaterial utilizado es el TiO<sub>2</sub>. Las personas más expuestas a él, son las que laboralmente manipulan el TiO<sub>2</sub> como nanopartícula. En el presente trabajo, se evaluaron los efectos inducidos por NPs-TiO<sub>2</sub> en la comunicación celular (epitelio-endotelio). Para ello se desarrolló un modelo "in vitro" que semeja la interface alveolo-capilar. Se evaluaron la adhesión celular, liberación de factores proinflamatorios como citocinas, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, la quimiocina IL-8, y óxido nítrico y la expresión de moléculas de adhesión. Encontramos que las NPs-TiO<sub>2</sub> (concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) activaron a las células endoteliales, a través de las epiteliales. Lo que indujo un incremento significativo de la expresión de moléculas de adhesión y la adhesión de monocitos en las células endoteliales. La producción de óxido nítrico incrementó significativamente y la liberación de TNF- $\alpha$ . Con estos resultados podemos decir que el TiO<sub>2</sub> como nanopartícula, al estar presente provoca la liberación y expresión de elementos proinflamatorios y adhesión de monocitos a las células endotelial. Esta activación endotelial implica, abrir paso a los linfocitos pero al mismo tiempo, abrimos paso a la nanopartícula de TiO<sub>2</sub>, que puede entrar a la circulación sanguínea y viajar a los órganos internos de las personas expuestas al titanio como nanomaterial, causando problemas de salud.

## ABSTRACT

Every time we breathe we introduce air and particulates that are suspended in it. Nowadays industries are using different materials with nanometer size. In Mexico the main nanomaterial used is TiO<sub>2</sub>. People exposed to TiO<sub>2</sub> are principally workers with direct contact to mentioned nanomaterial. In this study, we evaluated the effects induced by NPs-TiO<sub>2</sub> in cell communication (epithelial and endothelial). We developed an "in vitro" model which resembles the alveolar-capilar interface. We assessed cell adhesion, release of proinflammatory factors such as cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, chemokine IL-8, nitric oxide and the expression of adhesion molecules. We found that NPs-TiO<sub>2</sub> (10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> concentration) activated endothelial cells through epithelial cells, which induced a significant increase in the expression of adhesion molecules and adhesion of monocytes in endothelial cells. The production of nitric oxide and release of TNF- $\alpha$  increased significantly. These results corroborate that when TiO<sub>2</sub> nanoparticles are present they cause the release and expression of proinflammatory elements and adhesion of monocytes to endothelial cells. The observed endothelial activation suggests that this process could open the way to lymphocytes but simultaneously to the TiO<sub>2</sub> nanoparticles that can enter the bloodstream and travel to internal organs of people exposed to titanium nanomaterial causing serious health problems.

## **INTRODUCCION:**

### **Comunicación celular:**

Uno de los procesos fundamentales para la vida es la respiración (1, 2). El aparato respiratorio lo componen los pulmones y una serie de vías aéreas que se ramifican en conductos de calibre cada vez menor, hasta llegar a formar los espacios aéreos más pequeños de este sistema, los alveolos, formados por células epiteliales (neumocitos tipo I y II) ( 2 ). En el aparato respiratorio se llevan a cabo tres funciones principales, conducción del aire, filtración de este aire y el intercambio de gases (la respiración) que se lleva a cabo en los alveolos. De esta manera, las células epiteliales - alveolo pulmonares se comunican estrechamente con el ambiente externo y con el ambiente interno lo hacen, a través de las células endoteliales de los capilares, realizando el intercambio de gases (3). En la respiración, no solo introducimos aire aspirado, también pueden ingresar otros elementos presentes en el ambiente. Dependiendo del lugar en el que vivimos o desarrollemos nuestra actividad laboral, el aire, pueden contener polen, virus, bacterias o material particulado de diferentes tamaños, formas o composición (4, 5) El material particulado que llegar al alveolo, es un material de dimensiones pequeñas, aproximadamente de  $1\mu\text{m}$  o menos. Este material particulado al depositarse pueden interferen con el flujo de aire y obstruir las vías respiratorias, por lo que para mantener el mismo flujo de aire, es necesario eliminarlas. El material particulado extraño, es reconocido por los receptores membranales de las células epiteliales alveolares y desencadena la intercomunicación entre la célula epitelial alveolar afectada (activada) y la endotelial capilar, que al activarse

libera también diferentes factores pro-inflamatorios como las citocinas, entre las que destaca el TNF- $\alpha$ , las interleucinas (como la IL-1, IL-6), las quimiocinas (como la IL-8), la liberación de óxido nítrico, entre otros, que contribuye en la permeabilidad vascular y el ingreso de linfocitos al lugar en donde se encuentra el material particulado extraño para eliminarlo (inflamación) (6,7). La eliminación del material particulado se ve afectado por diferentes factores como serían, un problema pulmonar preexistente, la exposición crónica al material particulado, o bien el tipo de material al que estemos expuestos. En la actualidad con el desarrollo nanotecnológico, las diferentes industrias están utilizando los materiales con tamaños cada vez menores (en nanómetros), con lo cual cambian las propiedades fisicoquímicas de estos materiales (como lo es el TiO<sub>2</sub>) y la manera de como se interrelacionan los organismos vivos con estos nuevos materiales nanométricos todavía no está muy clara debido a los resultados controversiales de la toxicidad del TiO<sub>2</sub> como nanomaterial (8, 9).

### **Células epiteliales:**

Esta comunicación, se realiza en la superficie epitelial del alveolo y en el endotelio de capilares y arterias a través de la interface alveolo-capilar (10, 11), que es en donde se realiza el intercambio de gases. (4,9, 10). La barrera entre el aire y la sangre se reduce a un fino espacio de 2.2- $\mu\text{m}$ , en el cual se realiza un intercambio de gases eficiente (11, 9). Para ello existen en cada pulmón de una persona adulta entre 250 y 300 millones de alveolos, la extensión de sus

superficie interna es de alrededor de 75 m<sup>2</sup>, la dimensión aproximada de una cancha de tenis. Cada vez que respiramos inhalamos aproximadamente 80 litros de aire (4, 5), en cada respiración introducimos aire aspirado y un gran número de partículas aerotransportadas, gases tóxicos, y microorganismos (22, 4, 9,10). Numerosos estudios epidemiológicos sobre la exposición a materiales particulados (de 2.5 µm y de 10 µm), han mostrado que al ser inhalado este material queda depositado a lo largo de las vías respiratorias y que dependiendo del tamaño de las partículas, estas quedaran atrapadas en diferentes niveles del aparato respiratorio (5,6, 10, 2). Lo que implica que entre más pequeña es la partícula, esta tendrá la posibilidad de ingresar a lugares más internos de las vías aéreas como lo es el sistema alveolo-capilar (Fig1) (12). Las células epiteliales del alveolo, además de facilitar la difusión de los gases son particularmente susceptibles a infecciones y a la exposición continua de partículas que han llegado hasta ellas. Para su eliminación produce una respuesta inflamatoria, la cual inicia con el reconocimiento de los elementos extraños que llegaron hasta las células epiteliales alveolares y la producción de citocinas proinflamatorias.

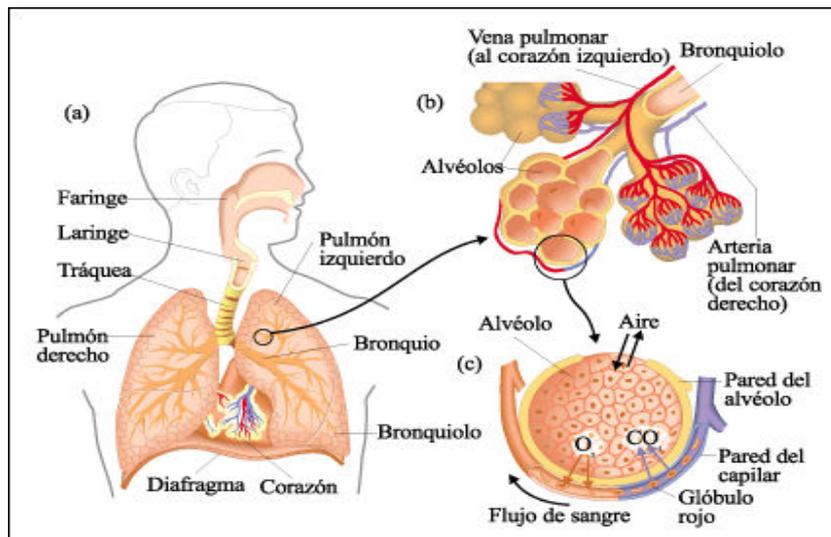


figura 1. Se observa (a) el aparato respiratorio. (b) Alveolos y la relación tan estrecha (c) entre el alveolo pulmonar y los capilares pulmonares.

## Células endoteliales

Otra de las estirpes celulares que juega un papel clave en la comunicación alveolo-capilar y el desarrollo de la respuesta inflamatoria es el endotelio capilar pulmonar (10). Anteriormente se le consideraba como una barrera física que separaba la sangre de los tejidos subyacentes, pero ahora se sabe que es un órgano altamente especializado y metabólicamente muy activo. Desempeña un papel importante en el mantenimiento del tono, la permeabilidad vascular, el tráfico de los leucocitos y la modulación de la homeostasis (8,11, 12 ). Las células endoteliales participan en todas las fases de la inflamación; Sus propiedades funcionales cambian en respuesta a estímulos inducidos por la activación

endotelial, como lo es la presencia de estímulos proinflamatorios como la IL-1 y el TNF- $\alpha$  (13, 14, 15 1.1). ) Ambas son producidas por macrófagos alveolares activados, así como por las propias células endoteliales, estimulando la producción de otras citocinas entre las que se incluyen la IL-6, IL-8. Produce mediadores de la vasodilatación como óxido nítrico (NO) que mantiene y amplifica la respuesta inflamatoria (7,16), lo que induce la expresión de moléculas de adhesión (17) y facilitan la adherencia y transmigración de los leucocitos.

### **Inflamación:**

El proceso de inflamación inicia con una cascada de señalización intracelular. Se activa el factor de transcripción nuclear (NF-KB), se trasloca al núcleo celular, donde se inicia la transcripción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Posterior a la síntesis de TNF- $\alpha$ , aparece la citocina pro-inflamatoria, la interleucina (IL) 1 $\beta$ , que es liberada por el monocito o macrófago (19, 18). La tercera citocina en aparecer es la interleucina 6 (IL-6), que la producen numerosas células como son los macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células musculares lisas (20,12). La IL-6, es la principal citocina mediadora de la síntesis de las proteínas de fase aguda de inflamación. La síntesis y liberación de las citocinas anteriores induce la participación de otras citocinas como la quimiocina interleucina 8 (IL-8), importante factor quimiotáctico y activador de los leucocitos, movilizándolo a zonas de daño, para permitir la salida de linfocitos a través de la pared vascular. La IL-8 puede ser producida por

células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales, neutrófilos, etc. Además se incrementa la producción de óxido nítrico (NO), que mantiene y amplifica la respuesta inflamatoria (16), Gran parte de estos elementos ejercen una retroalimentación (*feed-back*), positiva sobre la actividad del NF-κB. Estos son reguladores proteicos clave de la respuesta inflamatoria. Así la membrana vascular endotelial al ser activada expresa las moléculas de adhesión

La respuesta inflamatoria debida a la inhalación continúa de material particulado a nivel laboral, provoca problemas graves de salud, los cuales son más severos en personas susceptibles o con enfermedades pulmonares preexistentes

### **Moléculas de adhesión**

Las moléculas de adhesión son proteínas de superficie celular que participan en la unión de células (12). Algunas citocinas inducen y regulan la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales y de su expresión depende la adhesión de monocitos a células endoteliales (21). Evento inicial en el proceso de inflamación (22). La adhesión de los linfocitos a las célula endotelial capilar es básica en la defensa del huésped y en el mantenimiento de la integridad vascular (11).

En la primera fase de adhesión, participa la selectina-P, la cual se encuentra preformada en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas. (13, 23) Esta selectina actúa en la primera fase de adherencia la cual determinan la velocidad del rodamiento de los leucocitos

circulantes los cuales se anclan a las selectinas expresadas en el endotelio vascular activado y si bien esta unión es relativamente laxa, esta es suficiente para funcionar como un freno que desacelera el rodamiento de los leucocitos sobre la célula endotelial (13).

En la segunda fase la Selectina-E, se expresa en las células endoteliales después de su activación por citocinas, principalmente IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que promueven la adhesión de neutrófilos, monocitos y eosinófilos al endotelio (23,14). Luego de esta unión se separan totalmente o se unen más como resultado de la acción de las integrinas u otros CAMS. Los principales ligandos de las integrinas son los ICAM-1, ICAM-2 y el VCAM-1 que son las moléculas de expresión endotelial. Las integrinas son fundamentales en la segunda y tercera fase de adherencia de los leucocitos al endotelio; durante la segunda fase por acción de la citocina IL-8, las integrinas se incrementan en los neutrófilos (24) lo que causa cambios conformacionales en las integrinas leucocitarias. Entonces, durante la fase de rodamiento; los leucocitos son activados por quimio atrayentes que ocasionan gran afinidad entre las integrinas y el endotelio activado

En la tercera fase, se presenta la interacción de las integrinas activadas con sus contra receptores endoteliales (ICAM-1, VCAM-1) ocasionando la adhesión firme de los monocitos al endotelio (20,24). Los niveles de expresión de las moléculas ICAM-1 se pueden aumentar y regular por varias citocinas. Se encuentra aumentado en la inflamación y facilitar el paso de leucocitos del espacio vascular donde, la molécula VCAM-1 se expresa en las células endoteliales activadas por

mediadores de la inflamación y su interacción con la integrina constituye un segundo mecanismo de adhesión de los linfocitos con el endotelio. Las PECAM-1 aumentan la fuerza de unión de las integrinas leucocitarias, además, regula la penetración de los leucocitos a través de la membrana basal endotelial y asiste el paso de neutrófilos y otros leucocitos a los tejidos extravasculares. (20, 24) Por lo tanto al presentarse un proceso de inflamación, la barrera endotelial se vuelve más permisiva para los intercambios del transporte de sustancias y moléculas (fig.2) (11).

De esta manera, la célula endotelial activada responde con un proceso inflamatorio para eliminar el material nanoparticulado extraño que logro penetrar hasta el epitelio alveolar pulmonar.

Fig 2.- Se muestra la activacion endotelial. La expresion de moleculas de adhesion y el rodamiento lde los monocitos y su anclaje.

## NANOPARTICULAS:

La inhalación continua de material particulado a nivel laboral, presenta graves riesgos a la salud, los cuales inician con una respuesta inflamatoria, para eliminar el material particulado (25). Si esta partícula no es eliminada podría desarrollar o incrementar alguna enfermedad pulmonar grave (25, 26). Como la que desarrollan los mineros que extraen carbón o sílice. El  $TiO_2$ , es un material que no se encuentra libre en la naturaleza y que requiere de un proceso de extracción, y a nivel industrial tiene diferentes usos (27,28). Actualmente el desarrollo nanotecnológico ha mejorado el uso del  $TiO_2$  debido a que ha encontrado nuevas características del titanio a nivel nanométrico mejorado su utilidad (29). De esta manera se ha incrementado el consumo del  $TiO_2$  a nivel manométrico, y por lo tanto las personas expuestas a su extracción y reducción (29).

### **Dióxido de Titanio:**

El dióxido de titanio es una de las sustancias químicas más blancas que existen en la naturaleza (31). Está presente en varias formas: rutilo (tetragonal), anatasa (octaédrico) y brookita (ortorrómbico). El  $TiO_2$  es utilizado en diversas industrias. Se usa en la elaboración de pinturas y recubrimientos, (para darle color a juguetes, aparatos electrónicos, automóviles, muebles, papeles, etc) (31). También se utiliza en la elaboración de fibras sintéticas (32). En la industria cerámica y en la elaboración del cemento blanco.. En la industria cosmética se

emplea en la elaboración de más de 500 productos, (cremas de belleza, jabones, filtros solares, lápices labiales, pastas dentales, agua oxigenada, tinturas de cabello, tratamientos anti-arrugas, crema protectora de bebé, máscaras de pestañas, base de maquillaje, aceites corporales, exfoliantes, reductores de poros, tratamientos de estrías y celulitis, , tratamientos capilares, etc.).(32,33) En la industria farmacéutica y en la de alimentos.se utiliza como colorante en caramelos y dulces, helados, chicles, cremas para café, salsas para ensaladas, queso, se usa para blanquear la leche descremada, y para dar una textura mas cremosa etc.(33). La industria farmacéutica y cosmética marca al  $TiO_2$  como: material NO-tóxico, compatible con las mucosas y la piel Existen investigaciones realizadas en ratones que han mostrado que el dióxido como nanopartículas, se acumulan en diversos órganos (34,). En otro estudio, al evaluar el dióxido de titanio en los trabajadores que realizan la molienda y trituración del rutilo, encontraron que los trabajadores expuestos a  $TiO_2$ , como partícula de  $10\mu m$ , provocó en el 50% de los trabajadores síntomas respiratorios graves acompañados de una reducción de la función pulmonar (35). En otro estudio se reporto que al exponer a ratas a partículas de  $TiO_2$ , este produjo respuesta inflamatoria en vías aéreas (13,14 36), y proponen que, probablemente es debido a que las partículas inclusive las grandes como las Pm de  $10\mu m$  tienen propiedades oxidantes y produce inflamación de vías aéreas e incrementa la permeabilidad de los espacios aéreos (36). En estudios “in vitro”, al exponer las células U937 se observo que la nanopartículas de  $TiO_2$ , indujo apoptosis y necrosis (37). El cambio o reducción del titanio ( $TiO_2$ ) como nanopartículas, implica que el tamaño nano presenta

comportamiento y características diferentes de la partícula, por lo que al ser tan pequeña facilita la captación y su tránsito en las células epiteliales hacia la endotelial y su probable paso a la circulación sanguínea para llegar a diferentes órganos (38, 39)

## **RIESGOS:**

Existen diferentes factores que influyen en la toxicidad de las partículas como: composición química, propiedades de la superficie, carga, reactividad, revestimiento, etc. (40). Desde el punto de vista toxicológico el tamaño es una de las características importantes, ya que al reducir el tamaño del titanio a nanómetros, se produce un considerable aumento del área por unidad de superficie y un mayor número de átomos en la superficie, lo que aumenta la reactividad de la partícula. En general, cuanto más reactiva sea una sustancia, es más tóxica. Esta característica hace que una determinada masa de nanomateriales en forma de nanopartículas sea más reactiva que la misma masa de material en escala mayor. (41). El  $\text{TiO}_2$ , al tener una mayor proporción de átomos de superficie, se comportara de manera diferente.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que las nanopartículas fabricadas, actualmente tienen un amplio uso comercial, como el zinc, el óxido de zinc, la plata y el dióxido de titanio. Los materiales al reducirlos a nanometros, plantean nuevos riesgos de toxicidad (41, 42).

Las nanopartículas podrían causar además patologías a largo plazo. En 2008 Ryman-Rasmussen y col. publicaron que los nanotubos de carbón causan una

patogenicidad similar a la del asbesto y la aparición de mesotelioma en ratas de laboratorio (43). Existe evidencia que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> pueden atravesar la placenta (44, 45), lo que constituye un riesgo para los fetos en desarrollo, debido a que la inflamación pulmonar materna organiza la liberación de moléculas de señalización que, potencialmente, afectan tanto a la madre y el feto. Además trabajos preliminar sugiere que el sistema nervioso del feto es especialmente sensible a la exposición de partículas durante el embarazo (46).

Los estudios anteriores realizados en ratas y ratones, proporcionan evidencias del poder de penetración que tiene el TiO<sub>2</sub> al ser inhalado como nanopartícula, además del incremento del estrés oxidativo (47, 48), muerte celular y apoptosis (49). Por lo que nos preguntamos

Si la nanopartícula de TiO<sub>2</sub>, tendrá la capacidad de activar a las células endoteliales, pero a través de la exposición de esta nanopartícula en la célula epitelial, como ocurría en un sistema "in vivo

## **Planteamiento del problema:**

La ruta más importante de exposición a material particulado se da en los lugares de trabajo, ya que al momento de la inhalación estas ingresarán al aparato respiratorio. Aunado a esto cuando de manera laboral en el aire que respiramos encontramos material particulado a escala nanométrica, existe la posibilidad de que al inhalar este material, no solo se depositen a lo largo del sistema respiratorio sino que llegue a lugares más internos de este sistema como es la interface –alveolo-capilar.

Una vez que esta nanopartícula ingresa a esta interface. La manera en que la nanopartícula de TiO<sub>2</sub>, podrá ser eliminada para no ocasionar problemas de salud dependerá de diferentes factores (como por ejemplo la concentración de la nanopartícula, el material que la compone, su toxicidad y su tamaño). Si la nanopartícula se encuentra en el entorno laboral lo más probable es que esté presente en el ambiente en altas concentraciones. Otro de los aspectos importantes a destacar son las propiedades químicas y físicas del material, que al ser reducido a escala nanométrica cambian. Como lo demostró Poland y col en el 2008 (50). Al inyectar ratones con asbesto y con muestras comerciales de nanotubos de carbón de diferentes tamaños, en este estudio cuando examinaron el tejido de las cavidades abdominales de los roedores, los investigadores vieron que los nanotubos se comportaban como asbesto, provocando inflamación y lesiones a los tejidos. Además en otro estudio publicado en 2009 se reportó que cuando se realizó la explotación comercial de amianto, para la industria de la construcción, causó enfermedades pulmonares graves (51, 52) que

desencadenaron en la muerte de más de la mitad de los trabajadores expuestos al polvo de amianto. El comportamiento de este material condujo a la desaparición de esta industria.

El principal mecanismo de acción de las nanopartículas por inhalación o por vías cutánea parece ser la generación de radicales libres y el estrés oxidativo asociado con la reactividad de la superficie (53, 54). El estrés oxidativo asociado con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, dan como resultado procesos inflamatorios tales como un aumento en las células polimorfo nucleares, alteración de la fagocitosis de macrófagos entre muchos otros. Otro estudio muestra que una única instilación de TiO<sub>2</sub> produce hiperplasia de células caliciformes (2005).

Estudios sobre TiO<sub>2</sub> y cuarzo (55), ilustrar la compleja relación entre la toxicidad y las características de las partículas, el estudio hace referencia a que las nanopartículas, son siempre mucho más tóxicas y menciona que la exposición combinada incluso con fines terapéuticos están empezando a dar vista de los riesgos de estos nanomateriales y de la importancia de comenzar a tomar medida de prevención en el uso moderado y bien legislado de nanomateriales. Por lo tanto, en términos de salud pública y ocupacional, estas investigaciones alerta sobre la manipulación y obtención de materiales lo suficientemente pequeños presentes en el aire que se inhalan en ese ambiente laboral, y que al estar expuestos a ellos ya sea a altas concentraciones o de manera constante, a

largo plazo el inhalar la nanopartícula de TiO<sub>2</sub> con características diferentes le pueden conferir una toxicidad no explorada y no estudiada.

El uso de TiO<sub>2</sub> como nanopartícula va en aumento. En América Latina Brasil, cuenta con la principal reservas de TiO<sub>2</sub>, sus depósitos naturales tienen un valor estimado de 55 millones de toneladas. Se obtienen 80.000 toneladas de TiO<sub>2</sub> por año. Sin embargo, el primer exportador de este producto es México. Las exportaciones de TiO<sub>2</sub> en 2010, alcanzaron los 176,6 millones de dólares (US\$) Ello implica un alza del 8,7% respecto a los registros de 2009, año en el cual las ventas superaron los US\$161 millones. La venta de dióxido de titanio en México presento un incremento de US\$34 millones (56).

En México los trabajadores expuestos a la nanopartícula de Tio<sub>2</sub> va en aumento como lo reporta la revista *Manufactura* publicada el 13 de mayo del 2011. “ Con una inversión de más de 500 millones de dólares (mdd) en su planta de Altamira, Tam, DuPont buscará incrementar la producción de dióxido de titanio para posicionarse como líder global en la producción de este material empleado como blanqueador en casi todas las ramas industriales” (52,57). Este desarrollo a nivel nano tecnológico implica un incremento de la exposición laboral de las personas que manipulan el TiO<sub>2</sub>. Por lo que surge la necesidad de evaluar los efectos del TiO<sub>2</sub> como nanopartícula (NPs-TiO<sub>2</sub>).

La evaluación in vitro de la respuesta celular es un medio eficaz para aclarar el comportamiento de las nanopartículas (58,59,60,61,62)

## **HIPÓTESIS:**

Si Las células epiteliales expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub> se activan e inducen la producción de citocinas proinflamatorias y además existe comunicación con las células endoteliales entonces se activaran las células endoteliales y por lo tanto se inducirá la expresión de moléculas de adhesión y con ello la adhesión de monocitos,

## **Justificación:**

Diferentes estudios mencionan que dependiendo de los contaminantes que transporte el aire, su concentración y el tiempo de exposición será el grado de daño que presenten las personas expuestas a ellos. Existen reportes que indican que algunas sustancias presentes en el aire contaminado pueden producir lesiones pulmonares, malformaciones congénitas y cáncer (63, 64, 65, 66). Aunado a esto el desarrollo y la demanda de productos con nanotecnología ha ocasionado que el TiO<sub>2</sub> por sus características se utilice cada vez más en gran variedad de productos, tanto alimenticios como médicos y cosméticos entre muchos otros. En México cada vez existe un mayor número de personas expuestas a este nano material, debido a que somos el primer exportador en Latinoamérica de TiO<sub>2</sub>, además como se menciona anteriormente en Tamaulipas,

se realizó una inversión de más de 500 millones de dólares en nuestro país. La extracción y desarrollo nanotecnológico del TiO<sub>2</sub> en nuestro país con lleva a que cada vez exista un mayor número de personas expuestas a nanomateriales de TiO<sub>2</sub> con altas concentraciones y prolongado tiempo de exposición, al extraer o reducir el TiO<sub>2</sub>, lo que puede causar serios trastornos a la salud. Estudios sobre TiO<sub>2</sub> muestran la compleja relación entre la toxicidad y el tamaño de las nanopartículas, por lo que creemos que es necesario investigar el comportamiento del TiO<sub>2</sub> como nanomaterial al ser inhalado y llegar hasta la interface alveolo-capilar y no esperarse para que después de 20 o 30 años muestre en las personas expuestas la toxicidad del TiO<sub>2</sub> como nano material al presentar problemas de salud graves.

### **OBJETIVO GENERAL:**

En un sistema de co-cultivos determinar si las NPs-TiO<sub>2</sub>, son capaces de inducir una respuesta proinflamatoria en las células epiteliales y si esta respuesta es capaz de activar a las células endoteliales.

## OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Establecer un modelo de co-cultivos entre las células epiteliales (A549) y endoteliales (HUVEC)
- 2.- Determinar la magnitud de adhesión de monocitos en las células endoteliales en los co-cultivos tratados con Nps-TiO<sub>2</sub>
- 3.- Determinar la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, posterior a la exposición de las células epiteliales a NPs-TiO<sub>2</sub>.
- 4.- Determinar la concentración de interleucinas de células epiteliales y endoteliales al exponer los co-cultivos a NPs-TiO<sub>2</sub>
- 5.- Cuantificar la concentración de nitritos en las células epiteliales y endoteliales al exponerlas a las NPs-TiO<sub>2</sub>.

## METODOLOGIA

### **OBTENCION DE CÉLULAS ENDOTELIALES:**

Las células endoteliales, de vena umbilical humana se obtuvieron de partos normales y cesáreas de mujeres sanas del servicio de Obstetricia de la clínica Troncoso del IMSS. Los segmentos de cordones se transportaron en un amortiguador de HEPES (pH 7.4 GIBCO).

Para la obtención de células endoteliales los cordones se lavaron y desinfectaron externamente con etanol 70%. Se localizó y canuló la vena en uno de los extremos con aguja roma 21fr. La aguja se fijo con una pinza curva tipo Kelly. La vena umbilical se lavó con HEPES, para eliminar los restos de sangre, posteriormente se cierran los dos extremos del cordón con cinturones plásticos, se introduce en la vena colagenasa tipo II (0.2 mg/ml, GIBCO) y se incubó en baño maría durante 20 min a 37°C. Pasado este tiempo, las células endoteliales fueron desprendidas masajeando el cordón de manera firme y gentil con una gasa. Se dieron dos lavados con 25 ml de HEPES, y se centrifugó a 1200 r. p. m. El botón celular se resuspendió en 1 ml de medio 199 suplementado y se siembran (67).

### **CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES**

Las células endoteliales, fueron cultivadas en medio 199 (GIBCO) complementado con antibiótico-antimicótico (GIBCO) con 1%, L-glutamina (2 mM), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.1g, heparina en solución 5U/ml, con 10 % de suero fetal de bovino

(SFB GIBCO) y factor de crecimiento endotelial (Sigma) 25 µg/ml pH 7.2 (70,71). Las células se sembraron en cajas de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> previamente tratadas con gelatina bovina 0.02% (SIGMA). Los cultivos se incubaron en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, hasta llegar a confluencia del 80%. Las células fueron despegadas con tripsina-EDTA (SIGMA) al 0.05 % de 2 a 3 min a 37°C, desprendidas las células se adiciona una solución de HEPES (GIBCO), se aspiraron las células de la caja, se coloca en un tubo falcón de 15 ml y centrifugaron nuevamente, se obtuvo un botón celular, se resuspende en 1 ml de medio y se sembraron nuevamente en cajas tratadas con gelatina y con 7 ml de medio complementado e incubaron nuevamente en las condiciones antes mencionadas.

### **CULTIVO DE CELULAS EPITELIALES A 549**

La línea celular A 549 (ATCC Rokville MD)(77<sup>a</sup>), se cultivo en medio F-12Kainghn's (GIBCO), suplementado con SFB inactivado (GIBCO) al 10% y antibiotico antimicotico (GIBCO) al 1%. Las células se sembraron en cajas de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> e incubaron en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.(73,) Cuando llegan a confluencia del 80%, las células fueron despegadas de la caja con tripsina-EDTA (SIGMA) al 0.05 % a 37 °C, desprendidas las células se adiciono una solución de verseno (GIBCO) a la caja y se aspiró el contenido para

depositarlo en un tubo Falcón de 15 ml, se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 min. Despegadas, se resembraron para continuar su cultivo (68).

### **CULTIVO DE CELULAS U 937**

Las células U 937, se cultivaron en medio RPMI (GIBCO), suplementado con suero fetal bovino (SFB GIBCO) al 10% y antibiótico-antimicótico (GIBCO) al 1%. Las células se sembraron en cajas petri y cada tercer día, se aspiraron de la caja, se colocaron en un tubo falcón de 15 ml, se centrifugaron a 1200 r.p.m. por 5 min y lavaron dos veces con 2 ml de una solución amortiguadora de Hepes. Posteriormente se colocaron en 1 ml de medio RPMI y se resembraron en cajas petri para continuar su cultivo (69).

### **COMUNICACIÓN CELULAR: Nuevo modelo de co-cultivos “in vitro” propuesto por el laboratorio del toxicología ambiental del INCAN.**

Los insertos nunc con membrana de Anopore™, con un tamaño de poro de 0.2µm y un área de cultivo de 4.9 cm, fueron los que se utilizaron para montar los co-cultivos. Se hidrató la membrana externa del inserto con alcohol estéril por 30 seg, se retiró, y se adicionaron 300 µl de gelatina (SIGMA de bovino) al 0.02% por 30 min. Pasados los 30 min., se retiró la gelatina teniendo cuidado de no romper la membrana y se sembraron sobre la membrana tratada 540,000 células endoteliales (HUVEC) contenidas en 300µl de medio 199 (complementado con antibiótico-antimicótico (GIBCO) con 1%, L-glutamina (2 mM), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.1g, heparina en solución 5U/ml, factor de crecimiento endotelial (Sigma) 25 µg/ml pH

7.2, sin suero fetal bovino. Se colocaron los insertos en una placa de cultivo nunc de 6 pozos para permitir la adhesión de las células endoteliales a la membrana externa del inserto, se incubo por 3h, en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Pasadas las 3 h de incubación, tiempo en el cual se adhirieron las células endoteliales a la membrana del inserto. Se cambio de posición el inserto en el pozo de la placa, se giro 180°, quedando las células endoteliales adheridas a la membrana externa del inserto hacia abajo, de tal manera que la parte basal de las células están adheridas a la membrana del inserto y la parte apical está orientada hacia el fondo del pozo de la placa, se adicionaron 2 ml de medio 199 complementado con las mismas características anteriores (sin suero). En esa posición, en el inserto se sembraron en la parte interna 350,000 células epiteliales (A549), con 2 ml de medio F 12K con antibiotico-antimicótico (GIBCO) al 1% sin suero fetal bovino. Se incubaron por 24h en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. En este nuevo sistema de cultivo implementado, tenemos a las células epiteliales y a las endoteliales, interaccionando de manera similar a un sistema “in vivo”, en el cual se respeta la polaridad celular. Terminado el tiempo de incubación se cambiaron los medios de los dos tipos celulares y se expusieron las células epiteliales y las endoteliales tanto a TNF- $\alpha$  (10 ng/cm<sup>2</sup> control positivo) como a las nanopartícula de TiO<sub>2</sub> (10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), (70) además en los controles negativos se colocó un inserto con células epiteliales y endoteliales sin exponer y otro inserto solo con células endoteliales, igualmente sin ninguna exposición y se incubaron por 24h. Terminado este tiempo se colectaron los sobrenadantes de los dos tipos celulares (y congelaron a -70°C), se giro nuevamente el inserto 180° de

tal manera que tenemos a las células endoteliales expuestas hacia arriba y en esta posición se pusieron en contacto con 300  $\mu$ l células U937 (monocitos marcados previamente con timidina tritiada) e incubaron por 3h. Pasadas las 3h de incubación, los insertos que contienen a las células endoteliales y a los monocitos adheridos se lavaron con HEPES, para eliminar a los monocitos no adheridos a las células endoteliales. Se adicionaron 500  $\mu$ l de hidróxido de sodio (200 mM) a la membrana, se dejó a temperatura ambiente toda la noche, posteriormente se colectó y depositó en viales con 3 ml líquido de centelleo. Y se llevaron al contador de centelleo (Pacard) a ser evaluadas. Este experimento se repitió por triplicado.



180°

## EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION EXPUESTAS A TiO<sub>2</sub>

Para la expresión de moléculas, se siguieron los mismos lineamientos y condiciones anteriores del co-cultivo. Se sembraron 540,000 células endoteliales y 350,000 células epiteliales por inserto. Se dejaron incubar por 24h los dos tipos celulares contenidos en el inserto, en una atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Después de este tiempo, se cambiaron los medios de las células epiteliales y endoteliales y se sometieron las células epiteliales a la exposición de TNF- $\alpha$  (control positivo 10 ng/cm<sup>2</sup>) y a las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) por 24h e incubaron en una atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24h. Terminado el tiempo de exposición, se colectó el medio, se lavó la membrana externa del inserto y se adicionó 1 ml de triple expés por 5 min, con mucho cuidado de no romper la membrana y dañar a las células. Se despegaron de la membrana a las células endoteliales, las cuales fueron colectadas. Posteriormente se centrifugaron a 2500 r.p.m por 5 min, se le lavaron y resuspendieron con PBS-albumina (albúmina 8 % y azida de sodio 0.02 %). Se fraccionó el contenido en 6 viales para incubarse con 2  $\mu$ l de anticuerpos monoclonales acoplados a FIT dirigidos contra las selectinas E, P, ICAM-1 y VCAM-1, PCAM por 1 hora en oscuridad, terminado ese tiempo se lavó y resuspendió en 500  $\mu$ l de PBS-albumina y fueron sometidas a un análisis citométrico, el cual se llevó a cabo con un citómetro Facscalibur (Becton Dickinson).

## **ENSAYO DE CUANTIFICACION DE INTERLEUCINAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVOS CELULARES EXPUESTO A TiO<sub>2</sub>**

Para la determinación de interleucinas, se utilizaron Kits de invitrogen, para 96 pruebas, las interleucinas cuantificadas fueron interleucinas 1, 8 y TNF $\alpha$ .

Se realizaron las curvas estándar de cada una de las interleucina de acuerdo al protocolo del fabricante (71). De los sobrenadantes colectados previamente de los experimentos anteriores de células endoteliales y epiteliales expuestos a NP-TiO<sub>2</sub>, a TNF $\alpha$  y sin exposición, se descongelaron y se añadieron 100  $\mu$ l de cada uno de ellos en los pozos de las placas de ELISA. Se incubó la placa con los sobrenadantes por 2 horas a temperatura ambiente, se lavó 4 veces con amortiguador de lavado. Se agregó el anticuerpo biotinilado en todos los pozos con excepción de los pozos A y B (que fueron los blancos) y se incubó por 3 h, se lavo 4 veces con amortiguador de lavado. Se utilizó para el revelado 100 $\mu$ l del cromógeno streptavidina–HRP (peroxidasa). Se incubó 30 minutos a oscuras, tomo coloración azul, se lavo 4 veces. Se agregaron 1000  $\mu$ l de solución de paro a cada pozo, tomo coloración amarilla. Y se midió la densidad óptica (DO) en el lector de placas de ELISA, a 450 nm.

## **CUANTIFICACION DE NITRITOS:**

La producción del óxido nítrico se evaluó a través de un método indirecto midiendo la producción de nitritos utilizando el reactivo de Griess (Sigma G4410-10G).

Se descongelaron los sobrenadantes (congelados  $-70^{\circ}\text{C}$ ) de las células epiteliales expuestas con  $\text{TiO}_2$  y TNF por 24 horas, y los sobrenadantes de las células endoteliales que tuvieron comunicación con las epiteliales expuestas tanto a  $\text{TiO}_2$  como a  $\text{TNF}\alpha$ , también se descongelaron los sobrenadantes control, sin ninguna exposición.

En una placa de ELISA de 96 pozos de fondo plano (falcón) se colocaron  $100\ \mu\text{l}$  de cada uno de los sobrenadantes por triplicado, se adicionaron  $100\ \mu\text{l}$  de reactivo de Griess (Sigma G4410-10G), se incubó en oscuridad por 15 min se midió su absorbancia a una densidad óptica de 540 nm en un lector de placas. Las densidades ópticas se evaluaron automáticamente por el lector de ELISA, según la curva de calibración del lector. La concentración de óxido nítrico, así determinada, fue proporcional a la concentración de nitritos y nitratos presentes en las muestras ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ).

## RESULTADOS:

### COMUNICACIÓN EPITELIO ENDOTELIO:

Se establecieron las condiciones para obtener un modelo de co-cultivos en el que se respetó la polaridad de las células epiteliales y las endoteliales. En este nuevo modelo se obtuvo la comunicación entre estos dos tipos celulares..



180°

Fig.3.- Modelo propuesto formando la interface alveolo-capilar. Se observa el giro de 180° de las células endoteliales, para los experimentos de adhesión y obtención de sobrenadantes.

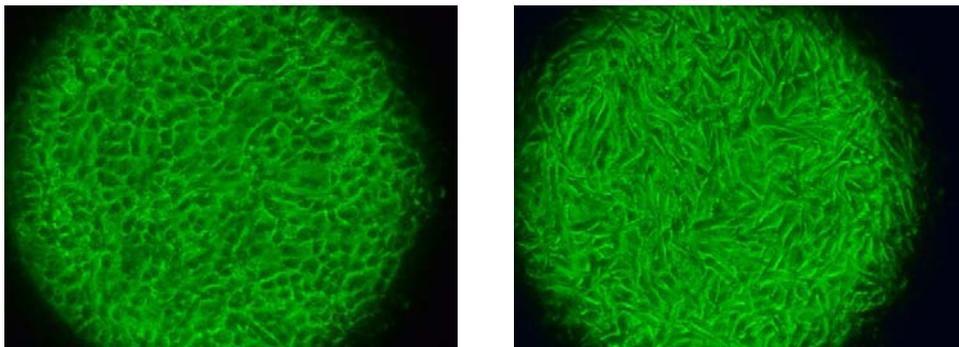


Fig4 Se establecieron las condiciones para obtener un modelo de co-cultivos en el que se respetó la polaridad celular y la comunicación de las células epiteliales hacia las endoteliales

### **Caracterización de las NPs-TiO<sub>2</sub>**

Las nanopartículas de dióxido de titanio utilizadas en este estudio, se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido (MEB). Se observa que forman agregados de un tamaño de más de 500nm (Figura A y B). La caracterización se realizó en M199 suplementado con 10% de SFB. Bajo estas condiciones el tamaño de los agregados de nanopartículas osciló entre 105 y 1281 nm, con una media de 421 nm. El potencial Z de las nanopartículas fue de -6.98 mV (Figura C). El análisis de difracción de rayos X mostró que las dos isoformas presentes en las NPs-TiO<sub>2</sub> son la anatasa con un 99% y el rutilo con 1% (Figura D).

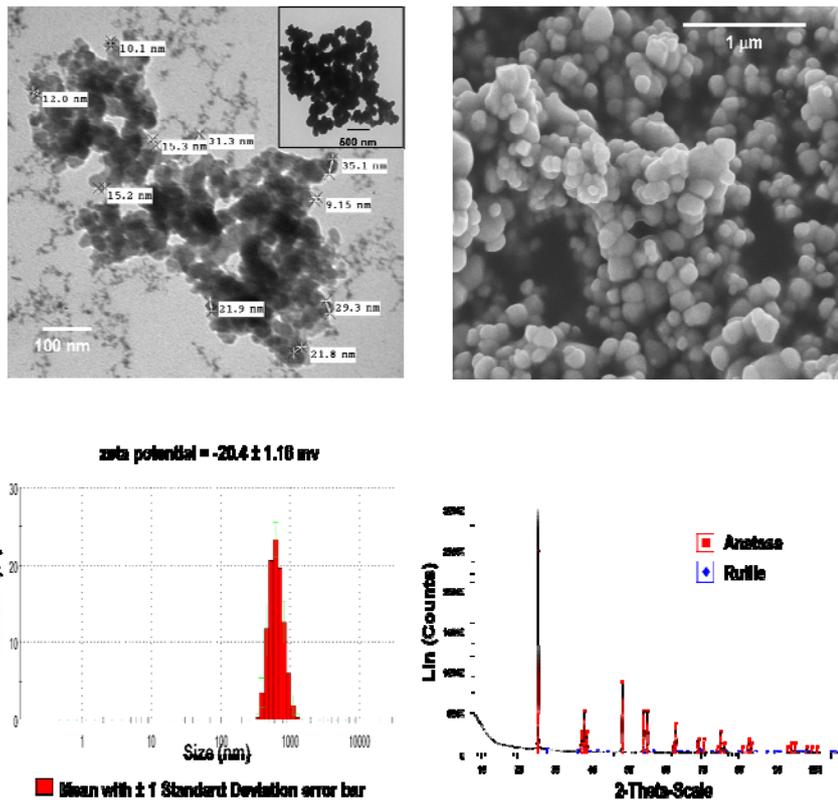


Fig.-5 Caracterización de las NPs-TiO<sub>2</sub>. Las NPs-TiO<sub>2</sub> se suspendieron en M199 suplementado con 10% de SFB y se analizaron por TEM a un aumento directo de 50000x (A) y por MEB a un aumento de 40000x (B). El tamaño de las NPs y el potencial Z se determinaron en un Zetasizer Nano (C). La composición de las partículas se determinó por difracción de rayos X. (D).

## ADHESION DE MONOCITOS:

Se activaron las células endoteliales, en presencia de TNF- $\alpha$  y NPs de TiO<sub>2</sub> en las células epiteliales. La adhesión de los monocitos (U937) marcados con timidina tritiada fue mayor a las células endoteliales con respecto al control positivo. La adhesión de monocitos (U937) a células endoteliales (HUVEC) fueron

directamente proporcionales a los centelleos por minuto (CPM) evaluados en el contador de centelleo (Pecard). Como se muestra en la figura No. 6

Los controles negativos de este modelo no tuvieron ningún tratamiento .y fueron de dos tipos, el primero está compuesto del co-cultivo de células endoteliales-epiteliales y el segundo solo de células endoteliales, en ambos controles negativos (sin tratamiento), no se observo adhesión significativa de los monocitos marcados con timidina tritiada figura1.

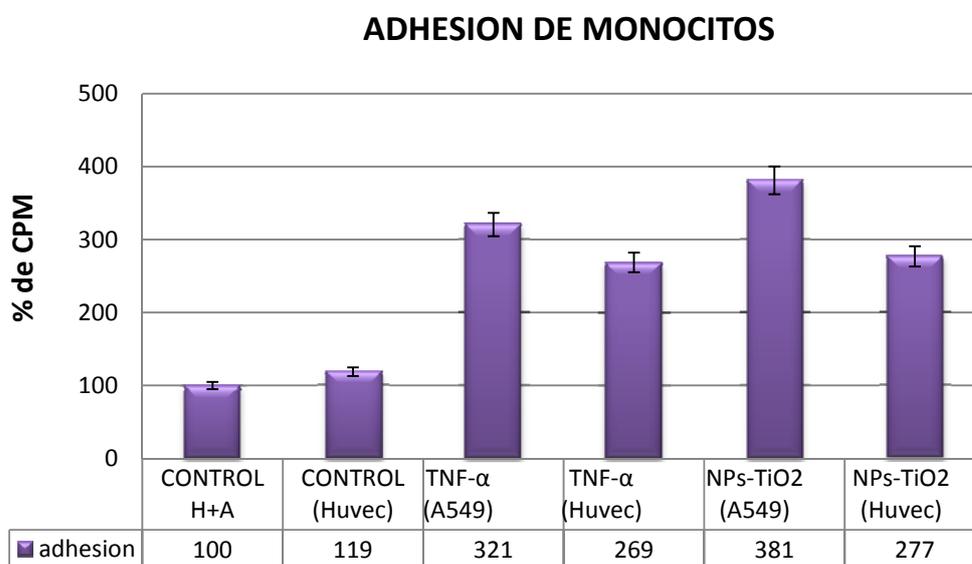


Figura 6.- **Efecto de las NPs-TiO2 en la adhesión de monocitos.**- En el primer control negativo con una adhesión de 1.0 se utilizo el nuevo modelo de co-cultivos interaccionando células epiteliales y endoteliales. El segundo control negativo con una adhesión de 1.2 solo tiene células endoteliales. En la tercera barra de la grafica con adhesión 3.2 el TNF  $\alpha$  se puso en las células epiteliales. En la cuarta barra con 2.7 el tratamiento se puso en las células endoteliales (HUVEC). En la quinta barra se expusieron las células epiteliales a NPs-TiO2 y se observa una adhesión de monocitos mayor que las anteriores de 3.8. En la sexta barra se expusieron a NPs-TiO2 las células endoteliales y se obtuvo una adhesión de 2.8

## EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION TEMPRANA

Las células epiteliales expuestas a TNF- $\alpha$  y a NPs de TiO<sub>2</sub>, activaron a las células endoteliales y se obtuvo la expresión de la selectina E. La evaluación se hizo por citometría de flujo.

### Moléculas de adhesión temprana: Selectina E y Selectina P

En las moléculas de expresión temprana, se observa claramente que al tratar las células epiteliales con las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, a concentraciones de 10,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  estas lograron activar a las células endoteliales, expresando moléculas de adhesión temprana como la Selectina E, la cual presentó un incremento 4 veces mayor que el control negativo y el control positivo. Lo que respecta una expresión significativa. Con respecto a la Selectina P, no se observa una expresión significativa de la selectina P, ya que su expresión es muy similar a la del control positivo.

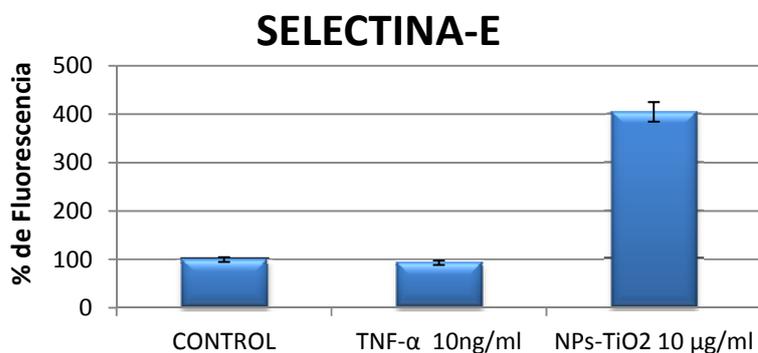


Fig.-7 . Expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales. El efecto de la comunicación de las NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 10,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en las células epiteliales, se evaluó en células endoteliales. Con anticuerpos monoclonales contra Selectina E acoplados a FIT. Y se observa un incremento 4 veces mayor que el control negativo y el positivo

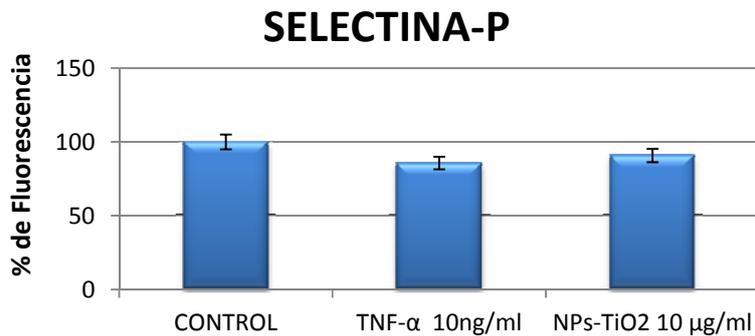


Fig8.- . Expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales. El efecto de la comunicación de las NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 10,  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> en las células epiteliales, se evaluó en células endoteliales. Con anticuerpos monoclonales contra Selectina P acoplados a FIT. Se observa que no existió expresión de la Selectina P.

## EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION TARDIA

Se evaluó la expresión de moléculas de adhesión tardía ICAM-1, V-CAM y P-CAM, en las células endoteliales al exponer a las células epiteliales a TNF- $\alpha$ , (10ng/cm<sup>2</sup>), y a NPs de TiO<sub>2</sub>, (10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) y se evaluó mediante el citómetro de flujo.

La expresión de ICAM-1 de las células endoteliales al exponer a las células epiteliales a TNF- $\alpha$ , y a NPs de TiO<sub>2</sub>, incremento de manera significativa con respecto al control positivo (TNF) y al control negativo

Al evaluar la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales, se observa la respuesta de las células endoteliales con un incremento significativo con respecto al control negativo y se muestra una clara activación de las células endoteliales y una expresión de esta Selectina VCAM.

Con respecto a PCAM, se observa que la respuesta de las células endoteliales, es muy similar a la que presenta con el control positivo. Sin embargo la expresión de esta molécula de adhesión con respecto al control negativo presenta un aumento

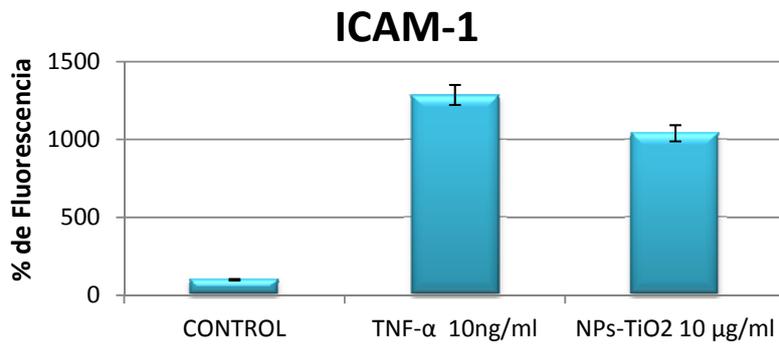


Fig9.- . Expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales. El efecto de la comunicación de las NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 10,  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> en las células epiteliales, se evaluó en células endoteliales. Con anticuerpos monoclonales contra Selectina I-CAM-1 acoplados a FIT. Se observa que la expresión de I-CAM incremento 10 veces más con respecto al control negativo, pero no es mayor que la respuesta de control positivo que fue 49 veces mayor que el control negativo.

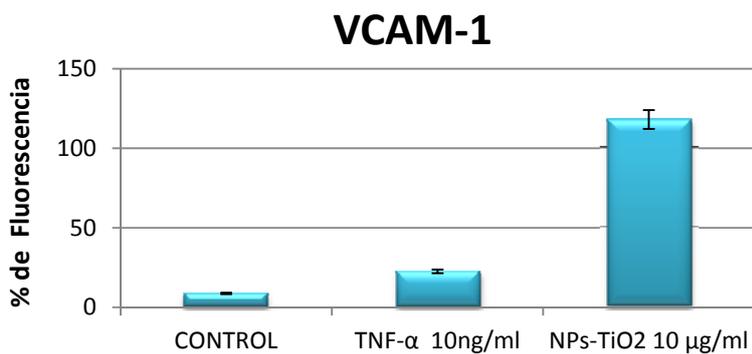


Fig10- . Expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales. El efecto de la comunicación de las NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 10,  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> en las células epiteliales, se evaluó en células endoteliales. Con anticuerpos monoclonales contra Selectina V-CAM acoplados a FIT. La expresión de V-CAM fue 13 veces mayor que el control negativo y 10 veces mayor que el control positivo

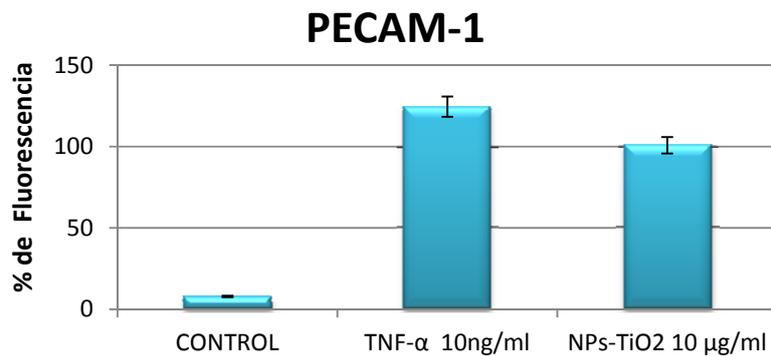


Fig11- . Expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales. El efecto de la comunicación de las NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 10, µg/cm<sup>2</sup> en las células epiteliales, se evaluó en células endoteliales. Con anticuerpos monoclonales contra Selectina PECAM-1 acoplados a FIT. Se encontró que la expresión de PECAM-1 es 13 veces mayor que el control negativo. Y 3 veces menor que la respuesta de control positivo que es 16 veces mayor que el control negativo.

## RESULTADOS DETERMINACION DE NITRITOS

De los sobrenadantes de los co-cultivos de los experimentos anteriores, se midió la concentración de nitritos de las células epiteliales (A549) y de las endoteliales (HUVEC) expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 10, µg/cm<sup>2</sup>. Al determinar la concentración de nitritos se observa un incremento de estos en los sobrenadantes de las células epiteliales

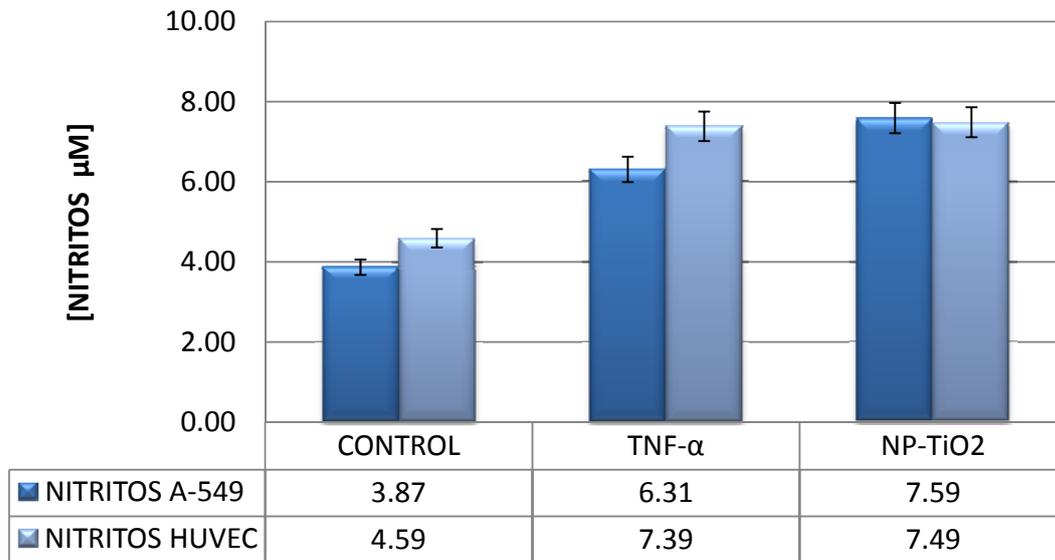


Fig12.- . Determinación de nitritos utilizando el reactivo de Gries. La concentración de nitritos de las células epiteliales (A549) expuestas a NP-TiO<sub>2</sub> presento un ncremento de 0.96 en relación al control positivo y en relación al negativo de casi el doble. Las endoteliales (HUVEC), presentaron un incremento de 0.6 con respecto al control negativo y en relación al positivo no presentaron ningún incremento.

## DETECCION DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

En los sobrenadantes de las células A549 (de los co-cultivos) y los sobrenadantes de las células endoteliales (HUVEC), se determino la presencia de las citocinas pro- inflamatorias. Se encontró que la concentración de TNF- $\alpha$  fue mayor en las células epiteliales (A549).y con respecto al control negativo prsentan una diferencia significativa de liberación de esta citocina.

Se cuantifico una liberación de IL-1 $\beta$ , pobre. La IL-6, presento casi el mismo comportamiento en los dos tipos celulares. En la IL-8, no se logro detectar ningún incremento de estas interleucinas proinflamatorias

## TNF $\alpha$

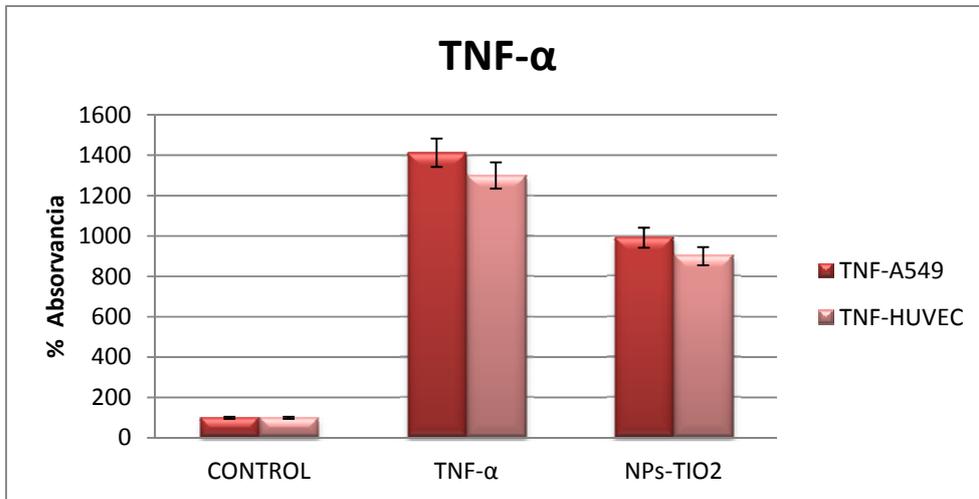


Fig. 13.- Detección de TNF- $\alpha$ . Se midió la concentración de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de las células epiteliales encontrándose un incremento 14 veces mayor que el control negativo y en las células endoteliales un incremento 13 veces mayor. Los sobrenadantes de las células epiteliales expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub>, presentaron un incremento casi 10 veces mayor con respecto al control negativo pero 4.2 veces que TNF. Los sobrenadantes de los co-cultivos de las células endoteliales presentaron un incremento 9 veces mayor que el control negativo pero 4 veces menor que TNF.

## IL -1 $\beta$

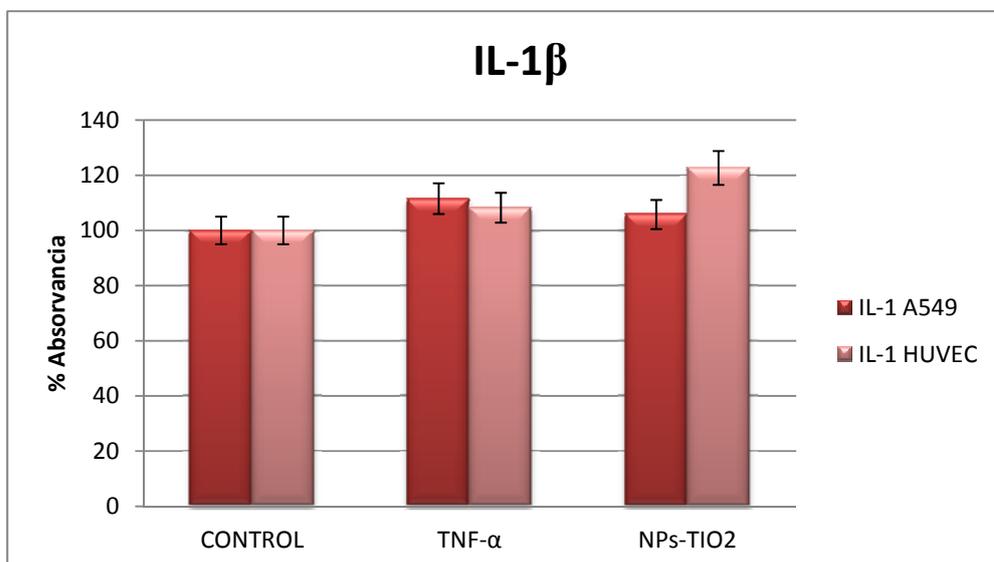


Fig 14- DETECCION DE IL-1 $\beta$ . La concentración de Interleucina 1 de 0.23 en los sobrenadantes de los co-cultivos de las células endoteliales expuestas a NPs- TiO<sub>2</sub>, no presenta una diferencia importante entre los controles positivo y negativo.

## IL-6

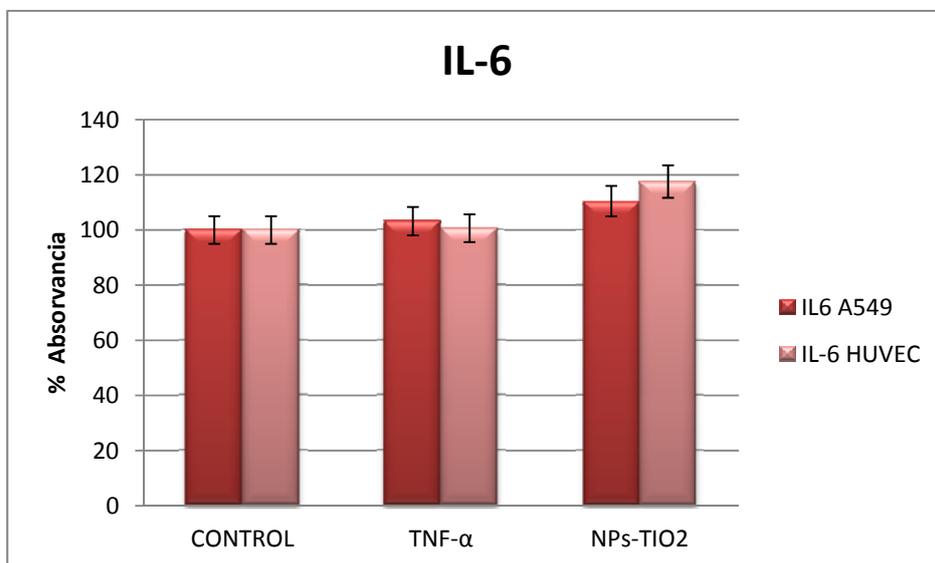


Fig.15.- DETECCION DE IL6. La concentración de Interleucina 6 de 0.2 y 0.1, en los sobrenadantes de los co-cultivos de las células endoteliales y epiteliales expuestas a NPs- TiO<sub>2</sub>, no presenta una diferencia importante entre los controles positivos y negativos.

## IL-8

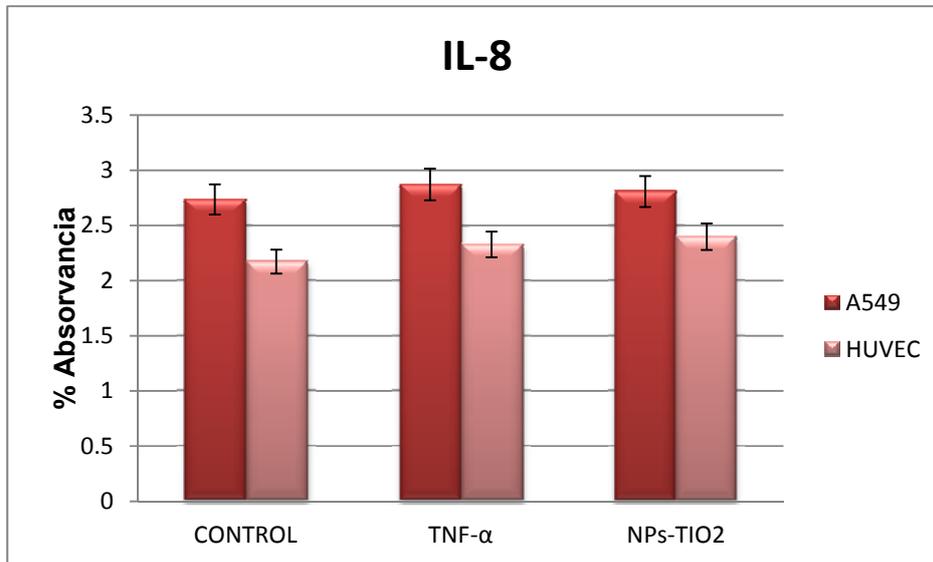


Fig.16.- Se midió la concentración de interleucina 8 (IL-8) en los sobrenadantes de las células epiteliales (A549) expuestas a NPs-TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 10, µg/cm<sup>2</sup> y en las endoteliales en comunicación con ellas y no se observa una respuesta significativa ni en el control positivo (el TNFα), ni en los sobrenadantes de las células tratadas con las nanopartículas tratadas

## DISCUSIÓN

### Comunicación epitelio-endotelio:

Se estableció un nuevo modelo de co-cultivos, en el cual se respetó la orientación de las células epiteliales y endoteliales, simulando un sistema “in vivo” con la interacción que tendría un epitelio alveolar y un endotelio vascular. Esta interacción es necesaria en un organismo vivo para el intercambio gaseoso (11,15, 28). En este intercambio cada vez que respiramos introducimos grandes cantidades de aéreo partículas, gases tóxicos y microorganismos que pueden ser depositados si son muy pequeños en los alveolos (13). Por lo que se han realizado investigaciones en células epiteliales y endoteliales expuestas a diferentes partículas como por ejemplo las del ambiente urbano (72), o ambiente laboral minero (25,26). Sin embargo, faltan estudios de las partículas de  $\text{TiO}_2$  en escala de nano partícula.— Esto, debido a que es diferente la exposición que tenga un trabajador expuesto al  $\text{TiO}_2$  como partícula laboral de  $10\ \mu\text{m}$  (25) o más grande la cual se quedaría en regiones de vías respiratorias altas, en donde el organismo cuenta con un mayor número de armas para eliminar las partículas. Pero al ser expuesto al  $\text{TiO}_2$  como nano partícula, él penetra más profundamente y por su tamaño llega a regiones tan profundas del sistema respiratorio como serían los alveolos, estos al no poder eliminarla por ser tan pequeña no las detecta, o bien pueden causar un proceso inflamatorio en el cual al tratar de eliminarla la nano partícula, podría causar el efecto contrario, que la nanopartícula entre a torrente sanguíneo y viajara a otros órganos. Estas son interrogantes de las que no se conocen respuestas, ni tampoco se saben los problemas que podrían causar a

la salud de los trabajadores a largo plazo. Sin embargo, ninguno de los estudios actuales, presenta un modelo que respete la polaridad celular y ha estudiado la respuesta de las células endoteliales al ser activadas a través de las células epiteliales, como ocurriría en un sistema “in vivo, al exponerla a nano-partículas de TiO<sub>2</sub>. Por lo que el desarrollo de este modelo nos permitirá, obtener una respuesta del endotelio vascular, el cual participa activamente en el proceso de inflamación, una respuesta crucial de defensa del organismo al ser expuesto a material extraño y tratar de eliminarlo.

### **Adhesión de monocitos:**

. En el modelo de co-cultivos implementado. La respuesta del incremento de adhesión de los monocitos (U937) a las células endoteliales, fue mayor cuando la exposición de nanopartículas de dióxido de titanio se da en las células epiteliales, las cuales, envían señales de eliminación del material extraño, a las células endoteliales activándolas e incrementando la adhesión de monocitos como sucede “normalmente”, “in vivo”. Las moléculas de adhesión son las responsables de la interacción que se da entre las células endoteliales y las células que viajan en el torrente sanguíneo (21, 38), por lo que la adhesión es importante en el tráfico de células linfoides, en procesos inflamatorios y en metástasis tumorales(15, 73). Por lo tanto el detectar la generación e incremento

de las moléculas de adhesión es de gran importancia ya que este es un fenómeno indispensable en la generación de la respuesta inmune de un organismo en donde la migración de los monocitos hacia el sitio de inflamación (20, 21), esta mediado por el incremento de las moléculas de adhesión y de su expresión.

### **Expresión de moléculas de adhesión temprana:**

Con los resultados anteriores al observar el incremento de adhesión de los monocitos en las células endoteliales, nos propusimos evaluar que tanto se expresaban las moléculas que están permitiendo la adhesión de los monocitos por lo que evaluamos tanto moléculas de adhesión temprana (selectina E y P), como moléculas de adhesión tardía (I-CAM, V-CAM y P-CAM). Encontramos que:

1) La expresión endotelial de la Selectina P, no se detecto, probablemente debido a que la selectina P está implicada en etapas muy tempranas de adhesión (11, 15,41). La selectina-P, se expresa en minutos en las células endoteliales y posteriormente se internaliza por lo que su expresión es transitoria, de minutos y a las 24 horas que evaluamos su expresión en las células endoteliales lo más probable es que ya no estuviera activa. (74)

2) La expresión de la Selectina E, presento un incremento significativo (**P= .001**) en las células endoteliales activadas probablemente por citocinas como la IL-1beta y/o el TNFalfa las cuales son las responsables de modular la expresión de

la selectina E, y que persiste de 24 a 48 horas (15, 23, 74). Por tal motivo al nosotros evaluar su expresión a las 24 h de exposición, se logro detectar de manera muy clara el incremento de su expresión.

3) En relación a la expresión de las moléculas de adhesión tardía, I-CAM-1, V-CAM y P-CAM, encontramos que al exponer las células epiteliales con NPs-TiO<sub>2</sub> en las células endoteliales, todas incrementaron la expresión de estas moléculas de adhesión. Sin embargo es notable el incremento de la expresión de V-CAM, que es 10 veces mayor que el control positivo. Lo que muestra en primer lugar una clara comunicación de las células epiteliales a las endoteliales y en segundo lugar activación de V-CAM en las células endoteliales, esta expresión se observa después de 4 horas y es máxima a las 24 h, por lo que probablemente por eso se logro detectar una mayor respuesta de I-CAM, la cual tiene un papel importante en la adhesión entre la célula endotelial y los monocitos, el incremento de adhesión que se obtuvo nos indica una clara activación endotelial.

### **Determinación de nitritos:**

La concentración de nitritos de células epiteliales (A549) y de endoteliales (HUVEC), expuestas a nano partículas de TiO<sub>2</sub>, fue casi del doble. Sin embargo cuando las NPs-TiO<sub>2</sub> están en las células epiteliales, el incremento es mayor que el control positivo, ya que al detectarla y tratar de eliminarla, además de la producción de citocinas proinflamatorias, otra sustancia importante en este proceso es el oxido nítrico (ON). El incremento de ON en células epiteliales se ha

detectado en el epitelio bronquial de personas asmáticas por lo que el ON se asocia con la respuesta inflamatoria de vías aéreas. En relación a las células endoteliales, se reporta que el ON, incrementa dependiendo de la concentración de citocinas pro-inflamatorias como IL-1beta y el TNF-alfa. En un sistema “in vivo”, la producción de óxido nítrico del endotelio de arterias pulmonares regulan el flujo sanguíneo y el tono vascular incrementando la vasodilatación en enfermedades respiratorias, por lo que el ON es un mediador inflamatorio.

Por lo que al encontrar en nuestros resultados un incremento importante de ON. La presencia del óxido nítrico, en los resultados obtenidos, es una prueba más de la respuesta que tienen las células epiteliales y endoteliales al exponerlas a la nano partícula de dióxido de titanio..

### **Detección de citocinas pro-inflamatorias:**

La determinación de citocinas pro-inflamatorias, en los sobrenadantes de las células epiteliales A549, de los co-cultivos y de las células endoteliales (HUVEC), expuestas a NPs – TiO<sub>2</sub>, nos mostro la presencia muy clara del TNF-α fue 14 veces mayor en las células epiteliales (A549) con respecto al control negativo. Se ha mencionado que las citocinas presentan una vida media muy corta (74), por lo que probablemente no detectamos un incremento significativo de las otras citocinas medidas como IL-1, IL-6, IL-8, sin embargo el solo incremento de TNF-α, en los cultivos nos habla de una activación, tanto de las células epiteliales como de las endoteliales ya que este esta presente en procesos pro-inflamatorios que son el inicio de la respuesta ante un agente extraño. Como sabemos el TNF-α es

el elemento crucial para la inflamación. Las funciones del TNF  $\alpha$  van a depender de la duración y la cantidad de TNF  $\alpha$  expresado. Se ha reportado que altos niveles de TNF- $\alpha$ , están relacionados con una serie de enfermedades pulmonares (75).

### CONCLUSIONES:

- 1) Se estableció un novedoso modelo de co-cultivos "in vitro" respetando la polaridad de los dos tipos celulares simulando la relación que ocurriría en las células epiteliales de un alveolo y endoteliales de vena
- 2) Se Incremento la expresión de Selectina E de expresión temprana y
- 3) VCAM-1 de expresión tardía (moléculas responsables de la interacción)
- 4) Se encontró un incremento en la concentración de nitritos en los sobrenadantes (en respuesta a la Np TiO<sub>2</sub>)
- 5) Interleucinas no se logro detectar de manera clara la expresión de estas solo el TNF- $\alpha$ .

## BIBLIOGRAFIA:

1. - David W. Kaczka , and Raffaele L. Dellacá. OSCILLATION MECHANICS OF THE RESPIRATORY SYSTEM: APPLICATIONS TO LUNG DISEASE. Crit Rev Biomed Eng. 2011; 39 (4): 337–359.
2. - S. N. Ghadiali and Y. Huang: Role of Airway Recruitment and Derecruitment in Lung Injury. Image-based finite element modeling of alveolar epithelial cell injury during airway reopening. J. Appl Physiol. 2009 106: 221–232.
3. - Nancy T Mendonça,<sup>1</sup> Jennifer Kenyon, Adam S LaPrad, Sohera N Syeda, George T O'Connor, and Kenneth R Lutchen. Airway resistance at maximum inhalation as a marker of asthma and airway hyperresponsiveness. Respir Res. 2011; 12(1): 96.
- 4.- Felipe Rodríguez de Castro; Olga Rajas Naranjo; Javier Aspa Mar -ARCHIVOS DE3 BRONCONEUMOLOGIA Infecciones .pulmonares De la biología a la clínica 2007, 43 Número Supl.2,
- 5.- Pandey J and Pandey U. Accumulation of heavy metals in dietary vegetables and cultivated soil horizon in organic farming system in relation to atmospheric deposition in a seasonally dry tropical region of India. 2009 , 148(1-4):61-74.
- 6.- Van Alphen M . Emission testing and inhalational exposure-based risk assessment for candles having Pb metal wick cores. Sci Total Environ .1999 (15) 243-244.

- 7.- Mi-HyunAhn , Chun-Mi Kang, Choon-Sik Park, Sang-jun Park, TaiyounRhim, Pyeong-Oh Yoon, Hun Soo Chang, Soo-Ho Kim, Hiroko Kyono, and Kwang Chul Kim. Titanium dioxide particle – induced goblet cell hyperplasia : association with mast cells and IL-13. *Respiratory Research*, 2005; 6 (1): 34-34
- 8.- Liu R, Zhang X, Pu Y, Yin L, Zhang X, Liang G, Li X, Zhang J. Small-sized titanium dioxide nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages in vivo. *J. Nanosci Nanotechnol.* 2010, 10 (8): 5161-9.
- 9- Hiroshi Ishii, Shizu Hayashi, James C Hogg, Takeshi Fujii, Yukinobu Goto, Noriho Sakamoto, Hiroshi Mukae, Renaud Vincent and Stephan F van Eeden Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Rwspiratory Research* 2005, 6:87
- 10.- Cao Y, Tao JQ, Bates SR, Beers MF, Haczku A. IL-4 induces production of the lung collectin surfactant protein-D. *J Allergy Clin. Immunol.* 2004, 113:439–444
- 11.- Trapnell BC, Whitsett JA. Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol.* 2002, 64:775-802.

- 12.- Hammerson F, Hammerson E : Some structural functional aspects of endothelial cell. *Basic Res Cardiol* 1985 :80:491; 49: 677-693
- 13.- Warheit DB, Hansen JF, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr SI, Hartsky MA. Inhalation of concentration of low toxicity dust in rat result in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 145 (1):10-22
- 14.- Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, Kawata Y, Kajikawa O, Martin TR, et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004, 287: 533-42.
- 15.- Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F 2nd, Park DR, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001,164(10):1896-903
- 16.- Roy S, Sharma S, Sharma M, Aggarwal R, Bose M Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell A549: an in vitro correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 2004:112:471–480.
- 17.- Hiroshi Ishii, Shizu Hayashi, James C Hogg, Takeshi Fujii, Yukinobu Goto, Noriho Sakamoto, Hiroshi Mukae, Renaud Vincent and Stephan F van Eeden Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Respiratory Research* 2005, 6:87-95

18.- Schwartz MD, Moore EE, Moore FA, Shenkar R, Moine P, Haenel JB, et al. Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med. 1996, 24:1285-92.

19.- Brow DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V: Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- $\alpha$  cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004, 286:344-353

20.- Wong CK, Ho CY, Ko FWS, Chan CHS, Ho ASS, Hui DSC et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. Clin.Exp.Immunol. 2001, 125:177-183.

21.- Montiel-Davalos A, Alfaro-Moreno E, Lopez\_marure R, PM 2.5 and PM10 Induce the Expression of Adhesion Molecules and the Adhesion of Monocytic Cell to Human Umbilical Vein Endothelial Cell. Inhalation Toxicology. 2007, 19: 91-98

22.- Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. Inhal Toxicol. 1999, 11(8): 709-731

23.- R.ARNOLD, B.HUMBERT, H.WERCHAU, H. GALLATI & W.KONIG  
Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumour necrosis factor receptor type I  
Release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to  
respiratory syncytial virus. Immunology 1994 82 126-133

24. Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Maschio A del. The role of integrins in  
the maintenance of endothelial monolayer integrity. J Cell Biol 1991, 112:479-90

25.- Bang J J, Murr L E. Atmospheric nanoparticles: preliminary studies and  
potential respiratory health risks for emerging nanotechnologies. Journal of  
Materials Science Letters, 2002, 21, 361-366

26.- Aitken R J, Creely K S, Tran C L (2004) Nanoparticles: An occupational  
hygiene review. Health & Safety Executive

27.- Garabrant DH, Fine Lj, Oliver C, Bernstei L, Peters JM. Abnormalities of  
pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers.  
Scand J Work Environ Health 1987 13(1): 47-

28.- Rakesh Kumar Harishchandra, Mohammed Saleem and Hans-Joachim Galla  
Nanoparticle interaction with model lung surfactant monolayers. *Interface* 2010, 7  
:15-26

29.- Fryzek JP; Chadda B; Marano D; White K; Schweitzer S; McLaughlin JK; Blot  
WJ (2003). A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers  
in the United States. *J Occup Environ Med*, 2003, 45: 400-409

30. – Syed K sohaebuddin, Paul T Thevenot, David baker, John W Eaton, Liping  
tang. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent.  
*PARTICLE AND FIBRE TOXICOLOGY* 2010, 7 (22):1-17

31.- Powers KW; Brown SC; Krishna VB; Wasdo SC; Moudgil BM; Roberts SM  
(2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI.  
Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci*,  
2006, 90: 296-303.

31.- Banfield, J. F., Veblen, D. R., and Smith, D. J. (1991). "The identification of naturally  
occurring TiO<sub>2</sub> by structure determination using high-resolution electron microscopy,  
image simulation, and distance-least-squares refinement". *American Mineralogist* 1991,  
76: 343-

32.- Nohynek GJ; Lademann J; Ribaud C; Roberts MS. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev Toxicol*, 2007, 37: 251-277

33.- Barker PJ; Branch A. The interaction of modern sunscreen formulations with surface coatings. *Progr Org Coating*, 2008, 62: 313-320

34.- Shimida A, Kawamura N, Okajima M, Kaewamatawong T, Inoue H, Morita T: Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into blood circulation in the mouse. *Toxicol Pathol*. 2006, 34(7): 949-957

35.- Jiang J; Oberdrster G; Elder A; Gelein R; Mercer P; Biswas P (2008). Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology*, 2: 33-42. <http://dx.doi.org/10.1080/17435390701882478> 156609

36.- Bermudez E, Mangum J B, Asgharian B, Wong B A, Reverdy E E, Janszen D B, Haxt P M, Warhiet D B, Everitt J I. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicological Sciences*, 202 70: 86-97.

37.- Vamanu CI, Cimpan MR, HolPJ, Sornes S, Lie SA, Gjerdet NR .Gjerdet. Induction of cell death by TiO<sub>2</sub> nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicol In Vitro*. 2008, 22(7):1689-96.

38.- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B: Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans *Circulation* 2002, 105(4):411-414

39.- Nurkiewicz TR; Porter DW; Hubbs AF; Cumpston JL; Chen BT; Frazer DG; Castranova V. Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Part Fibre Toxicol*. 2008 5: 1-12

40.- Sager TM; Castranova V . Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: Comparison to ultrafine titanium dioxide. *Part Fibre Toxicol*, 2009 6: 15. 193625

41.- David B. Warheit, Kenneth L. Reed, Christie M. Sayes. A role for nanoparticle surface reactivity in facilitating pulmonary toxicity and development of a base set of hazard assays as a component of nanoparticle risk management. 2009, 21(1): 61-67

42.- Sager TM; Kommineneni C; Castranova V. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: Role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol* , 2008, 5: 17-

43.- Jessica P. Ryman-Rasmussen, Mark F. Cesta, Arnold R. Brody, Jeanette K. Shipley-Phillips, Jeffrey I. Everitt, Earl W. Tewksbury, Owen R. Moss, Brian A. Wong, Darol E. Dodd, Melvin E. Andersen & James C. Bonner: Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nature Nanotechnology* 2009, 4: 747-751

44.- Karin S Hougaard, Petra Jackson, Keld A Jensen, Jens J Sloth, Katrin Löschner, Erik H Larsen, Renie K Birkedal, Anni Vibenholt, Anne-Mette Z Boisen, Håkan Wallin and Ulla Vogel. Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Particle and Fibre Toxicology* 2010, 7:1-16

45.- Nihei Y, Ihara T, Sugamata M: Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *Journal of Health Science* 2009, 55:95-102.

46.- Tsuchiya T, Oguri I, Yamakoshi YN, Miyata N: Novel harmful effects of fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 1996, 393:139-145.

47.- Xia T; Kovochich M; Brant J; Hotze M; Sempf J; Oberley T; Sioutas C; Yeh JI; Wiesner MR; Nel AE. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. Nano Lett 2006 6: 1794-1807

48.- Mauricio Gualtieri, Paride Mantecca, Francesco Certe, Marina Camatini.. Organic compound in tire particle induce reactive oxygen species and heat-shock proteins in the human alveolar cell line A549. Environment International. 2008, 34: 437-442

49.- Qamar Rahman, Mohtashim Lohani, Elke Dopp, Heidemarie Pemsel, Ludwig Jonas, Dieter G Weiss, and Dietmar Schiffmann. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. Environ Health Perspect 2002 110(8): 797-800

50.- Craig A. Poland, Rodger Duffin, Ian Kinloch, Andrew Maynard, William A. H. Wallace, Anthony Seaton, Vicki Stone, Simon Brown, William MacNee & Ken Donaldson. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. Nature nanotechnology. 2008, 3: 423 – 428

51.- Josep Tarrés, Rafael Abós-Herràndiz, Constança Albertí, Xavier Martínez-Artés, Magdalena Rosell-Murphy, Isabel García-Allas, Ilona Krier, Emilia Castro,

Gloria Cantarell, Miguel Gallego, Ramon Orriols. Asbestos- Related Diseases in Population a Fibrous Cement Factory. *Bronchoneumology*. 2009 45.429-434

52.- Josep Tarrés, Rafael Abós-Herrándiz, Constança Albertí, Xavier Martínez-Artés, Magdalena Rosell-Murphy, Isabel García-Allas, Illona Krier, Emilia Castro, Gloria Cantarell, Miguel Gallego, Ramon Orriols. Enfermedad por amianto en una población próxima a una fabrica. *Archivos de Bronconeumologia*, 2009, 45(9): 429-434

53.- Federici, Gillian; Shaw, Benjamin J.; & Handy, Richard D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84(4): 415-430

54.- Geiser M; Rothen-Rutishauser B; Kapp N; Schurch S; Kreyling W; Schulz H; Semmler M; Im Hof V; Heyder J; Gehr P (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect*, 113: 1555-1560

55.- Wang JX; Zhou GQ; Chen CY; Yu HW; Wang TC; Ma YM; Jia G; Gao YX; Li B; Sun J; Li YF; Jiao F; Zhao YL; Chai ZF. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*, 2007, 168: 176-185.

56.- Vanesa Restrepo B TiO<sub>2</sub> mantiene en vilo la industria. *REVISTA LATINA*

NANOTECNOLOGIA UN VISITANTE FORANEO. PUBLICADA EL 22 DE SEPTIEMBRE VOL.15: 20-23

57.- Johnston HJ, Hutchison GR, Chistensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. Part Fibre Toxicol. 2009, 17: 6-33

58- Loretta Müller, Michael Riediker, Peter wick, Martin Mohr, Peter Gehr and Barbara Rothen-Rutishauser. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced tree- dimensional model of the human epithelial airways. Journal of The Royal Society Interface. 2009,

59.- Lehmann, A. D., Blank, F., Baum, O., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. M. Diesel exhaust particles modulate the tight junction protein occludin in lung cells in vitro. Part Fibre Toxicol, 2009, 6: 22- 26

60.- Lehmann, A. D., Parak, W. J., Zhang, F., Ali, Z., Rocker, C., Nienhaus, G. U., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. Fluorescent-magnetic hybrid nanoparticles induce a dose-dependent increase in proinflammatory response in Lung cells in vitro correlated with intracellular localization. Small, Part Fibre Toxicol, 2010, 6: 753-762

61.- Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Muhlfeld, C., and Gehr, P. In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate  
Toxicol in Vitro, 2008 38 (3): 371-6

62.- Alfaro-Moreno, E., Nawrot, T. S., Vanaudenaerde, B. M., Hoylaerts, M. F., Vanoirbeek, J. A., Nemery, B., and Hoet, P. H. Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10.

Eur.Respir.J, 2008, 32: 1184-1194.

63.- Brunekreef B, Forsberg B.. Epidemiological evidence of effects of coarse airbourne particles on health. Eur Respir J 2005; 26: 309-318.

64.- Dockery DW, Pope AC, Xu X y cols.. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. N Engl J Med 1993; 329: 1753-1759.

65.- Brunekreef B, Holgate ST.. Air pollution and health. Lancet 2002; 360: 1233-1242.

66.- Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F y cols.. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. N Engl J Med 2004; 351:1057-1067

67.- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial

Cells Derived from Umbilical Veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973, 52: 2745-56.

68.- Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976. 17 (1): 62

69.- Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937) Christer Sundström, and Kenneth Nilsson *International Journal of Cancer*. 1976, 7(5): 565–577

70.-Montiel-Davalos A, Alfaro-Moreno E, Lopez\_marure R, PM 2.5 and PM10 Induce the Expression of Adhesion Molecules and the Adhesion of Monocytic Cell to Human Umbilical Vein Endothelial Cell. *Inhalation Toxicology*. 2007 19: 91-98

71.- Miki I, Ishihara N, Otoshi M, Kase H. Simple colorimetric cell-cell adhesion assay using MTT-stained leukemia cells. *J Immunol Methods* 1993;164:255-61.

72.- Ernesto Alfaro-Moreno, timS Nawrot, Abderrahim Nemmar and Benoit Nemery. Particulate matter in the environment: pulmonary and cardiovascular effects. *Current opinion in Pulmonary Medicine* 2007, 106: 13-98

73.- Vicki Stone & Ken Donaldson Nanotoxicology: Signs of stress Nature Nanotechnology, 2006, 1: 23 - 24

74.- Jordan S. pober and William C.Sessa. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Naature reviews immunology.2007, 7: 803-815

75.- Jeffrey W. Card, Darryl C. Zeldin, James C. Bonner, and Earle R. Nestmann. Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008, 295: 400–411.