

VIABILIDAD Y CITOTOXICIDAD DE CÁPSULAS NANOMÉTRICAS FUNCIONALIZADAS CON DIÓXIDO DE TITANIO

**Viability and cytotoxicity of
nanometric capsules functionalized
with titanium dioxide**

Curso 2015/16

Julio/2016

Aurora Elisabet Fernández López



FACULTAD DE CIENCIAS

Curso 2015/16

Trabajo Fin de Máster

Viabilidad y citotoxicidad de cápsulas nanométricas funcionalizadas con dióxido de titanio

Viability and cytotoxicity of nanometric capsules
functionalized with titanium dioxide

Universidade de Vigo



Aurora Elisabet Fernández López



D. Miguel A. Correa Duarte, profesor titular del Departamento de Química Física de la Universidade de Vigo.

CERTIFICA:

Que **Dña. Aurora E. Fernández López**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo: **“VIABILIDAD Y CITOTOXICIDAD DE CÁPSULAS NANOMÉTRICAS FUNCIONALIZADAS CON DIÓXIDO DE TITANIO”**.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al título del Máster en Biotecnología Avanzada.

Fdo.: D. Miguel A. Correa Duarte

NOMBRE
CORREA DUARTE
MIGUEL ANGEL -
NIF 36103913P

Firmado digitalmente por
NOMBRE CORREA DUARTE MIGUEL
ANGEL - NIF 36103913P
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, o=FNMT, ou=FNMT Clase 2
CA, ou=500052777, cn=NOMBRE
CORREA DUARTE MIGUEL ANGEL -
NIF 36103913P
Fecha: 2016.07.04 13:44:19 +02'00'

En Vigo, Julio de 2016



Universida_{de}Vigo



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

D. Manuel Becerra Fernández, como tutor académico de la alumna **Dña. Aurora Elisabet Fernández López**, estudiante del Máster en Biotecnología Avanzada, autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Máster: *Viabilidad y citotoxicidad de cápsulas nanométricas funcionalizadas con dióxido de titanio*, para su defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 1 de Julio 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Manuel Becerra Fernández', is written over a faint circular stamp.

Fdo.: Manuel Becerra Fernández

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar mi más sincero agradecimiento a mi tutor Miguel A. Correa y a Carlos Spuch, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. Miguel, fuiste de los pocos que me tendió la mano para poder realizar mi trabajo de fin de máster y siempre te estaré agradecida por ello. Carlos, gracias por estar siempre ahí aunque estuvieras liado con mil cosas, por darme un espacio en tu grupo e intentar facilitarme la incorporación al hospital, sin ti todo hubiera sido mucho más complicado, de eso no tengo duda.

Agradecer al Instituto de Investigación Biomédica de Vigo (IBIV), al Hospital Álvaro Cunqueiro y a la Universidad de Vigo por poder realizar los experimentos en sus instalaciones. Al grupo de Inmunología del departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología de la Universidad de Vigo, especialmente a Luiz, por cederme las células para realizar el cultivo celular y al grupo TeamNanoTech, en especial a Miguel Comesaña y Ana Sousa, agradecerles su amabilidad y ayuda con todo lo relacionado con las nanopartículas.

Adriana y Mai gracias por ofrecerme vuestra ayuda sin pensarlo y hacerme más agradable la estancia en un sitio nuevo y tan lejos de casa; y a Olga por resolver mis dudas en el laboratorio.

A mi tutor académico Manuel Becerra, gracias por contestar todas mis dudas tan rápido, por el apoyo y ánimo, ojalá todos los docentes fueran como tú.

Por último, pero no menos importante, gracias familia por apoyarme en el camino, por estar tan cerca aunque hubieran tantos kilómetros de distancia, y a ti cariño, por tu apoyo y amor incondicional.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Au	Oro
BG	Banda prohibida (del inglés <i>Band Gap</i>)
CINBIO	Centro de Investigación Biomédica
CO₂	Dióxido de carbono
DCF	2', 7'- diclorofluoresceína
DCFDA	2', 7'- diacetato de diclorofluoresceína
DHE	Dihidroetidio
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés <i>EthyleneDinitriloteTraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
eV	Electronvoltio
F-12K	Medio de cultivo Ham F-12 modificado por Kaighn (del inglés <i>Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium</i>)
FBS	Suero bovino fetal (del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i>)
GSH	Glutación
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés <i>HorseRadish Peroxidase</i>)
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (del inglés <i>High-Resolution Transmission Electron Microscopy</i>)
IBI	Instituto de investigación Biomédica de Ourense-Pontevedra-Vigo (IBI)
kHz	Kilohercio
LbL	Ensamble capa a capa (del inglés <i>Layer-by-Layer</i>)
MDA	Malondialdehido
min	Minutos
mL	Mililitro
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
NIR	Infrarrojo cercano (del inglés <i>Near-InfraRed</i>)

nm	Nanómetro
NM/NMs	Nanomaterial/Nanomateriales
NP/NPs	Nanopartícula/Nanopartículas
°C	Grados centígrados
OH·	Radical hidroxilo
O₂⁻	Anión superóxido
PAH	Poli(clorhidrato de alilamina)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDT	Terapia fotodinámica (del inglés <i>Photodynamic Therapy</i>)
QD	Quantum dots
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (del inglés <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SiO₂	Óxido de silicio
TBHP	Hidroperóxido de terc-butilo (del inglés <i>Tert-Butyl HydroPeroxide</i>)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TiO₂	Dióxido de titanio
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
W	Vatio (del inglés <i>Watt</i>)
XEDS	Espectrometría por dispersión de energías de rayos X (del inglés <i>X-Ray Energy Dispersive</i>)
λ	Longitud de onda
μL	Microlitro
μg	Microgramo

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. Nanotecnología, nanomateriales y sus aplicaciones.....	2
2. Nanomedicina.....	3
3. Nanopartículas de TiO ₂	5
4. Nanotoxicidad.....	7
4.1 Métodos de evaluación de la nanotoxicidad.....	9
4.1.1. Ensayos de apoptosis.....	10
4.1.2. Ensayos de actividad metabólica.....	12
4.1.3. Ensayos de estrés oxidativo.....	13
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
1. Síntesis y caracterización de las NPs.....	15
2. Cultivo celular y tratamientos.....	16
3. Estudio de la apoptosis.....	18
4. Estudio de la actividad metabólica: MTT.....	19
5. Estudio del estrés oxidativo.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
1. Caracterización de las NPs.....	22
2. Evaluación de la nanotoxicidad.....	23
2.1. Estudio de la apoptosis.....	24
2.2. Estudio de la actividad metabólica: MTT.....	26
2.3. Estudio del estrés oxidativo.....	29
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	33

RESUMEN

Actualmente la Nanotecnología se encuentra en fase de expansión, con grandes expectativas de crecimiento, dado que las propiedades físico-químicas especiales de los NMs, relacionadas con su elevada área superficial y gran reactividad, los hacen útiles para numerosas aplicaciones en muy diversos ámbitos. Particularmente, las NPs de TiO₂ han atraído mucha atención ya que tienen un gran potencial en muchas aplicaciones biomédicas, incluyendo terapia contra el cáncer y creación de fármacos altamente específicos. Recientemente la utilización de oro como fotosensibilizador, capaz de aumentar la fotorrespuesta del TiO₂ en las regiones infrarroja-visible, ha ampliado su rango de aplicaciones hasta el punto de poder ser utilizado como fotocatalizador de reacciones químicas de interés en medios celulares.

Sin embargo, son todavía escasos los estudios recogidos en la bibliografía sobre la toxicidad de estas NPs a nivel celular y molecular. Es por ello que resulta fundamental establecer sus posibles efectos sobre las células.

El principal objetivo de este trabajo consistió en evaluar la biocompatibilidad de dos tipos de NPs, SiO₂@TiO₂ y SiO₂@Au@TiO₂, y obtener más conocimiento de los efectos producidos por las NPs de Au en la actividad fotocatalítica del TiO₂ en cultivos celulares.

Para ello se ha realizado la caracterización de los efectos nocivos a nivel celular de estas NPs, en un estudio *in vitro* con células tumorales. Como parámetros de citotoxicidad se evaluó la muerte celular por apoptosis, la viabilidad celular por la actividad mitocondrial y la producción de estrés oxidativo por cuantificación de ROS.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una mejor comprensión de la interacción de las NPs con los sistemas celulares y de sus posibles consecuencias. A pesar de no desencadenar muerte celular por apoptosis, se observó una toxicidad dosis-dependiente y una producción de ROS en el caso de las NPs de SiO₂@TiO₂ para las concentraciones más altas, por lo que haría falta seguir realizando evaluaciones a fin de incrementar el conocimiento sobre los posibles efectos nocivos a diferentes niveles.

Por lo que respecta a los efectos producidos por las NPs de oro en la actividad fotocatalítica del TiO₂ en cultivos celulares, los resultados no han sido concluyentes y por ello se debe realizar un nuevo diseño experimental, aumentando los tiempos de exposición y de *post* incubación.

INTRODUCCIÓN

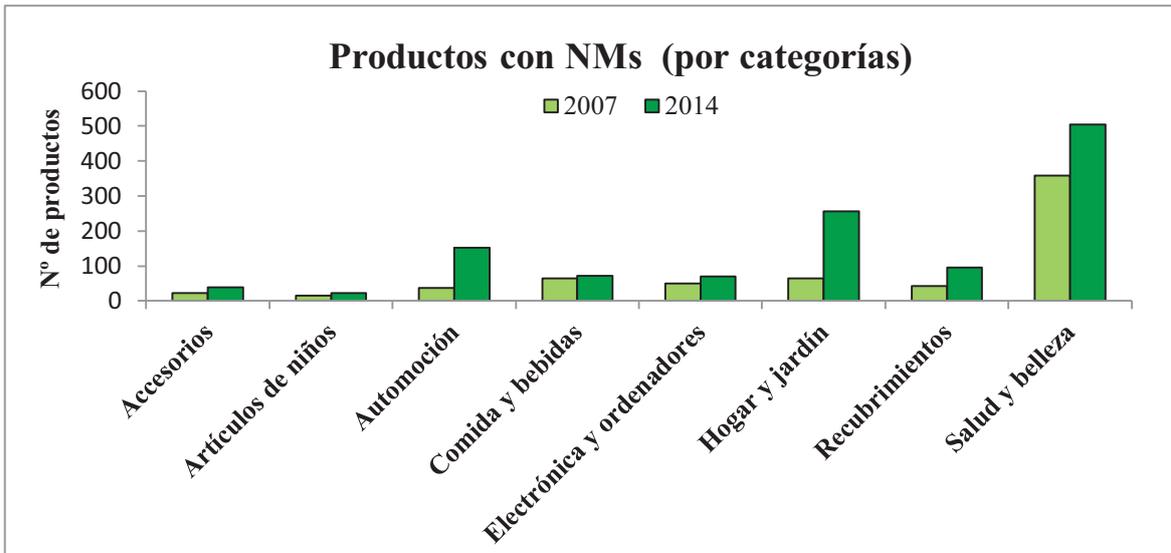
1. Nanotecnología, nanomateriales y sus aplicaciones

El concepto de Nanotecnología nace a partir de las propuestas de Richard Feynman (Premio Nobel de Física en 1965) (Feynman, 1960); y puede ser definida como la actividad científico-tecnológica involucrada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos con al menos una de las dimensiones en la nanoescala (generalmente 1-100 nm) (NNI, 2011). En cuanto a los nanomateriales (NMs) y las nanopartículas (NPs) podemos definirlos como materiales que tienen al menos una de las dimensiones en el rango comprendido entre 1 y 100 nm (Borm *et al.*, 2006).

Dichas definiciones han sido y siguen siendo objeto de controversia debido a su constante evolución a lo largo de los años, por lo que requerirá de una continua revisión al igual que otros términos de este campo.

La nanotecnología está enmarcada en un campo multidisciplinar unificado exclusivamente por la escala de la materia con la que trabaja. Para comprender el potencial de esta tecnología, es clave tener en cuenta el gran área superficial de los NMs y que las propiedades físico-químicas de la materia cambian a escala nanométrica respecto a los correspondientes materiales “bulk” (de mayor volumen y masa), debido a efectos cuánticos. Por lo que una dimensión de 100 nm constituye un límite importante en la nanotecnología, ya que bajo este valor se pueden observar nuevas propiedades de la materia (propiedades ópticas, comportamiento térmico, resistencia material, solubilidad, conductividad y actividad fotocatalítica, entre otras), principalmente debido a las leyes de la Física Cuántica.

En los últimos años, la nanotecnología se está desarrollando a un ritmo frenético en un número creciente de laboratorios de entidades públicas y privadas de todo el mundo, aumentando considerablemente la producción y empleo de nuevos NMs para aplicaciones muy diversas tanto en la industria como en investigación, convirtiéndolos en productos muy demandados (Savolainen *et al.*, 2010). En la gráfica 1 se puede observar la cantidad de productos existentes según distintos ámbitos y su evolución tras 7 años (Vance *et al.*, 2015). Se destaca el elevado número de productos relacionados con la salud y belleza.



Gráfica 1: Productos de consumo disponibles en el mercado que contienen NMs (Vance *et al.*, 2015).

2. Nanomedicina

El desarrollo creciente de la nanotecnología, así como su inserción en las áreas de la salud y la medicina, han dado lugar a la aparición de un nuevo término: Nanomedicina. Éste, tiene como propósito el desarrollo de herramientas basadas en la nanotecnología para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades.

El campo de acción de éstas herramientas se ha dividido de forma general en tres grupos principales: el nanodiagnóstico, la nanoterapia y la medicina regenerativa. El **nanodiagnóstico** consiste en el desarrollo de sistemas analíticos y de imagen que permitan diagnosticar una enfermedad. Dentro del campo del diagnóstico, la nanotecnología está permitiendo el desarrollo de nuevas herramientas que permitan hacer el diagnóstico precoz o temprano, siendo esta una de las aplicaciones más relevantes. La **nanoterapia** pretende dirigir sistemas de liberación de fármacos de forma activa basándose en el uso de esta tecnología. Mediante nanodispositivos se buscan transportar fármacos de forma que puedan llegar dirigidos al tejido enfermo de un forma precisa y liberando las dosis adecuadas de éste. Una de las grandes ventajas de esta tecnología es que permite usar dosis pequeñas del fármaco, y solo afectar el tejido u órgano afectado, impidiendo el daño de tejidos sanos, minimizando los efectos secundarios. La nanoterapia también permite transportar fármacos y moléculas protegidas hasta el tejido diana, donde de otro modo sería imposible porque se degradaría o harían falta concentraciones altas. Por último, la

medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanotecnológicas (Lechuga, 2011).

La variedad de NMs que presentan interés en biomedicina es enorme. Una lista muy breve, con mayor o menor impacto en nanomedicina, incluye NPs de dióxido de titanio (TiO₂), de plata, de hierro, de oro, de dióxido de silicio, quantum dots (QD), poliméricas, nanotubos de carbono y liposomas, entre otros (Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de las principales características y potenciales aplicaciones de diferentes tipos de NPs en nanomedicina.

Tipo de NP	Características	Potenciales aplicaciones biomédicas
Nanoshells	10-300 nm, formadas por un núcleo de sílice y una capa de un compuesto metálico.	Agentes de contraste y liberación de fármacos
De Carbono -Nanotubos	Compuestos alargados de carbono de 1 nm de diámetro, pueden tener una o varias capas concéntricas.	Agentes de contraste, transporte de fármacos, biosensores y vacunas.
-Fullerenos	Compuestos constituidos por 60 átomos de carbono formando un espacio cerrado y simétrico con forma de balón de fútbol.	Transporte de fármacos, agentes de contraste, como antioxidantes y antibactericidas.
Poliméricas	Formadas por polímeros no degradables y degradables, de origen natural o sintético, o mezcla de ambos tipos.	Liberación de fármacos.
Dendrímeros	Estructuras globulares generados por repetición de polímeros sintéticos compuestos por un núcleo y varias capas con grupos terminales activos.	Liberación de fármacos.
Metálicas - De oro	Formadas por oro.	Biosensores, agentes de contraste y termoablación.
- QD	Estructura fluorescente de 2 a 10 nm, constituido por un núcleo de algún elemento metálico pesado; y por una capa de ligando o polímeros anfipáticos.	Diagnóstico por imagen y tratamiento del cáncer.
- Magnéticas	Compuestas por un núcleo inorgánico de óxido de hierro u otros metales, recubierto o no, por biomoléculas o polímeros orgánicos.	Agentes de contraste.
Nanoliposomas y nanomicelas	Vesículas esféricas formadas principalmente por fosfolípidos.	Transporte de agentes bioactivos, liberación de fármacos y tratamiento del cáncer.

3. Nanopartículas de TiO₂

Las NPs de óxidos metálicos se utilizan en una gran variedad de aplicaciones industriales y médicas, entre ellas: fotocatalisis (biosensores y placas solares), microelectrónica, ingeniería química, sistemas ópticos, producción de colorantes, materiales cerámicos, cosméticos, sensores, síntesis de películas de recubrimiento mesoporosas, catálisis en procesos de descontaminación medioambiental y en medicina (Zhang *et al.*, 2008).

En concreto el TiO₂, comienza en los años 30 en la industria como sustituyente del plomo blanco (considerado venenoso) en la fabricación de pinturas, gracias a su reflectancia y la no absorbancia de luz visible (Emsley, 2001). Pero a escala nanométrica su aplicación más conocida es como atenuador de la luz ultravioleta (UV) en protectores solares y cosméticos, debido a su alto índice de refracción. Sin embargo, actualmente uno de los principales enfoques es el estudio como fotocatalizador semiconductor para remover contaminantes orgánicos e inorgánicos en el campo de tratamientos de remediación medioambiental (degradación y adsorción de contaminantes) (Carp *et al.*, 2004). En el campo de la nanomedicina, aunque hay una gran cantidad de estudios con el TiO₂ su uso es relativamente nuevo. Los primeros trabajos aparecen en la década de los 90, con el aumento del uso de implantes de titanio y la necesidad de comprender su interacción con las células y biomoléculas con las que entran en contacto (Ellingsen, 1991). En el campo del cáncer es donde esta tecnología se lleva investigando y aplicando con gran éxito desde mediados de la primera década del siglo XXI cuando ganó impulso tras el primer trabajo donde se demostró el uso del TiO₂ en muerte celular fotoinducida (Cai *et al.*, 1991). Existen aplicaciones novedosas y con gran potencial de las NPs de TiO₂ en el tratamiento contra el cáncer (Kubota *et al.*, 1994; Kalbacova *et al.*, 2008), y siendo esta la aplicación que trataremos con más profundidad.

El TiO₂ puede encontrarse en tres formas cristalinas diferentes: anatasa, brookita y rutilo. Todas ellas tienen diferentes propiedades de adsorción y fotorrespuesta, por lo que su uso en aplicaciones biomédicas es dependiente de su forma cristalina. En el régimen nanocristalino la anatasa es la dominante y la que juega el papel más importante en la fotocatalisis y aplicaciones de la energía del medio ambiente, por lo tanto, es la que más promete para aplicaciones biomédicas iniciada por la luz (Barnard y Curtiss, 2005). Las propiedades ópticas y catalíticas de las NPs de TiO₂ además de la fase cristalina, dependen también del tamaño y porosidad (Popov *et al.*, 2005).

Bajo iluminación, las NPs de TiO_2 se comportan como células electroquímicas en miniatura capaces de tener reacciones redox inducidas por la luz. Por ello estos últimos años el TiO_2 atrajo la atención en el campo de la terapia fotodinámica (PDT) (Fabian *et al.*, 2008). Este efecto como fotocatalizador se conoce desde 1972, “Cuando un semiconductor absorbe fotones con una energía mayor que su banda prohibida, los electrones pueden ser excitados a la banda de conducción, creando pares electrón-hueco” (Fujishima y Honda, 1972). Siendo el término fotocatalisis definido por la IUPAC como “la aceleración de una reacción química por actuación de un catalizador sólido, activado mediante excitación electrónica al incidir sobre él radiación luminosa de un determinado contenido energético”. La radiación incidente pertenece a la región visible o UV, y actúa solamente como activador de la reacción y no como catalizador, pues se consume en el proceso. El material que se utiliza como fotocatalizador es un semiconductor, el cual tiene una estructura de bandas que permite generar estados excitados al promover electrones a capas desocupadas. Estos estados, a su vez, favorecen la formación de otras especies altamente reactivas, las cuales, pueden desencadenar reacciones químicas, tales como la degradación de contaminantes, formación de productos de interés, generación de hidrógeno, etc.

El TiO_2 tiene potentes ventajas como fotocatalizador ya que tiene alta eficiencia intrínseca bajo irradiación a la longitud de onda (λ) adecuada, apoyado todo esto por la gran abundancia de este material (bajo costo), su robustez, su alta estabilidad y la baja toxicidad que presenta. Su principal problema es el valor de su banda prohibida (BG), ya que es muy ancha (~ 3.2 eV), lo que significa que solamente los fotones que tienen una energía superior pueden activarlo, y estos fotones corresponden a la región UV. Dado que el campo UV constituye sólo una mínima parte de la luz solar, el principal inconveniente es la falta de fotorrespuesta bajo radiación visible (Rehman *et al.*, 2009). Por ello la utilización del TiO_2 como fotocatalizador estuvo limitada hasta ahora y se hace un gran esfuerzo para expandir las propiedades del TiO_2 a la región del visible, como por ejemplo realizando la modificación de su superficie o su dopaje con otros elementos como el carbono o el nitrógeno (Lan *et al.*, 2013). Realizando el dopaje del TiO_2 disminuimos su BG por lo que el número de pares electrón-hueco puede aumentar significativamente, con lo cual el efecto catalítico puede ser aprovechado sobre un espectro de ondas considerablemente mayor. Existen distintas maneras de dopar el óxido de titanio como por ejemplo el dopaje catiónico, aniónico o recubrimiento con NPs metálicas.

Entre estas estrategias, también se encuentra el uso de NPs plasmónicas como fotosensibilizadores, estrategia particularmente interesante que consiste en la activación de NPs de TiO₂ a través de las excitaciones plasmónicas ópticas de NPs metálicas cercanas (Primo *et al.*, 2011). En los últimos años el uso de NPs de oro como fotosensibilizadores de TiO₂ ha sido desarrollado como una forma sencilla de aumentar la actividad del semiconductor en las regiones infrarroja-visible del espectro electromagnético, aumentando por lo tanto la eficiencia de este fotocatalizador.

4. Nanotoxicidad

Antes de aprobar el uso de NPs con fines médicos, de la misma forma que se hace para aprobar un fármaco, hay determinados aspectos obligatorios a tener en cuenta: su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioseguridad, el mantenimiento de las propiedades físicas después de procesos de modificación superficial, tienen que ser eficaces a dosis terapéuticas, no debe afectar a las características de células madre y tener una mínima o ninguna transferencia de los subproductos a células o tejidos sanos adyacentes, y por último que sean químicamente estables en condiciones fisiológicas. Por ello, con el impacto de la nanotecnología en áreas de la biomedicina se hace cada vez más necesaria la profundización en estudios asociados a la toxicidad de estos materiales, y efectos secundarios en tejidos y células, y más importante aún, la estandarización de dichos estudios.

Las propiedades de las NPs determinan su interacción con las diferentes entidades biológicas y por tanto, su citotoxicidad. El efecto citotóxico de las NPs va a provocar efectos perjudiciales para la salud, ya que su toxicidad depende de distintos factores como: el tamaño, la forma/estructura, la carga, el área superficial, recubrimiento y la solubilidad (Aydin *et al.*, 2012). Además, también va a depender de la genética de cada individuo, que proporcionará las herramientas bioquímicas necesarias para adaptarse y combatir sustancias tóxicas (Buzea *et al.*, 2007).

Los tratamientos basados en NPs pueden presentar generalmente dos tipos de efectos citotóxicos: aquellos que son independientes de la interacción de la membrana de la célula con la NP o los asociados al proceso de internalización intracelular de éstas. En el primer caso la citotoxicidad se debe a la interacción de las NPs con la superficie de la célula en el medio extracelular. Dado que la reactividad superficial de las NPs tienden a formar una

“corona de proteínas” que secuestra factores de crecimiento, proteínas y nutrientes presentes en el medio, en mayor o menor medida, y puede afectar la viabilidad celular o función celular (Lundqvist *et al.*, 2011). Además, la adición de NPs al medio de cultivo puede modificar el pH o la presión osmótica y provocar indirectamente la muerte celular. En el segundo caso, diversos estudios de interacción de las NPs con las células demuestran que este proceso puede afectar a la viabilidad celular. La toxicidad que pueden provocar las NPs hay que estudiarlas desde diferentes puntos de vista a nivel celular, hay que describir que ocurre con la degradación de las NPs dentro de la célula a nivel de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de las rutas de señalización celular de caspasas, activación de receptores implicados en la muerte celular (tipo TNFR, p75NTR, etc.). La aparición de los radicales libres provocan daño celular a partir de la degradación de proteínas, lípidos, enzimas y ácidos nucleicos lo que conduce a procesos de necrosis o apoptosis (Mahmoudi *et al.*, 2012).

Si nos centramos en las NPs de óxido metálicas, la toxicidad puede deberse principalmente a dos razones. Por una parte, presentan una actividad catalítica intrínseca, que puede inducir la producción de ROS y estrés oxidativo, afectando a diversos procesos y rutas de señalización intracelulares (Auffan *et al.*, 2009). Por otra parte, es importante destacar que estas NPs pueden descomponerse durante su utilización, con la consiguiente fuga de iones metálicos, afectando a la concentración normal de iones metálicos libres dentro de la célula (Hu *et al.*, 2009), afectando también el tipo de fase cristalina en la que se encuentren (anatasa, rutilo o combinación de ambas).

Para el estudio de la toxicidad asociada a tratamientos basados en NPs una de las herramientas más empleadas, y que primero se utilizan en los ensayos de toxicidad antes de su aplicación *in vivo*, son los cultivos celulares con diferentes líneas celulares. La menor complejidad, cuestiones éticas y costes son algunas de las ventajas que tiene emplear cultivos celulares respecto a estudios *in vivo*. Por otra parte presentan un mayor control sobre el ambiente que rodea a las células y homogeneidad tanto a nivel morfológico como de composición, permitiendo profundizar más fácilmente en la comprensión de los procesos biológicos y bioquímicos que tienen lugar durante los tratamientos (Lewinski *et al.*, 2008). Poder conocer cómo interactúan las NPs con las células y el ambiente que les rodea, da lugar a poder determinar una aproximación inicial en la seguridad del producto para una aplicación clínica a largo plazo (Markides *et al.*, 2012).

4.1. Métodos de evaluación de la nanotoxicidad

Existen numerosos métodos para estudiar la muerte celular (necrosis, apoptosis), citotoxicidad y la viabilidad celular (estudio de la proliferación celular) asociada a la interacción NP-célula. Es necesario señalar que para un análisis riguroso se requiere la combinación de varios de estos métodos ya que cada uno aporta información diferente.

Cuando una célula está expuesta a determinadas NPs éstas pueden inducir su muerte a través de distintos mecanismos, pero también puede ocurrir que alguna estructura celular resulte dañada o alterada como consecuencia del contacto con ellas. Si la célula no es capaz de reparar este daño entrará igualmente en un proceso de muerte autoinducida y morirá.

Históricamente, se han distinguido por criterios morfológicos tres tipos de muerte celular (apoptosis, autofagia y necrosis) en células de mamífero. La apoptosis o muerte celular programada (tipo I), se define por los cambios característicos en el morfología nuclear, incluyendo condensación de cromatina y fragmentación, la contracción total de la célula, formación de ampollas de la membrana plasmática y la formación de cuerpos apoptóticos que contienen material nuclear o citoplasmático; de esta manera se eliminan células no deseadas o inútiles. La autofagia (tipo II), se caracteriza por una acumulación masiva de doble membrana que contiene vacuolas conocidas como autofagosomas, que posteriormente se fusionan con vacuolas lisosómicas. Por último, la necrosis (tipo III), se define a menudo como la muerte que carece de las características de los procesos del tipo I y II; y se produce cuando las células están expuestas a un daño físico o químico.

La distinción de las diferentes formas de muerte celular no sólo es relevante por razones semánticas, sino porque implica la activación de diferentes receptores y vías de señalización intracelular. Esto también puede tener implicaciones clínicas importantes al considerar el potencial terapéutico en procesos de muerte celular. Además, en algunos casos, es el tipo de célula o de la naturaleza y la duración de la lesión celular la que determinan si las células mueren por apoptosis, necrosis u otros mecanismos predeterminados.

En contraste con estos dos procesos de muerte celular, la citotoxicidad no define un mecanismo específico de la muerte celular, sino que es un algo externo que provoca un daño en el funcionamiento celular, y no implica la muerte de la célula. Más bien, la citotoxicidad es simplemente la propiedad de destrucción celular de un compuesto químico (tal como un fármaco o como en nuestro caso, NPs) independiente de los mecanismos de

muerte, que puede provocar alteración en el funcionamiento de receptores, expresión y regulación de genes, etc.

Una de las medidas de viabilidad, fáciles de realizar y que aportan mucha información sobre los efectos de una sustancia en un cultivo celular es determinar la viabilidad y proliferación celular. La evaluación rápida y precisa del número de células viables (número de células sanas en una muestra) y la proliferación celular (número de células que se dividen en cultivo) es un requisito importante en muchas situaciones experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo general, uno de los dos parámetros se usa para medir la salud de las células, y en casi todos los casos, estos parámetros se miden por el ensayo de "funciones vitales" que son característicos de las células sanas, y lo más importante, que la sustancia que se testa no induce ningún daño celular (Antequera *et al.*, 2012).

La evaluación de la nanotoxicidad es bastante compleja debido a la gran variedad de elementos que aportan un papel clave en ella. La conjunción de diversas variables como son los diferentes tipos de NPs, las propiedades físico-químicas, las condiciones de incubación, las líneas celulares y los diferentes tipos de ensayos junto con las posibles interferencias que pueden producirse, hacen que el establecimiento de protocolos de evaluación así como la interpretación y la extrapolación de los resultados sea una tarea complicada (Soenen *et al.*, 2011)

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada, se encuentran ensayos capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de éstos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Repetto, 2002).

4.1.1. Ensayos de apoptosis

La apoptosis se produce a través de una cascada de sucesos, por lo tanto hay muchas posibilidades de medir la actividad de los diferentes reguladores o las consecuencias funcionales de sus acciones. Tal es así que existe un gran número de ensayos para la detección y recuento de células apoptóticas. Entre ellos la medida de la activación de las caspasas (Los *et al.*, 1999), alteraciones en la membrana plasmática (Lauber *et al.*, 2004),

cambios en las mitocondrias (Kroemer *et al.*, 2007) y fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), entre otros.

Uno de los sellos bioquímicos de la apoptosis es la fragmentación del ADN genómico, un acontecimiento irreversible que compromete a la célula a morir. Por ello se utilizó este acontecimiento para medir las posibles células apoptóticas tras el contacto con las NPs.

En muchos sistemas, esta fragmentación de ADN se ha demostrado que es resultado de la activación de una endonucleasa endógena dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esta enzima escinde selectivamente ADN en sitios ubicados entre unidades de nucleosomas generando fragmentos de ADN mono- y oligonucleosomal. Estos fragmentos de ADN revelan, después de la electroforesis en gel de agarosa, un patrón de escalera distintivo que consiste en múltiplos de una subunidad de aproximadamente 180 pb (Figura 1), por ende si detectamos estos fragmentos identificaremos la presencia de células apoptóticas.

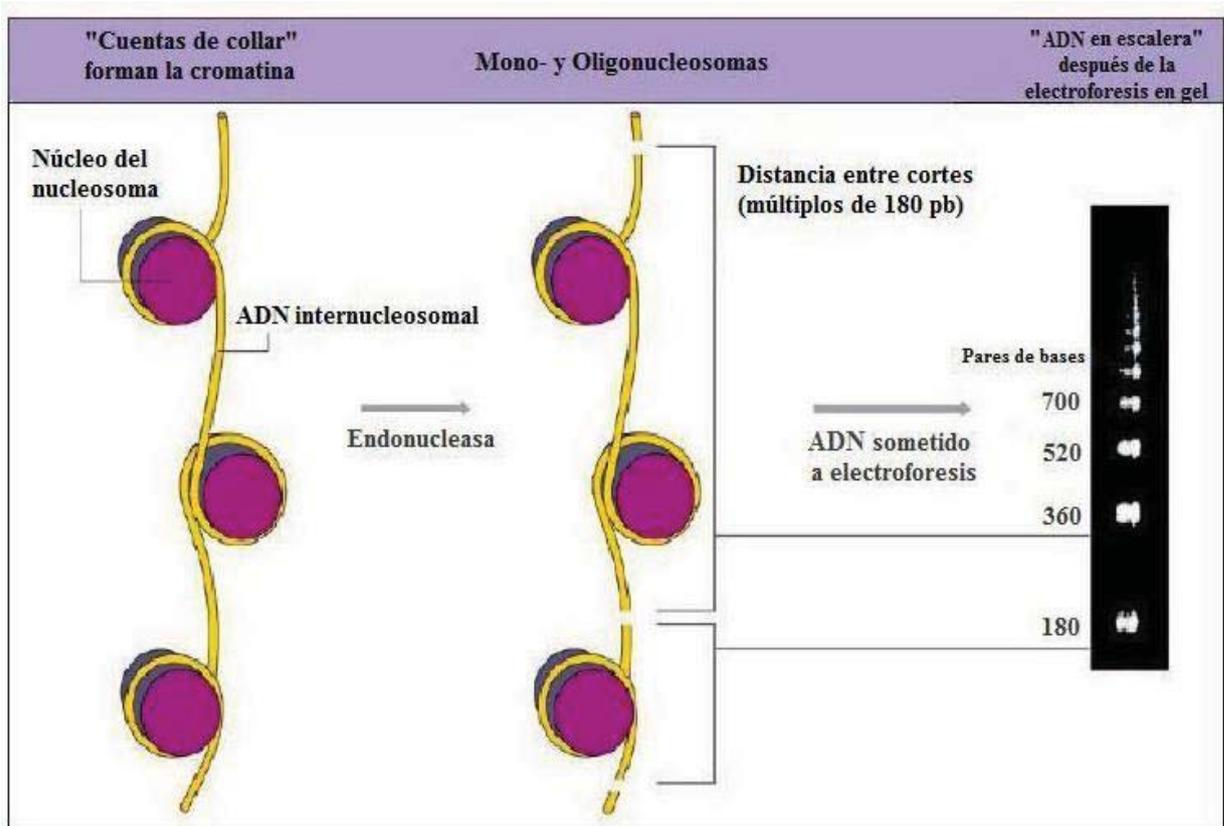


Figura 1: Bioquímica de la fragmentación del ADN y su apariencia de "ADN en escalera" (adaptada de *"Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation"*, 4th edition, Roche).

4.1.2. Ensayos de actividad metabólica

La alteración de la actividad metabólica (por comparación con la actividad observada en las células no expuestas o células control) una vez que han sido expuestas a las NPs es una prueba irrefutable del daño celular ocasionado y, por tanto, está directamente relacionada con la toxicidad de las NPs.

Uno de los ensayos más populares en este campo es el ensayo colorimétrico del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio o MTT. Es un método simple y se usa para determinar la viabilidad celular por la actividad mitocondrial de las células (Shen *et al.*, 2012; Uboldi *et al.*, 2012). Está basado en la capacidad de las células vivas de reducir la sal de tetrazolio de color amarillo (por rotura del anillo) en un producto insoluble de color violeta, el formazán, bajo la acción de enzimas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) que son funcionales sólo en células vivas (Mosmann, 1983). El formazán generado queda retenido en las células y puede ser liberado mediante su solubilización, el cual se cuantifica finalmente con ayuda de un espectrofotómetro a 500-600 nm (Figura 2).

Cuantificar directamente la actividad enzimática succinato deshidrogenasa, que es un complejo proteico ligado a la membrana interna mitocondrial que interviene en rutas metabólicas claves como el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones, permite comprobar que no existen afectaciones en el metabolismo celular y no se ha afectado la integridad estructural de dicho orgánulo.

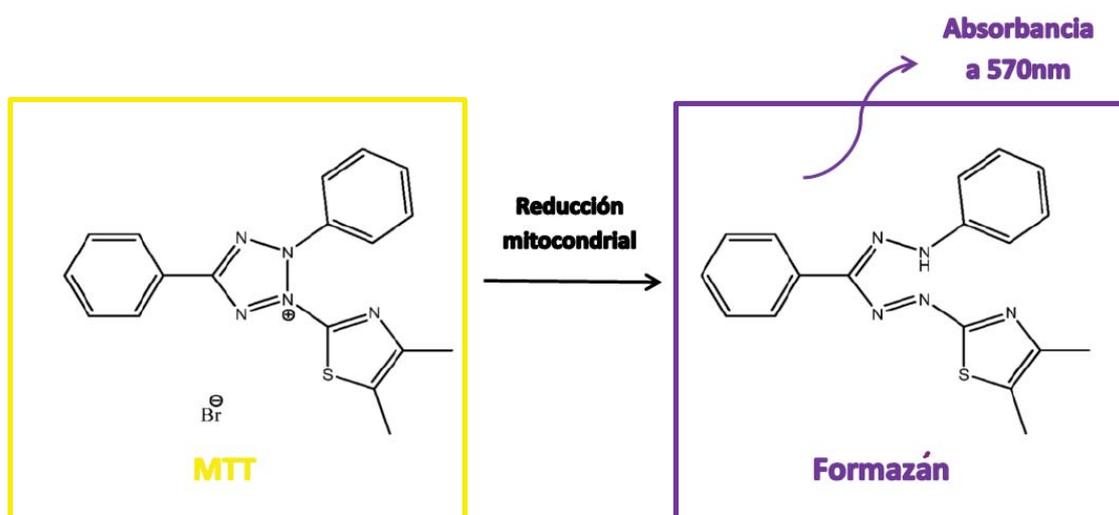


Figura 2: Conversión del MTT a formazán en células vivas.

4.1.3. Ensayos de estrés oxidativo

Las células generan ROS, como son los radicales hidroxilos ($\text{OH}\cdot$), los aniones superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), de forma natural como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno. Pero cuando las células son expuestas a condiciones de estrés sus niveles de ROS aumentan por encima de los niveles normales, pudiendo producirse daño celular e incluso apoptosis. Muchos estudios han considerado el aumento de los niveles de ROS como uno de los efectos inducidos por las NPs, y esto puede ser debido a una respuesta inmune de la célula a la presencia de NPs, o como resultado de la habilidad intrínseca de algunas NPs para autocatalizar la formación de estas especies.

La evaluación de presencia de ROS puede ser tanto directa (cuantificación de los niveles intracelulares de ROS) como indirecta (evaluación de los efectos secundarios de un estrés oxidativo prolongado). Entre los métodos directos, el más utilizado y el elegido en éste trabajo es el ensayo del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA), éste compuesto penetra en las células y es desacetilado por esterasas inespecíficas, convirtiéndose en un compuesto altamente fluorescente, el 2',7'- diclorofluoresceína (DCF) en presencia de especies oxidantes (Li *et al.*, 2010; Ngwa *et al.*, 2011). También cabe destacar la medida de los niveles de la enzima glutatión (GSH), cuya disminución es una prueba irrefutable del estrés oxidativo (Harris *et al.*, 2012), y el empleo del compuesto dihidroetidio (DHE).

Los métodos indirectos estudian los eventos intracelulares originados por el incremento en la producción de ROS, como la peroxidación de lípidos. Tal es el caso del ensayo que cuantifica los niveles de malondialdehído (MDA), producto generado por la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados (Passagne *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

Debido al interés y del auge que ha tenido el TiO_2 en gran variedad de campos en los últimos años, pero sobretodo centrándonos en las excelentes propiedades fotocatalíticas que presenta este material, se sintetizaron y caracterizaron dos tipos de NPs, $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ y $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$. Utilizando oro como fotosensibilizador para aumentar la fotorrespuesta del TiO_2 en las regiones infrarroja-visible, ampliando así su utilidad en nanomedicina como catalizador de reacciones químicas de interés en medios celulares.

Para comprobar los efectos de estas NPs en medios de cultivo se realizó el análisis y la caracterización de los efectos citotóxicos de NPs de $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ y $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$, con posible utilidad en aplicaciones biomédicas como la PDT, en un estudio *in vitro* con células tumorales tratadas a diferentes condiciones (concentración, tiempos de exposición e irradiación).

Los objetivos específicos de este trabajo son:

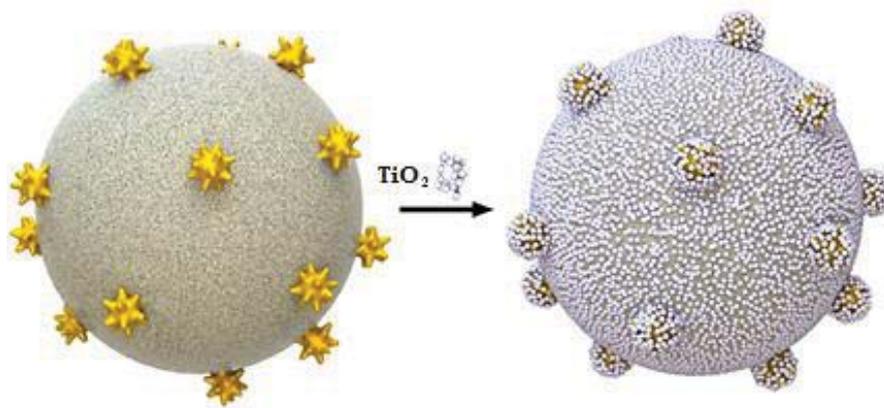
- Analizar la nanotoxicidad que pueda ocasionar la exposición a las NPs en cultivos celulares, estudiando para ello las alteraciones celulares y los índices de muerte celular por apoptosis, con y sin condiciones de irradiación.
- Estudiar la actividad biológica y la biocompatibilidad del material constituido por NPs de TiO_2 sobre perlas de sílice y NPs de TiO_2 y oro soportado sobre perlas de sílice.
- Obtener más conocimiento de los efectos producidos por las NPs de oro en la actividad fotocatalítica del TiO_2 en cultivos celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Síntesis y caracterización de las NPs

Para los dos tipos de NPs utilizadas en este estudio ($\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ y $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$) se sintetizaron en primer lugar partículas coloidales de sílice monodispersa (504 ± 20 nm) siguiendo el método de Stöber (Stöber *et al.*, 1968). Posteriormente se realizó su funcionalización con una monocapa de un polielectrolito cargado positivamente [poli(clorhidrato de alilamina), PAH].

En el caso de las NPs de $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$, se procedió a la deposición controlada de NPs de oro en la superficie de las esferas de sílice mediante la técnica de ensamble capa a capa (LbL). Las NPs de oro con forma de nanoestrella fueron sintetizadas modificando el protocolo presentado por Kumar *et al.*, 2008, para permitir el control del tamaño de las estrellas con un diámetro de núcleo de 25 ± 5 nm y longitud de punta 8 ± 3 nm. Después se funcionalizaron con PAH y dispersaron para finalmente añadir las NPs de TiO_2 (5 nm, $\geq 99\%$ anatasa) cargadas negativamente, las cuales fueron adsorbidas por fuertes interacciones electrostáticas, siendo la relación de Au/TiO_2 , 12.28% en peso (Sousa-Castillo *et al.*, 2016). La ruta de síntesis de $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$ se representa parcialmente en el Esquema 1.



Esquema 1: Ilustración que representa la deposición de NPs de TiO_2 en $\text{SiO}_2@\text{Au}$. Adaptado de Sousa-Castillo *et al.*, 2016.

Estas NPs fueron proporcionadas en forma de suspensiones acuosas estables a una concentración de 1 mg/mL. Antes de cada tratamiento se preparó una suspensión intermedia en medio de cultivo completo, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), que fue sonicada utilizando una punta ultrasónica Branson SLPe a 40 kHz durante 5

min para garantizar una buena dispersión de las NPs. Para las concentraciones necesarias para los distintos tratamientos, se prepararon diluciones seriadas partiendo de esta suspensión intermedia que fueron igualmente sonicadas inmediatamente antes de su utilización.

Antes de realizar los experimentos de nanotoxicidad, se llevó a cabo una exhaustiva caracterización fisicoquímica de las NPs empleando para ello distintas metodologías. Para determinar el tamaño exacto de las NPs y su morfología se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM), obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 operando a un voltaje de aceleración de 100 kV. También se utilizó microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y se hizo un análisis de espectrometría por dispersión de energías de rayos X (XEDS) llevados a cabo con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2010F operando a un voltaje de aceleración de 200 kV.

Se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL JSM 6700F FEG y por último se obtuvieron espectros UV-vis-NIR con Hewlett-Packard HP8453 y espectrofotómetro Cary 5000.

La síntesis y caracterización fisicoquímica de las NPs fueron realizadas por el grupo de investigación del departamento de Química Física, Centro de investigación biomédica (CINBIO), Instituto de investigación biomédica de Ourense-Pontevedra-Vigo (IBI) y Universidad de Vigo, y sus resultados fueron empleados para la discusión del presente trabajo.

2. Cultivo celular y tratamientos

Para este estudio empezamos trabajando con tres líneas tumorales distintas (A549, Neuro-2a y Raw 264.7) que fueron cedidas por el grupo de inmunología del departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología de la Universidad de Vigo. Sin embargo, debido a la cantidad de muestras con las que tendríamos que trabajar y el corto período de tiempo, decidimos seleccionar la línea A549. Los estudios con las líneas Neuro-2a y Raw 264.7 se realizaron pero quedaron pendientes de la cuantificación por western blot (datos no mostrados). Estas líneas se seleccionaron con el objetivo de establecer comparaciones entre

los distintos tipos celulares y obtener una idea más amplia de la nanotoxicidad de las NPs. Las líneas fueron mantenidas en cultivo utilizando medio F-12K y DMEM (para Raw 264.7) suplementado con un 10% de FBS y con antibióticos [penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100µg/mL)] a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂ con humedad controlada. Las tres líneas presentan propagación de tipo adherente, y para realizar el subcultivo y los diferentes experimentos se trató con una solución de Tripsina (0.25%) – EDTA (0.02%) durante 5-10 min. A continuación se añadió medio completo para detener la actividad de la proteasa, y fueron sembradas en placas de 96 y 12 pocillos dependiendo del ensayo a realizar.

Las concentraciones de los dos tipos de NPs utilizadas fueron 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL para experimentos sin irradiar y 12.5, 25 y 50 µg/mL en el caso de irradiación. Los tiempos de incubación fueron de 24 y 48h para los experimentos sin irradiar y 24h para los experimentos con irradiación. La decisión de eliminar la concentración más alta y el tiempo de incubación más largo para los experimentos de irradiación están basados en los datos obtenidos con los experimentos sin irradiación.

Previo a los diferentes ensayos, se optimizó el número de células necesarias por pocillo para una correcta estimación. Si se utiliza un número excesivo, éstas podrían morir por falta de nutrientes y/o espacio y no por la presencia de las NPs, lo que daría lugar a unos resultados erróneos (datos no mostrados).

Para esta puesta a punto se sembraron en una placa de 96 y 12 pocillos, por triplicado para cada línea, un número creciente de células/pocillo desde 5.000 a 40.000 células en la placa de 96 y de 100.000 a 150.000 para la placa de 12 pocillos, con incrementos de 5.000 células entre pocillos. Se incubaron las placas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% y a las 24h se comprobó la existencia de una confluencia de un 70-80% con el microscopio óptico invertido, y a las 72h se realizó un contaje para la determinación de la muerte celular. Se consideró óptimo aquel número de células de partida que tras 72h tuvieran más de un 80% de supervivencia y que a las 24h tuvieran una confluencia de 70-80%. De esta forma, se determinó que el número necesario de células/pocillo para cada línea celular es el siguiente:

- A549: 20.000 células para placa de 96 y 120.000 para placa de 12 pocillos.
- Neuro-2a: 20.000 células para placa de 96 y 120.000 para placa de 12 pocillos.
- Raw 264.7: 25.000 células para placa de 96 y 125.000 para placa de 12 pocillos.

3. Estudio de la apoptosis

La apoptosis celular se ensayó mediante la medición de la fragmentación del ADN celular con el kit comercial *Cell Death Detection ELISA^{Plus}* de Roche. Con este kit se pueden detectar semicuantitativamente mono- y oligonucleosomas en lisados celulares o en sobrenadantes de cultivo. Un alto nivel de fragmentos de ADN intracelulares es característico de la apoptosis, mientras que un alto contenido de fragmentos de ADN en el sobrenadante del cultivo es indicativo de necrosis o de células apoptóticas que han lisado durante la etapa tardía de la apoptosis. La cantidad de ADN escindido fue medido por ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), Figura 3.

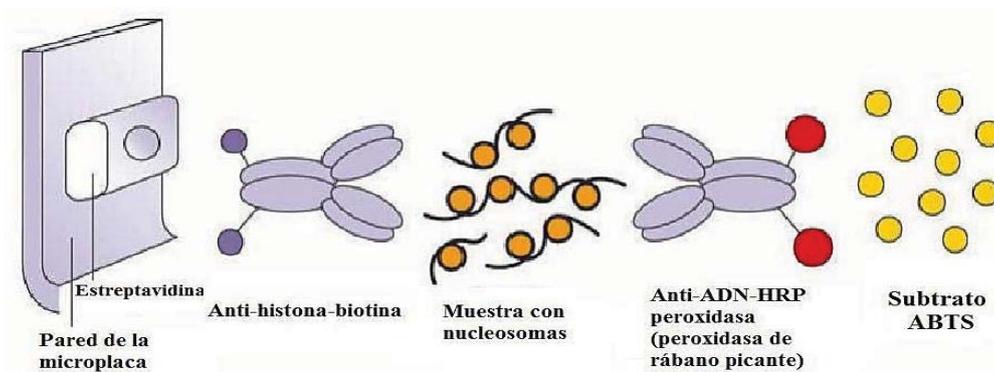
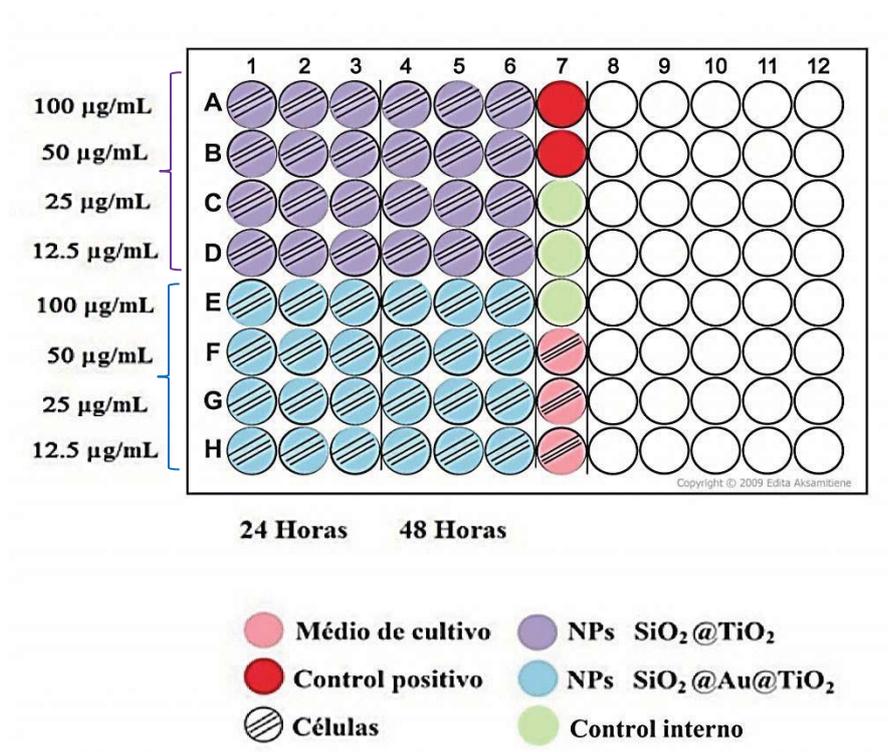


Figura 3: Esquema que muestra el principio del kit “Cell Death Detection ELISA^{Plus}”.

Siguiendo el protocolo se sembraron 20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, con 100 μ L de medio completo (F-12K o DMEM, 10% de FBS, 1% de Penicilina/Estreptomina) a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Transcurridas 24h, se añadieron los componentes a testar a diferentes concentraciones según el esquema 2. Como control positivo se utilizaron complejos ADN-Histona, como control negativo las células sin tratar con NPs y se añadió un control interno con el tampón de incubación. Se dejó un tiempo de incubación de 24 y 48h, tras el cual se transfirió 20 μ l de sobrenadante del lisado celular después de centrifugar (200g durante 10 min) tras el tratamiento con las NPs, control positivo, control negativo y control interno a la microplaca con estreptavidina, a la cual se añade 80 μ l de inmunoreactivos (anticuerpos Anti-Histona-Biotina y Anti-ADN-HRP) y se incuba durante 2h en agitación (300 rpm) a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados con tampón de incubación y se añadieron 100 μ L/pocillo de substrato ABTS y se incubó en agitación a 250 rpm hasta que se desarrolló el color (azul), que es cuando se añadieron 100 μ L/pocillo de solución Stop y a

continuación se cuantificó por espectrofotometría a 405 nm (490 nm de referencia) en un multidetector Biochrom Asys UVM340.

Para la realización del ensayo con irradiación se utilizó una lámpara Xe 300W con un filtro de corte para bloquear una porción de la luz UV (simulador solar LOT de 350-2400 nm). Se realizó el mismo experimento eliminando la condición de 48h de incubación y la concentración de 100µg/mL. Tras las 24h de incubación con las NPs se irradió durante 20 min y a continuación se continuó con el experimento siguiendo el mismo protocolo.



Esquema 2: Distribución de la placa de 96 en el ensayo de apoptosis.

4. Estudio de la actividad metabólica: MTT

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el kit colorimétrico *Cell Proliferation Kit I (MTT)* de Roche. Acorde con el protocolo de manufactura, se sembraron 20.000 células/pocillo, en una placa de 96 pocillos, con 100µL de medio completo (F-12K o DMEM, 10% de FBS, 1% de Penicilina/Estreptomicina) a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Los pocillos con las NPs solas se consideraron como blanco, para verificar que no existen interferencias con el método. Como control negativo, se utilizó el propio medio de cultivo y como control positivo, 0.1% de H₂O₂. Transcurridas 24h, se añadieron las NPs a diferentes concentraciones, según el esquema 3. Se dejó un tiempo de incubación de 24 y

5. Estudio del estrés oxidativo

Para el ensayo de detección de ROS se utilizó el kit comercial *DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit* de abcam. Se sembraron 25.000 células/pocillo, en una placa de 96 pocillos de fondo negro, con 100µL de medio completo (F-12K o DMEM, 10% de FBS, 1% de Penicilina/Estreptomicina) a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Los pocillos con las NPs solas se consideraron como blanco, para verificar que no existen interferencias con el método. Como control negativo, se utilizó el propio medio de cultivo y como control positivo 50µM de hidroperóxido de terc-butilo (TBHP). Transcurridas 24h, se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con 100µL/pocillo de tampón 1X, se añadieron 100µL/pocillo de solución 25µM de DCFDA y se incubó en oscuridad 45 min a 37°C al 5% CO₂. A continuación se realizó un lavado con 100µL/pocillo de tampón 1X y se añadió 100µL de las NPs a diferentes concentraciones, según el esquema 2 pero realizando 4h de incubación. Tras lo cual se realizó la lectura de la señal de fluorescencia a Ex485 nm/Em535 nm en un lector de microplacas Twinkle LB 970.

Para la realización del ensayo con irradiación se utilizó una lámpara Xe 300W con un filtro de corte para bloquear una porción de la luz UV (simulador solar LOT de 350-2400 nm). Se realizó el mismo experimento eliminando la condición de 48h de incubación y la concentración de 100µg/mL. Tras las 4h de incubación con las NPs se irradió durante 20 min y a continuación se realizó la lectura de la señal de fluorescencia.

Los resultados se analizaron aplicando la siguiente fórmula:

$$ROS = \frac{(|c|élulas + NPs) - (|NPs| solas)}{(|c|élulas solas) - (|medio| de cultivo)} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de las NPs

Un aspecto a tener en cuenta en cualquier estudio sobre nanotoxicidad es la caracterización exhaustiva de las NPs implicadas (Sayes y Warheit, 2009). Conocer sus propiedades fisicoquímicas resulta extremadamente útil con vistas a definir sus efectos tóxicos asociados. Por lo tanto las metodologías y técnicas analíticas empleadas deben ser robustas y capaces de proporcionar, por un lado una descripción detallada de las NPs (en términos de tamaño, morfología y estructura química) y por otro lado, una información analítica completa (en términos de composición elemental y concentración).

Los métodos microscópicos son los más demandados para determinar el estado de agregación, tamaño, dispersión, estructura y forma de las NPs. Siendo las más utilizadas la SEM y TEM. En TEM los electrones son transmitidos a través de la muestra (por lo tanto ésta tiene que ser muy fina para obtener la imagen) haciendo posible el análisis de NPs localizadas en el interior de ella (Farre *et al.*, 2011).

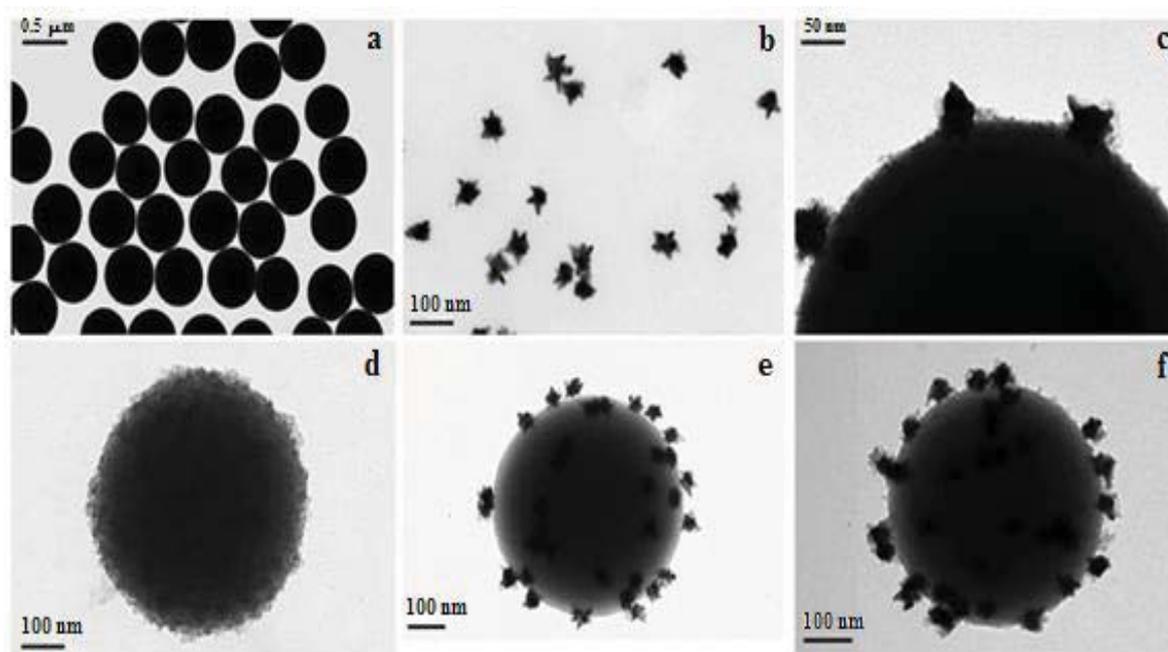


Figura 4: Imágenes de TEM, a) perlas de sílice, b) nanoestrellas de oro, c) y f) NP SiO₂@Au@TiO₂, d) NP SiO₂@TiO₂ y e) NP SiO₂@Au.

Tras la síntesis de las NPs se realizó su caracterización. Entre las diferentes técnicas utilizadas, se pueden observar en la Figura 4 las imágenes de TEM, con las cuales se confirmó los datos de síntesis. Además estas imágenes confirmaron la inmovilización y

distribución homogénea de TiO₂ sobre las perlas de sílice mientras que las NPs de oro se mantienen intercaladas individualmente entre ambos óxidos. Además hay que destacar el espectro UV-vis-IR de la Figura 5, que nos confirma las propiedades ópticas obtenidas con la fotosensibilización de las NPs de oro en las NPs SiO₂@Au@TiO₂.

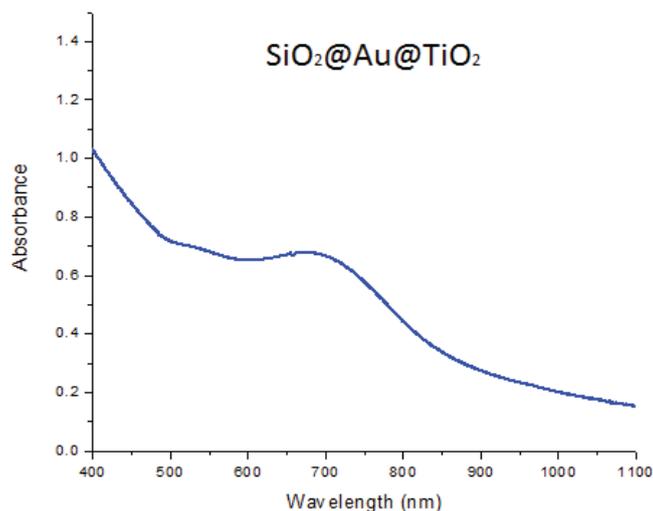


Figura 5: Espectro UV-vis-IR de SiO₂@Au@TiO₂.

Cabe añadir que aunque se haga una caracterización exhaustiva de las NPs antes de realizar los estudios de toxicidad, los cambios de estabilidad que sufren cuando entran en contacto con ambientes fisiológicos pueden resultar en la formación de agregados y aglomerados de NPs con tamaños y formas variables que dificultan enormemente la previsión de su grado de interacción con las células (Verma y Stellaci, 2010). Por ello, se utilizó la ultrasonicación, con una aguja de ultrasonidos (uno de los métodos más comunes para mejorar la dispersión de las NPs) antes de agregar las NPs a las células, pero este efecto de agregación de las NPs cuando son dispersadas en medio de cultivo va a ser un factor crítico a la hora de evaluar su comportamiento, dificultando la reproducibilidad de los estudios en un contexto biológico e influyendo en los mecanismos de toxicidad (Powers *et al.*, 2007).

2. Evaluación de la nanotoxicidad

Para poder evaluar la posible toxicidad de las NPs a nivel celular, es esencial llevar a cabo estudios *in vitro* en diferentes líneas celulares y empleando distintas concentraciones de las NPs. Estos son los ensayos de citotoxicidad, en los que se obtienen de una forma controlada datos reproducibles, dado que este tipo de análisis las condiciones del cultivo celular están perfectamente establecidos y por ende esto nos permite asegurar que la

muerte de las células se debe a la presencia de las NPs en el medio y no a otros condicionantes (Lewinski *et al.*, 2008). La toxicidad de las NPs puede variar mucho de un tipo de célula a otro, y dependiendo también de las modificaciones de superficie que se hayan llevado a cabo en las NPs (Díaz *et al.*, 2008), y aunque en este trabajo sólo se aportan resultados de una línea celular (A549) también se trabajó con otras dos líneas celulares (datos no mostrados) debido a esta variabilidad entre diferentes tipos celulares. Pero teniendo en cuenta que la interacción entre las NPs y las células depende de la tipología celular seleccionada, resulta complejo extraer conclusiones generalizadas sobre los efectos tóxicos encontrados. Por otro lado, la estandarización de las condiciones de incubación estudiadas, incluyendo el rango de concentraciones de NPs o los tiempos de exposición, ayudaría significativamente a la interpretación global de los resultados obtenidos de diferentes protocolos de evaluación y de estudios interlaboratorio (Soenen *et al.*, 2011).

2.1. Estudio de la apoptosis

Las NPs con futuras aplicaciones biomédicas deben ser sometidas a una evaluación exhaustiva sobre sus posibles efectos adversos sobre el material genético. Los ensayos *in vitro* que permiten esta evaluación se basan principalmente en detectar la presencia de ADN fragmentado intracelular, evidencia más que suficiente del daño genético causado y característico de la apoptosis.

Tras realizar los ensayos de apoptosis se puede observar en las placas de ELISA (Figura 6), siguiendo el Esquema 2, la diferencia de intensidad de color, en las cuales se ve la diferencia entre el control positivo (azul intenso) y las muestras (azul claro).

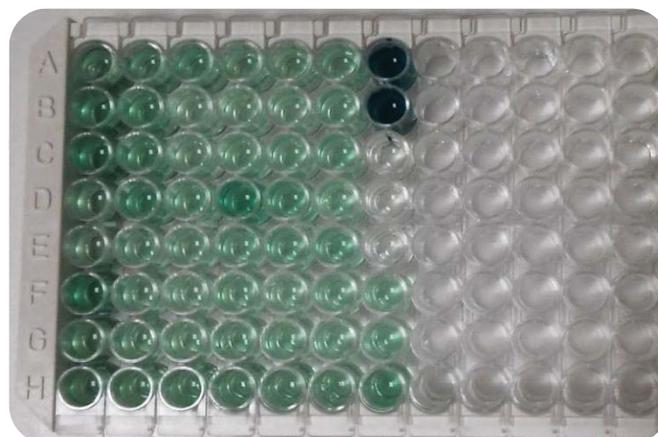


Figura 6: Placa de ELISA tras el análisis colorimétrico.

Los resultados cuantitativos obtenidos para la evaluación de la fragmentación del ADN celular utilizando un ensayo de ELISA, de los dos tipos de NPs, con 24 y 48h de incubación, se recogen en la **Figura 7**, donde cada punto representa la media de 3 réplicas \pm su desviación estándar.

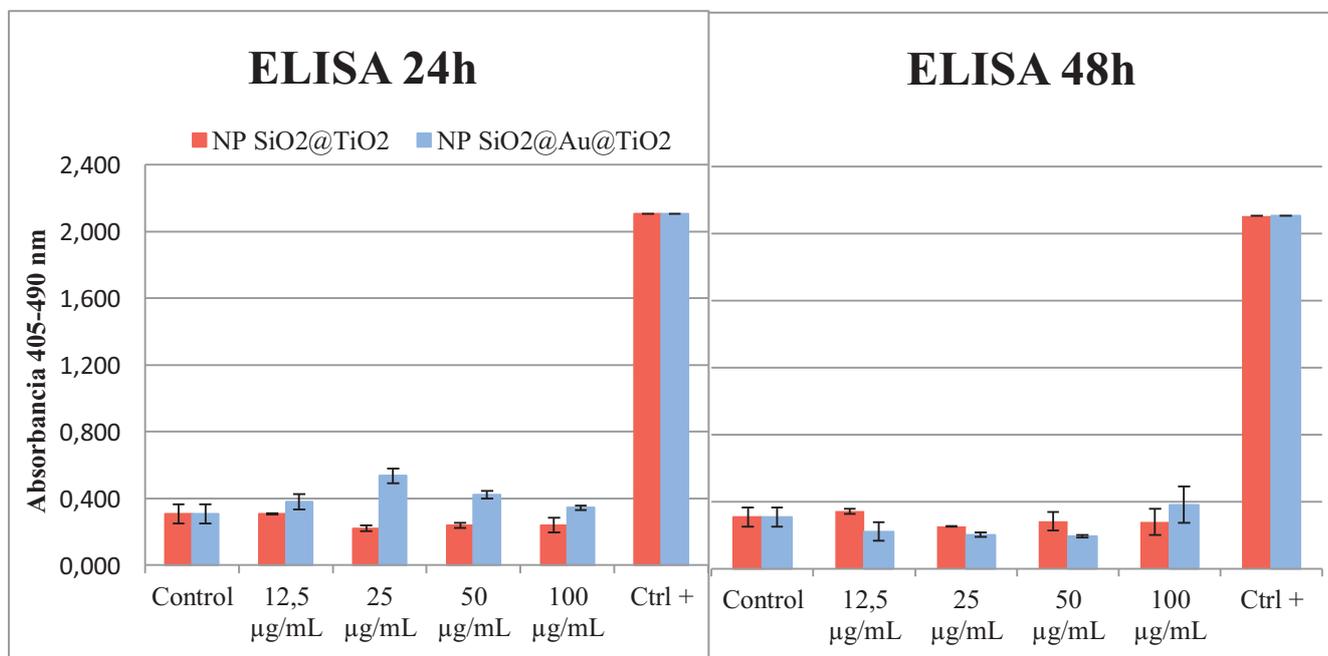


Figura 7: Análisis de la apoptosis en la línea celular A549 tras 24h y 48h de incubación con las NPs de SiO₂@TiO₂ y SiO₂@Au@TiO₂ a distintas concentraciones (12,5, 25, 50 y 100µg/mL).

Como se puede observar, para las NPs de SiO₂@TiO₂ no se muestra muerte celular, tanto para las diferentes concentraciones, como para los dos tiempos de incubación (24 y 48h). En cambio en el caso de las NPs de SiO₂@Au@TiO₂ se observa un ligero ascenso en los niveles de apoptosis en las primeras 24h de incubación, pero que no llegan a ser lo suficientemente altos como para considerarlas indicativas de muerte celular. Por lo contrario, a las 48h se observa una disminución de este efecto (excepto a 100µg/mL), que sugiere un efecto protector conferido por las NPs. Pero hay que tener en cuenta que en este caso la línea celular presenta una tasa de apoptosis bastante alta (control).

Las NPs más pequeñas son consideradas más tóxicas ya que son capaces de penetrar en las células más fácilmente que las de mayor tamaño (Zhang *et al.*, 2009). Por ello la ausencia de apoptosis observada puede estar relacionada con el gran tamaño de las NPs, ya que en diversos estudios se observa que a medida que se aumenta el tamaño de la NP disminuye el porcentaje de muerte celular (Yuan *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2010).

En cuanto al ensayo irradiando durante 20 min, en la **Figura 8** se recogen los resultados, donde cada punto representa la media de 3 réplicas \pm su desviación estándar.

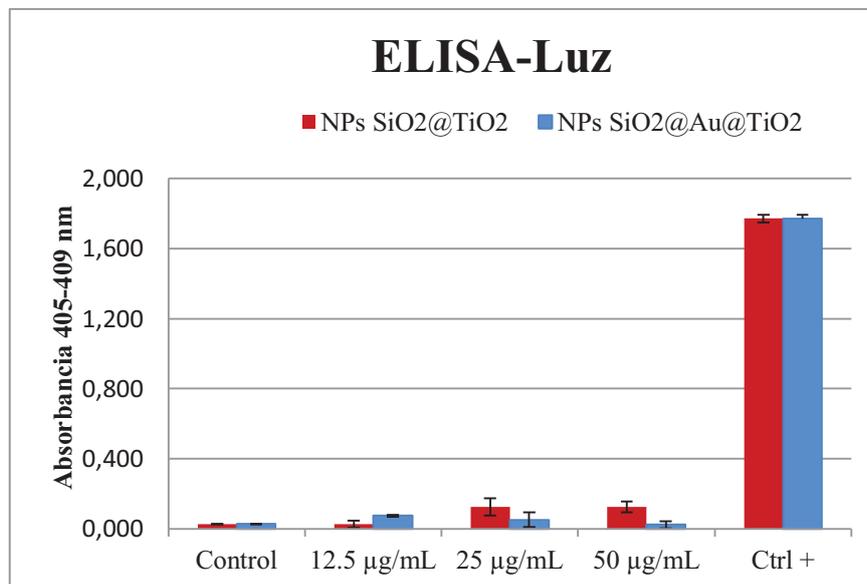


Figura 8: Análisis de la apoptosis en la línea celular A549 tras 24h de incubación con las NPs de SiO₂@TiO₂ y SiO₂@Au@TiO₂ a distintas concentraciones (12.5, 25 y 50µg/mL) y 20 min de irradiación.

En ellos se puede observar, que al contrario que en el experimento sin irradiación, el control se encuentra a unos niveles normales. Para las NPs de SiO₂@Au@TiO₂ no se observa apoptosis, en cambio para las NPs de SiO₂@TiO₂ se observa un ligero ascenso en las concentraciones más altas, pero que no llegan a ser lo suficientemente altos como para considerarlas indicativas de muerte celular. Pero en los dos casos se observa que la irradiación no ha inducido casi cambios en los cultivos.

2.2. Estudio de la actividad metabólica: MTT

La mayoría de los estudios de citotoxicidad más comúnmente utilizados se basan en métodos colorimétricos, como el ensayo MTT, que determinan la actividad mitocondrial y nos permite comprobar que no existen afectaciones en el metabolismo celular tras la exposición a las NPs.

En la Figura 9 se muestra una de las placas (siguiendo el Esquema 3) tras la realización del análisis colorimétrico de MTT, y se puede observar el color amarillo característico del MTT y el viraje a violeta del formazán.

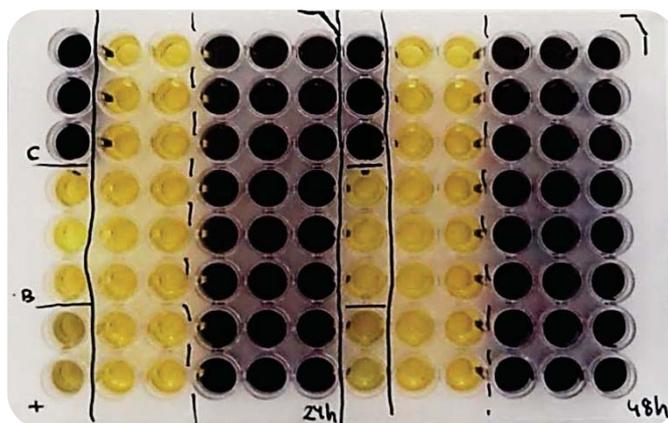


Figura 9: Placa de 96 pocillos tras el análisis MTT

En la **Figura 10** se representa la viabilidad celular en porcentaje, donde cada punto representa la media de 3 réplicas \pm desviación estándar de la media. En este tipo de estudios se considera que los tratamientos no son tóxicos cuando la viabilidad celular es del 80% o superior.

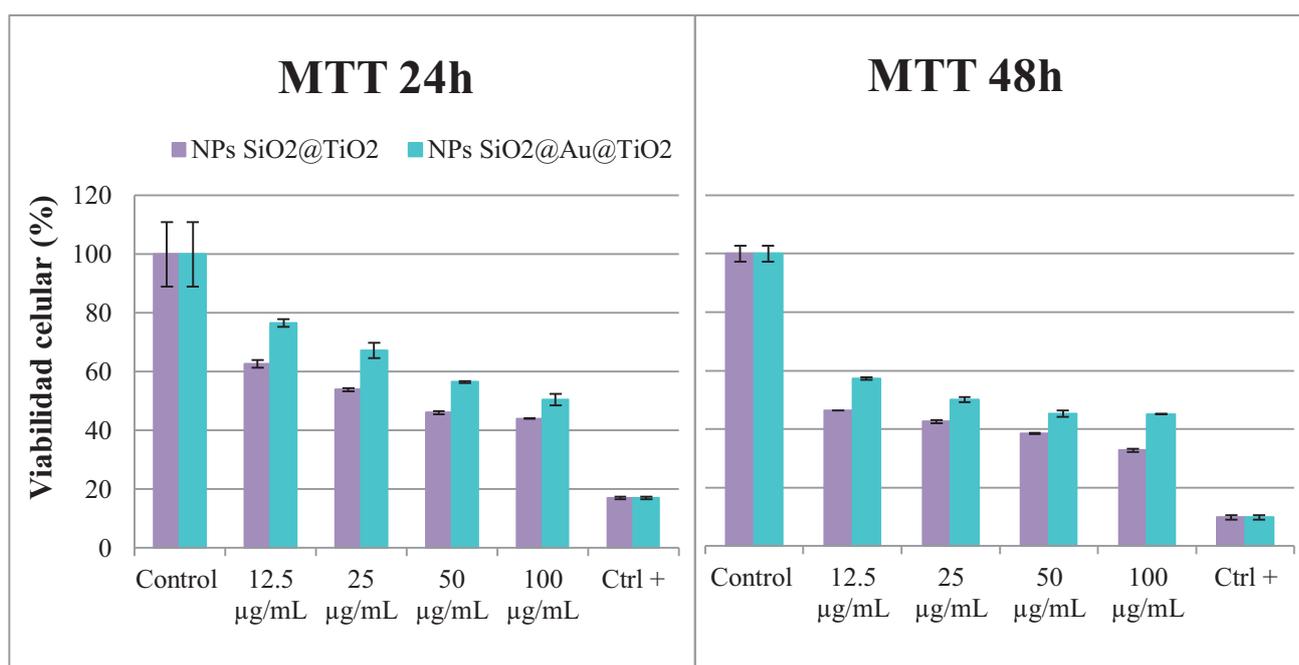


Figura 10: Análisis de la viabilidad celular de la línea celular A549 tras 24y 48h de incubación con las NPs de SiO₂@TiO₂ y SiO₂@Au@TiO₂ a distintas concentraciones (12.5, 25, 50 y 100µg/mL).

En este caso se observa cómo según incrementamos la concentración de los dos tipos de NPs disminuye la viabilidad celular de un modo dosis-dependiente, y que no hay mucha diferencia entre los dos tipos de NPs, aunque las NPs de SiO₂@Au@TiO₂ muestran un

incremento a ambos tiempos de incubación. Con respecto a los tiempos de incubación, se observa como la viabilidad celular disminuye con el tiempo y que a las 48h ya se observa como las dos concentraciones más altas (100 y 50 μ g/mL) para las NPs de SiO₂@Au@TiO₂ llegan a igualarse sin llegar al 40% de viabilidad celular, en cambio en las NPs de SiO₂@TiO₂ se sigue observando esa disminución dosis-dependiente indicativa de la posible toxicidad de estas NPs.

Con respecto a estos resultados hay que puntualizar que en la mayoría de los estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, se ha observado que la respuesta celular se encuentra afectada de una manera dependiente a la concentración de las NPs y tiempo de exposición empleados en un determinado ensayo. De forma general se puede decir que las NPs de TiO₂ no afectan a la viabilidad celular, sin embargo muchos resultados aparentemente diferentes han sido descritos por diferentes grupos de investigación. Por ello estos datos observados están en concordancia con ciertos estudios y en contradicción con otros.

Con respecto al ensayo con 20 min de irradiación, en la **Figura 11** se muestra la gráfica de la viabilidad celular en porcentaje, donde cada punto representa la media de 3 réplicas \pm desviación estándar de la media. Al observar los resultados obtenidos, vemos que no hay diferencias con los datos anteriores, sigue observándose una viabilidad dosis-dependiente y las viabilidades más altas para las NPs de SiO₂@Au@TiO₂.

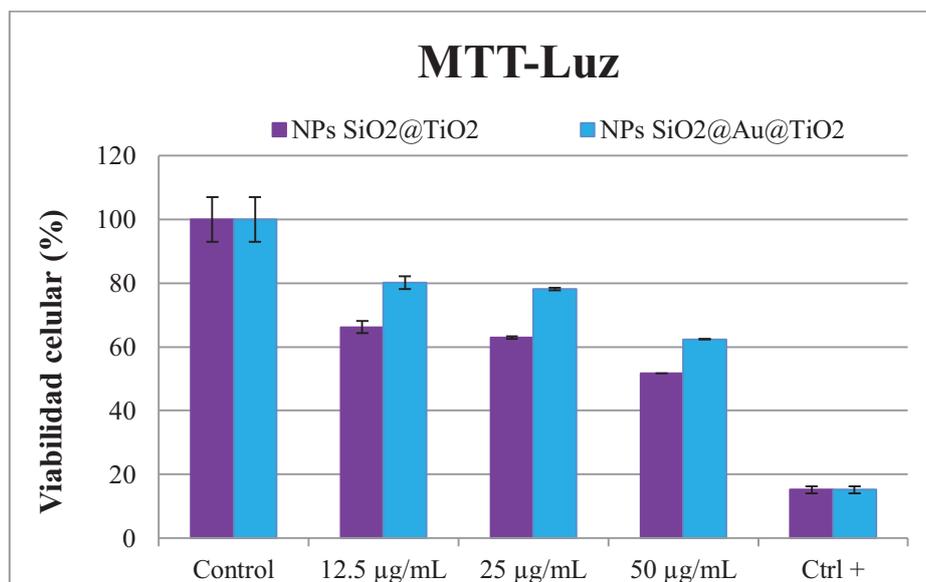


Figura 11: Análisis de la viabilidad celular de la línea celular A549 tras 24h de incubación con las NPs de SiO₂@TiO₂ y SiO₂@Au@TiO₂ a distintas concentraciones (12.5, 25 y 50 μ g/mL) y 20 min de irradiación.

Por lo tanto se contempla que la irradiación no ha provocado ningún cambio. Aunque se esperaba que con la irradiación las NPs de $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$ provocaran una disminución de la viabilidad celular al igual que se observa en el trabajo de Abdulla-Al-Mamun *et al.*, 2011. Esto puede ser debido a la necesidad de un mayor tiempo de irradiación.

2.3. Estudio del estrés oxidativo

La producción de ROS es un suceso intermedio a la muerte celular, y que puede deparar en una baja viabilidad celular.

En la **Figura 12** vemos los resultados de ROS en porcentaje obtenidos tras la incubación con los dos tipos de NPs durante 4h. Donde cada punto representa la media de 3 réplicas \pm desviación estándar de la media.

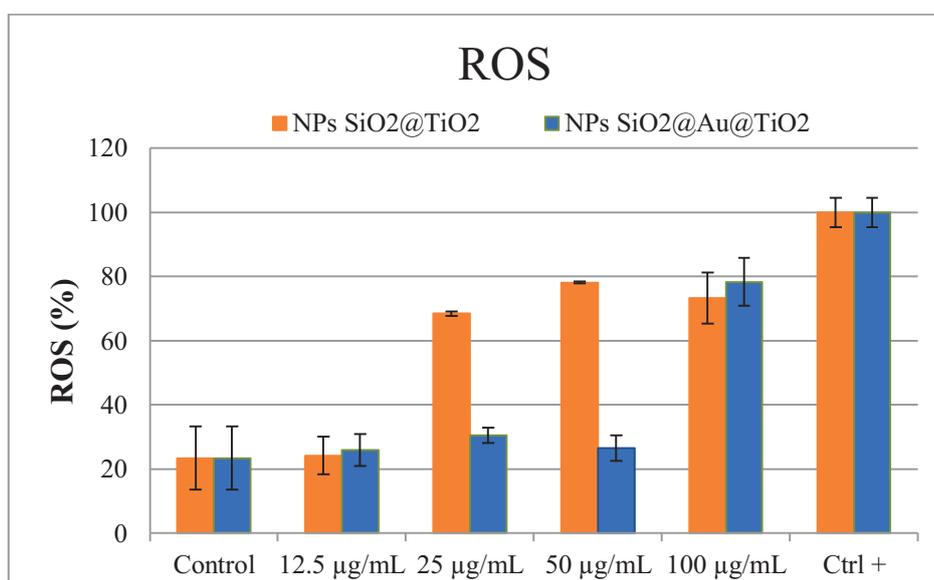


Figura 12: Análisis de ROS de la línea celular A549 tras 4h de incubación con las NPs de $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ y $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$ a distintas concentraciones (12.5, 25, 50 y 100µg/mL).

Vemos como las NPs de $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ excepto en su dosis más baja (12.5µg/ml) muestran toxicidad con unos valores de $\sim 70\%$ de producción de ROS. En cambio, las NPs $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$ se observa que las concentraciones más bajas no liberan ROS, es decir, no son tóxicas.

Estos resultados no explicarían la viabilidad dosis-dependiente para las NPs de $\text{SiO}_2@\text{Au}@\text{TiO}_2$, por lo que habría que seguir realizando experimentos para estudiar la causa de la disminución de la viabilidad celular. A falta de realizar experimentos más

concretos y de usar otras líneas celulares, estos resultados parecen indicar que las NPs están realizando efectos intracelulares activando distintas rutas de señalización. Para poder detectarlas se requiere realizar otros tipos de experimentos y análisis celulares.

La **Figura 13** muestra los resultados obtenidos en el ensayo con 20 min de irradiación, en la que se muestra la gráfica de la producción de ROS en porcentaje, donde cada punto representa la media de 3 réplicas \pm desviación estándar de la media.

Los datos muestran que tras la irradiación ninguna de las dos NPs muestra producción de ROS, aunque se observa un ligero incremento en las NPs de $\text{SiO}_2@Au@TiO_2$, pero hay que tener en cuenta que en este caso el control celular es muy elevado.

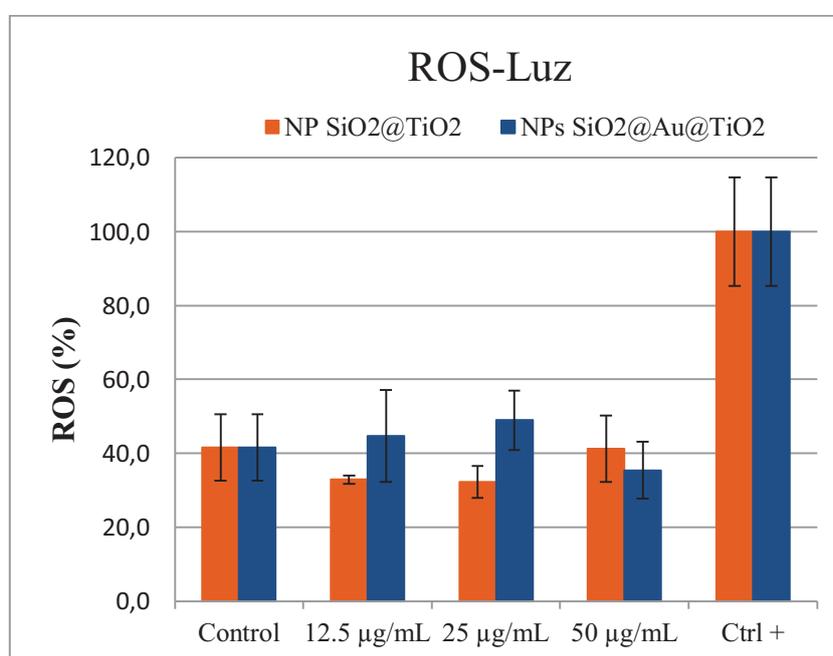


Figura 13: Análisis de ROS de la línea celular A549 tras 4h de incubación con las NPs de $\text{SiO}_2@TiO_2$ y $\text{SiO}_2@Au@TiO_2$ a distintas concentraciones (12.5, 25 y 50µg/ml) y 20 min de irradiación.

En general los resultados obtenidos con los experimentos con irradiación denotan que con 20 min de irradiación no se ha conseguido fotorrespuesta por parte de las NPs de $\text{SiO}_2@Au@TiO_2$ y por lo tanto se necesitaría ampliar los tiempos de exposición para poder realizar un estudio en profundidad de la posible fotorrespuesta de estas NPs en medio de cultivo celular.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Las NPs no presentan inducción de la apoptosis en ninguna de las variables a tener en cuenta (tipo de NP, concentración, tiempo de exposición e irradiación).
2. Cuando cuantificamos la viabilidad celular mediante ensayo de MTT de las NPs de $\text{SiO}_2@TiO_2$ y $\text{SiO}_2@Au@TiO_2$, encontramos que en esta línea celular las NPs muestran toxicidad dosis- y tiempo-dependiente.
3. Las NPs de $\text{SiO}_2@Au@TiO_2$ a bajas concentraciones (12.5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), no liberan ROS. Esto indica que las NPs están activando diferentes rutas intracelulares. Se necesitan hacer otro tipo de experimentos para determinar qué rutas se activan y conviene usar otro tipo de líneas celulares con un crecimiento mucho más lento.
4. Cuando tratamos las NPs en el medio con luz durante 20 minutos de irradiación no muestran fotorrespuesta las NPs de $\text{SiO}_2@Au@TiO_2$. Es necesario ajustar las condiciones, como aumentar la concentración de Au, realizar tiempos de irradiación mayor, o con otro tipo de línea celular.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una mejor comprensión de la interacción de las NPs de $\text{SiO}_2@TiO_2$ y $\text{SiO}_2@Au@TiO_2$ en los sistemas celulares y de sus posibles consecuencias, y ponen de manifiesto la necesidad de seguir realizando evaluaciones a fin de incrementar el conocimiento sobre los posibles efectos nocivos a diferentes niveles.

Recomendaciones del trabajo

1. Teniendo en cuenta que las NPs en los medios fisiológicos pueden sufrir cambios, el escenario ideal sería realizar una caracterización más a fondo de las mismas *ex ante*, *in itinere* y *ex post* de la evaluación de su toxicidad, además de hacer una evaluación de la captación celular con el objetivo de establecer una relación inequívoca y fiable entre las NPs caracterizadas y su toxicidad inherente.
2. En este trabajo se evaluó la citotoxicidad aguda (el período máximo de incubación fue de 48h) y sería interesante hacer una evaluación de la citotoxicidad crónica (largos períodos de tiempo de exposición a las NPs), debido a que tanto la localización intracelular como la estabilidad de las NPs cambian con el tiempo.

3. Conviene usar otro tipo de línea celular con un crecimiento más lento, donde se puedan observar los cambios que ejercen las NPs de un modo más preciso.
4. Con respecto a los experimentos con irradiación se debe realizar un nuevo diseño experimental, aumentando los tiempos de exposición y de *post* incubación para poder corroborar la falta de fotorrespuesta de las NPs de SiO₂@Au@TiO₂.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulla-Al-Mamun, M., Kusumoto, Y., Zannat, T., Islam, M.S. (2011). Synergistic cell-killing by photocatalytic and plasmonic photothermal effects of Ag@TiO₂ core-shell composite nanoclusters against human epithelial carcinoma (HeLa) cells. *Applied Catalysis A: General* 398, 134–142.
- Antequera, D., Bolos, M., Spuch, C., Pascual, C., Ferrer, I., Fernandez-Bachiller, M.I., Rodríguez-Franco, M.I., Carro, E. (2012). Effects of a tacrine-8-hydroxyquinoline hybrid (IQM-622) on A β accumulation and cell death: involvement in hippocampal neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* Jun;46(3):682-91.
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, MR., Bottero, J-Y. (2009). Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ Pollut.* Apr;157(4):1127-33.
- Aydın, A., Sipahi, H., Charehsaz, M. (2012). Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems: InTech Open Access Publisher: 483-500.*
- Barnard, A.S., Curtiss, L.A.(2005). Prediction of TiO₂ nanoparticle phase and shape transitions controlled by surface chemistry. *Nano Lett.* Jul; 5(7), 1261-6.
- Borm, P.J.A., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E. (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle Fibre Toxicol.* 3, 11.
- Buzea, C., Pacheco, I., Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4):17-71.
- Cai, R.; Hashimoto, K.; Itoh, K.; Kubota, Y.; Fujishima, A. (1991). Photokilling of malignant cells with ultrafine titanium dioxide powder. *Bull.Chem. Soc. Jpn.* 64, 1268-1273.
- Carp, O., Huisman, C., Reller, A. (2004). Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Prog. Solid State Chem.*, 32(1-2), 33-117.
- Díaz, B., Sánchez-Espinel, C., Arruebo, M., Faro, J., de Miguel, E., Magadán, S., et al. (2008). Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small.* Nov;4(11):2025-34.
- Ellingsen, JE.(1991). A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂.*Biomaterials.*Aug;12(6):593-6.
- Emsley, J.(2001).*Nature's Building Blocks.An A-Z Guide to the Elements.* N.J.Rud Oxford University Press.
- Fabian, E., Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, van Ravenzwaay B. (2008).Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol.* 82:151–157.
- Farre, M., Sanchis, J., Barcelo, D. (2011). Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trends Anal. Chem.* 30:517.
- Feynman, R.P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and science.* 23(5): 22-36.
- Fujishima, A., Honda, K. (1972). Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature,* Jul 7;238(5358):37-8.
- Harris, C., Hansen, J.M. (2012). Oxidative stress, thiols, and redox profiles. *Methods Mol. Biol.*,889:325-46.
- Hu, X., Cook, S., Wang, P., Hwang, HM. (2009). In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 407(8):3070-2.

- Kalbacova, M., Macak, J.M., Schmidt-Stein, F., Mierke, C.T., Schmuki, P. (2008). TiO₂ nanotubes: Photocatalyst for cancer cell killing. *Phys. Status Solidi RRL*, 2(4), 194-196.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 87:99-163.
- Kubota, Y., Shuin, T., Kawasaki, C., Hosaka, M., Kitamura, H., Cai, R., Sakai, H., Hashimoto, K., Fujishima, A. (1994). Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. *Br. J. Cancer*, 70(6): 1107-1111.
- Kumar, P. S., Pastoriza-Santos, I., Rodriguez-Gonzalez, B., García De Abajo, F. J., Liz-Marzan, L. M. (2008). High-Yield Synthesis and Optical Response of Gold Nanostars. *Nanotechnology*, 19, 015606.
- Lan Y, Lu Y, Ren Z. (2013) Mini review on photocatalysis of titanium dioxide nanoparticles and their solar applications. *Nano Energy*.;2(5):1031-45.
- Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M., Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*; 14:277-87.
- Lechuga, L.M. (2011). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. En *Biotecnología aplicada a la salud humana*, S.L. Edikamed, ed., pp. 98-112.
- Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4, 26-49.
- Li, J.J., Hartono, D., Ong, C.N., Bay, B.H., Yung, L.Y. (2010). Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*. Aug; 31(23): 5996-6003.
- Los, M., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*; 10:629-39.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Bergga, T., Flanagan, M.B., Lynch, I., Elia, G., and Dawson, K. (2011). The evolution of the protein corona around nanoparticles: A test study. *ACS nano* 5, 7503-7509.
- Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B., and Petri-Fink, A. (2012). Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemical reviews* 112, 2323-2338.
- Markides, H., Rotherham, M., and Haj, A.J.E. (2012). Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *Journal of Nanomaterials* 2012, 1-11.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 5-63.
- Ngwa, H.A., Kanthasamy, A., Gu, Y., Fang, N., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G. (2011). Manganese Nanoparticle Activates Mitochondrial Dependent Apoptotic Signaling and Autophagy in Dopaminergic Neuronal Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Nov 1; 256(3): 227-240.
- NNI (2011). *The National Nanotechnology Initiative: Research and Development Leading to a Revolution in Technology and Industry* (Washington, DC, USA: National Science and Technology Council Committee on Technology).
- Oh, W.K., Kim, S., Choi, M., Kim, C., Jeong, Y.S., Cho, B.R., Hahn, J.S., Jang, J. (2010). Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano*. Sep 28;4(9):5301-13.
- Passagne, I., Morille, M., Rousset, M., Pujalte, I., Azou, B.L. (2012). Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology*. Sep 28; 299(2-3):112-24.

- Popov, A.P., Priezhev, A.V., Lademann, J., Myllyla, R. (2005). TiO₂ nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens. *Journal of Physics D: Applied Physics* 38(15): 2564.
- Powers, K.W., Palazuelos, M., Moudgil, B.M., Roberts, S.M. (2007). Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology*.1(1):42-51.
- Primo, A., Corma, A., García, H. (2011). Titania supported gold nanoparticles as photocatalyst. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 886-910.
- Rehman, S., Ullah, R., Butt, A. M., Gohar, N. D. (2009). Strategies of making TiO₂ and ZnO visible light active. *J Hazard Mater*. Oct 30;170 (2-3), 560-9.
- Repetto, M. (2002). *Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición. p.303-305.
- Savolainen, K., Alenius, H., Norppa, H., Pylkkänen, L., Tuomi, T., and Kasper, G. (2010). Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies-a review. *Toxicology* 269, 92–104.
- Sayes, C.M., and Warheit, D.B. (2009). Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 1, 660–670.
- Shen, M., Cai, H., Wang, X., Cao, X., Li, K., Wang, S.H., Guo, R., Zheng, L., Zhang, G., Shi, X. (2012). Facile one-pot preparation, surface functionalization, and toxicity assay of APTS-coated iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*. Mar 16;23(10):105601.
- Soenen, S.J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J.M., Parak, W.J., De Smedt, S.C., Braeckmans, K. (2011). Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity 5evaluation. *Nanotoday* 6:446-465.
- Stöber, W., Fink, A., Bohn, E. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* 26, 62–69.
- Sousa-Castillo, A., Comesaña-Hermo, M., Rodríguez-González, B., Pérez-Lorenzo, M., Wang, Z., Kong, X., Govorov, A.O., Correa-Duarte, M.A. (2016). Boosting hot electron-driven photocatalysis through anisotropic plasmonic nanoparticles with hot spots in Au–TiO₂ nanoarchitectures. *J. Phys. Chem. Article ASAP*.
- Uboldi, C., Giudetti, G., Broggi, F., Gilliland, D., Ponti, J., Rossi, F. (2012). Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutat. Res.* Jun 14;745(1-2):11-20.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Jr., Rejeski, D. and Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 1769-1780.
- Verma, A., Stellaci, F.(2010).Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, Jan;6(1):12-21.9.
- Yuan, Y.; Liu, C.; Qian, J.; Wang, J.; Zhang, Y. (2010). Size-Mediated Cytotoxicity and Apoptosis of Hydroxyapatite Nanoparticles in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Biomaterials* 31, 730–40.
- Zhang, G., Yang, Z., Lu, W., Zhang, R., Huang, Q., Tian, M., Li, L., Liang, D., Li, C. (2009). Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Apr*;30(10):1928-36
- Zhang, H., Chen, B., Banfield, J.F. (2008). *Physical Review B*, 78:214106.