



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

CURSO 2017-2018

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**GENOTOXICIDAD ASOCIADA A LA EXPOSICIÓN DE CÉLULAS
HEPÁTICAS A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO**

**XENOTOXICIDADE ASOCIADA Á EXPOSICIÓN DE CÉLULAS HEPÁTICAS
A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO**

**GENOTOXICITY ASSOCIATED WITH THE EXPOSURE OF HEPATIC
CELLS TO TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES**

Vº Bº Directoras del Trabajo

Dra. Dña. *Blanca Laffon Lage*

Dra. Dña. *Vanessa Valdiglesias García*

Leticia Luján Amoraga

Julio 2018



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

BLANCA LAFFON LAGE, Doctora en Farmacia y Profesora Titular del Departamento de Psicología de la Universidade da Coruña y VANESSA VALDIGLESIAS GARCÍA, Doctora en Biología e Investigadora del mismo departamento, INFORMAN:

Que el Trabajo de Fin de Máster titulado “Gentoxicidad asociada a la exposición de células hepáticas a nanopartículas de dióxido de titanio” presentado por Dña. Leticia Luján Amoraga ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, a 17 de julio de 2018

Fdo.:

Dra. Dña. *Blanca Laffon Lage*

Dra. Dña. *Vanessa Valdiglesias García*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Nanotecnología y nanomateriales.....	1
2. Clasificación y características de los nanomateriales.....	1
3. Aplicaciones de los nanomateriales.....	2
4. Relevancia de los nanomateriales en la actualidad.....	3
5. Toxicidad de los nanomateriales	4
5.1 Vías de exposición y modos de interacción celular:.....	5
5.2 Genotoxicidad.....	6
5.3 Caracterización físico-química	7
5.4 Captación celular	8
6. Planificación del estudio.....	9
6.1 Nanopartículas de dióxido de titanio	9
6.1.1 Toxicidad del TiO ₂ -NP	9
6.1 Hepatotoxicidad	10
6.2 Ensayo de micronúcleos	11
OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
1. Nanopartículas.....	13
1.1 Preparación de las suspensiones	13
1.2 Caracterización de las NP	13
2. Cultivo celular.....	14
3. Captación celular.....	15
4. Ensayo de micronúcleos.....	16
4.1 Tratamientos	16
4.2 Evaluación por citometría de flujo.....	16
5. Análisis estadístico.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
1. Caracterización de las NP.....	18
2. Captación celular	21
3. Ensayo de micronúcleos	24
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

RESUMEN:

Debido al gran desarrollo que el campo de la nanotecnología y la síntesis de nuevos materiales han experimentado en los últimos años, se ha producido un increíble aumento tanto en el número de nanomateriales manufacturados, como de sus aplicaciones para diversos fines. Entre la gran amalgama de nanomateriales existentes, las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂-NP) se caracterizan por ser uno de los nanocompuestos más sintetizados a escala mundial y que mayor valor económico representan. A día de hoy están presentes entre los componentes de numerosos alimentos, cosméticos, pinturas o artículos de higiene disponibles en el mercado. Debido a esta generalizada presencia, han surgido importantes dudas sobre los efectos colaterales derivados de su exposición. Muchos estudios ya han centrado sus esfuerzos en la evaluación de los efectos adversos en los organismos o el medio ambiente. Sin embargo, a pesar de que numerosas pruebas han indicado que su tamaño y propiedades nanométricas favorecen la acumulación de las TiO₂-NP en el hígado y otros tejidos, la información obtenida acerca de su genotoxicidad no ha sido concluyente hasta la fecha. En este estudio se llevó a cabo una evaluación del posible daño genotóxico producido *in vitro* en células hepáticas humanas HepG2 por diferentes concentraciones de TiO₂-NP (10-200µg/ml) y a tres tiempos de exposición (3, 6 y 24h). Tras la caracterización físico-química de las nanopartículas, se comprobó si las mismas eran internalizadas por las células y en qué medida lo hacían. A continuación, por medio del ensayo de micronúcleos, se analizó la posibilidad de que el compuesto produjese genotoxicidad generando alteraciones cromosómicas. Los resultados mostraron que las TiO₂-NP eran captadas por las células de forma dependiente del tiempo y la concentración. Sin embargo, no se detectó un aumento en la frecuencia de MN analizados mediante citometría de flujo en ninguna de las dosis ni los tiempos testados. Este trabajo aporta datos sobre la genotoxicidad de este compuesto a nivel hepático, contribuyendo a la información necesaria para la determinación de su utilización de forma segura y la regulación del uso de este nanomaterial.

ABSTRACT:

Due to the great development that the field of nanotechnology and synthesis of new materials has experienced in recent years, there has been an incredible increase in both the number of nanomaterials manufactured, and their applications for various purposes. Among the great amalgam of existing nanomaterials, titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NP) are one of the most frequently synthesized nanocomposites in the world and represent the greatest economic value. Today they are present among the components of numerous foods, cosmetics, paints or hygiene items available in the market. Due to this widespread presence, important concerns have arisen about the collateral effects derived from its exposure. Many studies have already focused their efforts on the evaluation of adverse effects on organisms or the environment. However, despite numerous tests have indicated that their size and nanometric properties favor the accumulation of TiO₂-NP in the liver and other tissues, the information obtained on its genotoxicity has not been conclusive to date. In this study, the possible genotoxic damage produced *in vitro* on HepG2 human liver cells by different concentrations of TiO₂-NP (10-200µg/ml) and at three exposure times (3, 6 and 24h) was evaluated. After physico-chemical characterization of the nanoparticles, it was checked whether they were internalized by the cells and to what extent. Then, the possible induction of genotoxicity generating chromosomal alterations was analyzed by means of the micronucleus (MN) test. The results showed that the TiO₂-NP were captured by the cells in a time- and concentration-dependent manner. However, no increase in the frequency of MN analyzed by flow cytometry was detected at any of the doses or times tested. This work provides data on the genotoxicity of this compound at the hepatic level, contributing to the necessary information for the determination of its safely use and the regulation of this nanomaterial use.

RESUMO:

Debido ao gran desenvolvemento do campo da nanotecnoloxía e á síntese de novos materiais nos últimos anos, houbo un aumento no número de nanomateriais manufacturados, así como nas súas aplicacións para diversos fins. Entre a gran amalgama dos nanomateriais existentes, as nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂-NP) caracterízanse por ser un dos nanocompostos máis sintetizados no mundo e representan o maior valor económico. Hoxe están presentes entre os compoñentes de moitos produtos, cosméticos, pinturas ou artigos de hixiene dispoñibles no mercado. Debido a esta presenza xeralizada, xurdiron importantes dúbidas sobre os efectos colaterais derivados da súa exposición. Moitos estudos xa centraron os seus esforzos na avaliación dos efectos adversos sobre os organismos ou o medio ambiente. Non obstante, a pesar de que numerosas probas indicaron que o seu tamaño e propiedades nanométricas favorecen a acumulación de TiO₂-NP no fígado e outros tecidos, a información obtida sobre a súa xenotoxicidade non foi concluínte ata a data. Neste estudo, realizouse unha avaliación do posible dano xenético producido *in vitro* nas células hepáticas HepG2 humanas por diferentes concentracións de TiO₂-NP (10-200µg/ml) a tres tempos de exposición (3, 6 e 24h). Trala caracterización físico-química das nanopartículas, verificouse se eran internalizadas polas células e en que medida o facían. A continuación, mediante a proba de micronúcleos (MN), analizouse a posibilidade de que o composto producise xenotoxicidade xerando alteracións cromosómicas. Os resultados mostraron que as TiO₂-NP foron captadas polas células de forma dependente do tempo e da concentración. Non obstante, non se observou ningún aumento na frecuencia de MN analizada por citometría de fluxo en calquera das doses ou tempos avaliados. Este traballo proporciona datos sobre a xenotoxicidade deste composto a nivel hepático, contribuíndo á información necesaria para a determinación da súa utilización de forma segura e á regulación do uso deste nanomateria

INTRODUCCIÓN

1. Nanotecnología y nanomateriales

Los numerosos avances que han experimentado en los últimos tiempos la bioquímica, la química, la física, la microscopía y la ingeniería de materiales, han impulsado el interés por las propiedades que las partículas extremadamente pequeñas pueden presentar, así como por sus posibles aplicaciones en una amplia variedad de productos (Doyle, 2006; Borm et al., 2006).

Esta rama emergente del saber científico-técnico se conoce como nanotecnología y se define como: “el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales a través del control de la materia a escala nanométrica, entre 1 a 100 nanómetros” (Bailon et al., 2016). Esta ciencia se fundamenta en el hecho de que, al reducir el tamaño de un material, más allá del límite de los 100nm, se manifiestan bruscas variaciones en su comportamiento, de ahí que los materiales a nanoescala puedan poseer nuevas propiedades que no presentan a tamaños mayores.

Los esfuerzos llevados a cabo en este campo de investigación han resultado en el surgimiento de una amplia gama de nanomateriales que se caracterizan por presentar una morfología que es más pequeña que un micrómetro en al menos una dimensión o que son nanoestructurados (poseen una estructura nanocristalina que implica la presencia de características a nanoescala). Si bien, aunque estos nanomateriales a menudo conservan la misma composición molecular que los materiales más grandes, el tamaño pequeño que los caracteriza, da como resultado características físicas y químicas únicas.

2. Clasificación y características de los nanomateriales

Entre la gran amalgama de nanomateriales que se conocen, encontramos algunos que se crean y se liberan de manera natural, y otros que lo hacen sintéticamente. Debido a la complejidad y diversidad existente, es difícil seguir un criterio único de clasificación para englobarlos. Una forma sencilla de hacerlo es en función a sus dimensiones. Concretamente, según el número de dimensiones que posean fuera de la escala nanométrica ($>100\text{nm}$). Así distinguimos entre: Materiales 0-D, con todas las dimensiones dentro de la nanoescala (por ejemplo: las nanopartículas [NP]); Materiales 1-D con una dimensión fuera de la nanoescala (por ejemplo: nanotubos); Materiales 2-D con dos dimensiones fuera de la nanoescala (por ejemplo: nanocapas); o, Materiales 3-D con todas sus dimensiones fuera de la nanoescala, pero con estructura nanocristalina compuesta de múltiples de nanopartículas, haces de nanohilos y nanotubos (Tiwari et al., 2012).

La característica más importante de este tipo de estructuras, es sin duda su pequeño tamaño pues, este rasgo es el responsable de grandes cambios en las propiedades físicas del material, además de ser clave para comprender su destino y comportamiento en entornos reales. (Christian, 2009). A medida que se disminuye el tamaño, aumenta la proporción de átomos que presentan en la superficie y, puesto que las propiedades de superficie (nivel de energía, estructura electrónica y reactividad) son diferentes, la bioactividad también difiere de sus análogos de mayores tamaños (Shi et al., 2013; Buzea et al., 2007). Debido a ello, un nanomaterial concreto puede presentar diferentes y novedosas propiedades ópticas, mecánicas, eléctricas, magnéticas, químicas e incluso biológicas (Doyle, 2006). Todo esto resulta muy prometedor a la hora de su aplicación y uso en distintos campos, lo que ha propiciado todavía más su investigación y desarrollo.

3. Aplicaciones de los nanomateriales

La evolución increíblemente rápida de la nanotecnología y los nanomateriales, se ha acompañado de un gran desarrollo de sus aplicaciones en diferentes campos de la ciencia y la tecnología. Los nanomateriales más utilizados en la elaboración de productos de consumo son, como se puede observar en la Figura 1, los basados en metales y óxidos metálicos, como puede ser el dióxido de titanio (TiO_2), el óxido de zinc (ZnO), el oro y la plata. De la misma manera podemos observar que las estructuras basadas en carbono son también muy utilizadas gracias a la versatilidad que las caracteriza.

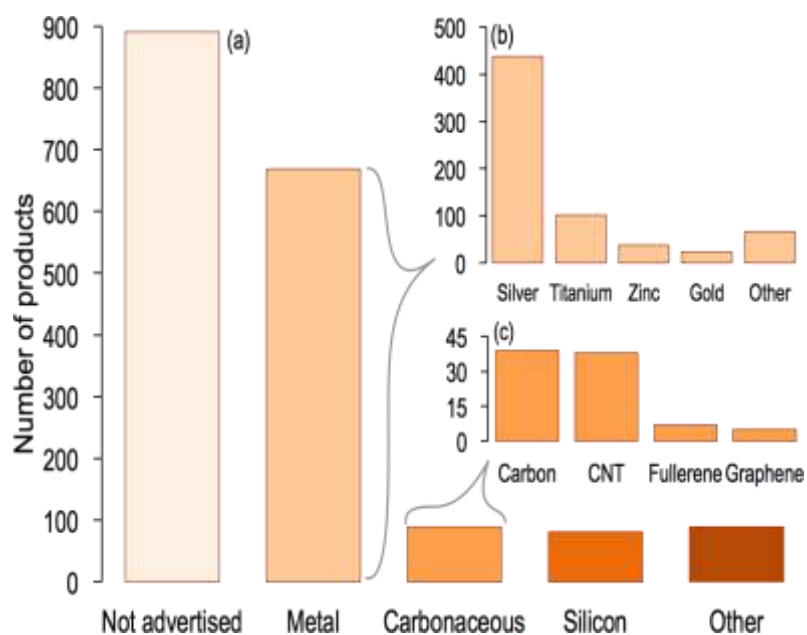


Figura 1: Nanocomponentes más comunes de los productos recogidos en el Inventario de productos de consumo (CPI) derivados de la Nanotecnología (Vance et al., 2015). a) Gráfica donde se presentan los nanocomponentes más abundantes de los productos del inventario; b) Especificación de los principales nanomateriales basados en metales englobados en la gráfica a. c) Especificación de los nanocompuestos basados en carbono englobados en la gráfica a.

A día de hoy, los nanomateriales se aplican en diversas tecnologías de vanguardia, tales como energía, filtración, automovilismo, productos químicos, cosmética, recubrimientos, electrónica y catalizadores (Vance et al., 2015). Entre el gran abanico de posibilidades, también se encuentran aplicaciones en el campo de la biología, la biotecnología y la medicina (Bathia et al., 2016). Dentro de éste ámbito podemos destacar aplicaciones como el desarrollo de materiales biosensores que detectan cantidades muy pequeñas de toxinas, patógenos, compuestos volátiles y diversos compuestos orgánicos presentes en fluidos corporales o muestras ambientales. En el ámbito ecológico sirven como fertilizantes o como productos para el tratamiento de aguas residuales (Batley et al., 2012). También destaca su papel en la mejora de las técnicas de análisis de imagen, en la detección de enfermedades con alta especificidad, en el transporte de medicamentos o el desarrollo de vacunas, en la terapia génica como vectores de transporte de ADN o en la ingeniería de tejidos. (Doyle, 2006; Deng y Gao, 2016)

4. Relevancia de los nanomateriales en la actualidad

Para poder entender el cada vez más generalizado uso de los nanomateriales en la fabricación de innumerables productos y dispositivos, se debe resaltar la importancia económica que suponen a nivel global. La valoración realizada por la Comisión Europea en 2016, consideraba que se producen mundialmente unos 11 millones de toneladas de nanomateriales, y que de este sector dependen unos 300.000 o 400.000 puestos de empleo directo solo en Europa (Kumar et al., 2018). Se han realizado numerosas estimaciones sobre cuál ha sido realmente el impacto que han tenido los productos de la nanotecnología y la síntesis de nuevos materiales en el mercado global y cuál será la tendencia que seguirá en los próximos años. Un reciente informe realizado por *Allied Market* en 2016 (Market, 2016) proyecta que el mercado global de los nanomateriales alcanzará más de 55.000 mil millones de dólares americanos en 2022 en contraste con los 14.700 millones que se facturaron en 2015 (Figura 2).

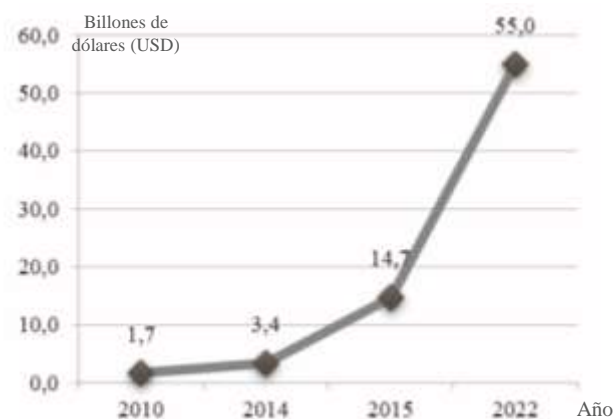


Figura 2: Tendencia esperada para la industria de los nanomateriales en el mercado global en los próximos años según un informe de *Allied Market* realizado en 2016 (Inshakova e Inshakov, 2017). En la gráfica se evidencia una tasa de crecimiento anual esperada de un 20,7% durante los próximos años, que supondrá que el valor de éste sector en el mercado ascienda hasta los 55 millones de dólares en 2022.

Gracias a las enormes ventajas competitivas que estos compuestos ofrecen a los productos que los contienen, se prevé una tasa de crecimiento anual de 20,7% durante este período en la manufactura e industrialización de este sector (Inshakova e Inshakov, 2017).

5. Toxicidad de los nanomateriales

Los productos nanotecnológicos resultan muy beneficiosos para usos industriales, de consumo o biomédicos pero, al mismo tiempo, han generado discrepancias sobre los posibles riesgos para la salud y el medio ambiente derivados de su exposición, ya que la mayoría se utilizan en productos con los que cotidianamente nos encontramos en contacto (Nel et al., 2006; Pumera, 2011).

Entre la sociedad existen una cierta preocupación sobre cuáles son las consecuencias que pueden sufrir los consumidores o los trabajadores encargados de la producción de nanomateriales, ya que son los que más directamente se encuentran expuestos a estos productos, y todavía no se conoce con exactitud cómo es su comportamiento toxicocinético (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) en los organismos. De la misma manera, no está claro en muchos casos, que puede ocurrir con los nanomateriales cuando son liberados al medio ambiente, y cuáles son sus procesos de degradación naturales; se desconoce en la mayoría de las ocasiones cuál será el destino y las consecuencias ecológicas de la dispersión de NP en los ecosistemas (Doyle, 2006). Además, este problema se puede acentuar ya que, cuando varios agentes están presentes en un entorno, la interacción de éstos entre sí puede dar lugar a efectos acumulativos o sinérgicos, con consecuencias más graves para el futuro de las especies afectadas (Dar et al.,2016).

Las agencias de seguridad encargadas de la reglamentación de las sustancias químicas, como pueden ser la EFSA (*European Food Security Agency*) o la ECHA (*European Chemicals Agency*), se cuestionan en algunos casos si realmente las ventajas aplicativas que ofrecen estos nanomateriales compensan o superan los riesgos que supone su utilización en productos de manejo y consumo habitual.

Ya que los nanomateriales se encuentran en la actualidad entre los contaminantes emergentes que más preocupaciones generan, su desarrollo, uso y eliminación final segura y sostenible requiere la capacidad de prever y evitar futuros problemas potenciales (Boyes et al., 2017). Para ello hacen falta datos suficientes que permitan identificar cuáles son los riesgos derivados de la utilización de cada uno de estas nuevas sustancias.

Sin embargo, evaluar los nanomateriales y sus productos de transformación en matrices ambientales complejas y medios biológicos es extremadamente desafiante. (Boyes et al., 2017). El problema al intentar establecer estándares de seguridad, es que los nanomateriales pueden causar toxicidad de distintas formas (Oberdoster, 2010). Se ha comprobado, que las propiedades físico-químicas de las NP (por ejemplo: forma, composición, tamaño, carga superficial e hidrofobicidad / hidrofiliidad de la superficie) desempeñan un papel clave en la determinación de sus interacciones con las células (Bezhadi et al., 2017), pudiendo suponer un destino, transporte y propiedades tóxicas que no se observan con materiales convencionales de tamaño mayor (Nel et al., 2006; Boyes et al., 2017; Donaldson y Poland, 2013).

Como consecuencia de la particularidad individual de cada compuesto, es complicado relacionar cuáles son las propiedades físico-químicas que se corresponden con una mayor toxicidad. De la misma manera, no es tarea fácil determinar cuáles son las dosis menos perjudiciales, los efectos adversos más comunes o los organismos especialmente sensibles. Su toxicidad no puede ni extrapolarse a partir de la toxicidad de los materiales a mayor escala, ni de la toxicidad de sus constituyentes en forma iónica (Pumera, 2011).

5.1 Vías de exposición y modos de interacción celular:

Debido a su tamaño, las NP son capaces de ingresar al cuerpo humano por distintas vías. Sharifi et al. (2012) identificaron la piel como la principal vía de exposición para los nanomateriales de productos de consumo, según el uso normal esperado de los productos que contienen estos agentes. Esto se debe a que muchos se corresponden con (1) productos sólidos destinados a ser tocados o (2) productos líquidos que contienen suspensiones de nanomateriales que deben aplicarse sobre la piel o el cabello. El otro 25% de los productos presentan nanomateriales que se pueden inhalar durante el uso y el 16% restante, nanomateriales que pueden ingerirse (Vance et al., 2015).

Las NPs pueden atravesar las membranas celulares e ingresar al citoplasma. Generalmente lo hacen a través de mecanismos de endocitosis. Bezhadi et al. (2017) diferencia cinco mecanismos principales: fagocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis independiente de clatrina/caveolas y macropinocitosis. Las nanopartículas pueden interactuar con proteínas, ADN, lípidos, membranas, orgánulos y fluidos biológicos e interferir con el sistema (Roiter et al., 2008; Shang et al., 2014). Además, una vez dentro del organismo, pueden ingresar al torrente sanguíneo y llegar a diferentes órganos (Khan et al., 2015).

En general, las principales consecuencias celulares que se observan tras la exposición son cambios en el ciclo celular y aparición de marcadores inflamatorios y apoptóticos. En otras ocasiones, aumentan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causan daño celular y genético, aumentan de la producción de citocinas específicas y producen anomalías en comportamientos como la adhesión celular, la migración y la diferenciación (Deng y Gao, 2016; Shakeel et al., 2016).

5.2 Genotoxicidad

Algunas de las NP cuyo tamaño les permite traspasar las membranas celulares son capaces de llegar al núcleo, atravesando por difusión la membrana nuclear o por medio de los complejos de poro nuclear. Una vez allí, muchas pueden interactuar directamente con el ADN o con las proteínas implicadas en la replicación, la transcripción o la reparación del mismo (Figura 3) (Magdalenova et al., 2014).

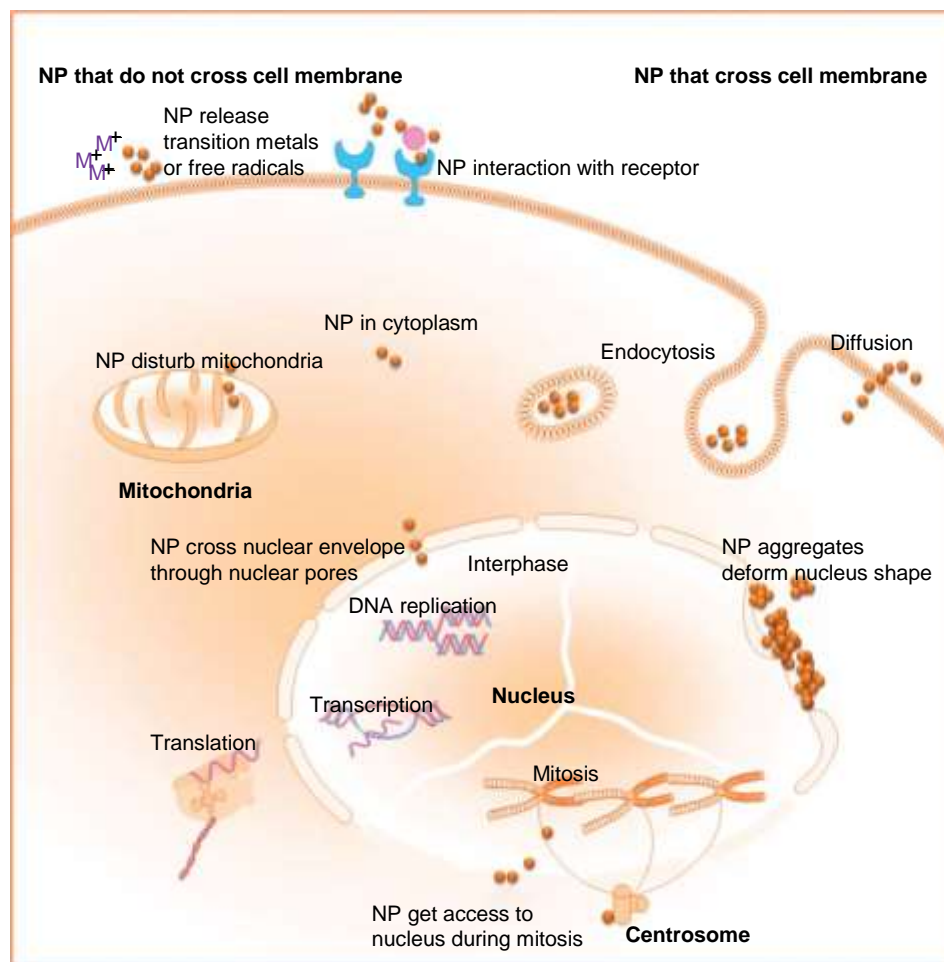


Figura 3: Modos de captación celular para las NP y posibles interacciones con la maquinaria nuclear (Magdalenova., 2014) En la parte superior izquierda se muestra la captación de las NP que no pueden atravesar la membrana, mientras que a la derecha se muestran los mecanismos de las NP que sí la pueden atravesar. De la misma manera, se indican las diferentes interacciones que pueden producirse entre las NP internalizadas con la maquinaria celular y que pueden producir citotoxicidad.

Los efectos críticos derivados de la exposición pueden ocasionar lesiones premutagénicas e inestabilidad cromosómica, que no sólo resultará en un aumento de la mutagenicidad por una reparación propensa a errores, roturas de cadena físicas e iniciación de la carcinogénesis, sino que, si el material genético de los gametos se ve afectado, se pueden presentar consecuencias indeseables en la descendencia (Di Bucchianico et al., 2016; Doak et al., 2012).

El daño genético puede surgir a través de diferentes mecanismos: La genotoxicidad primaria directa requiere que los nanomateriales se ubiquen dentro del núcleo de la célula, interactuando directamente con el ADN y causándole algún tipo de daño físico. Por otro lado, la genotoxicidad primaria indirecta postula al estrés oxidativo como mecanismo clave para ejercer el daño. De este modo, consiguen inducir lesiones o interferir con la replicación del ADN y la división celular sin que el nanomaterial lo haga directamente (Evans et al., 2016; Petkovic et al., 2011). A pesar de ello, el principal mecanismo genotóxico observado en estos nanomateriales es la genotoxicidad secundaria, como resultado del ataque oxidativo al ADN por ROS provocado por los fagocitos activados ante la inflamación provocada por la presencia de NP (Magdalenova et al., 2014; Stone et al., 2009)

Actualmente, las pruebas que deben ser aplicadas para la aprobación regulatoria de los nanomateriales están destinadas a evaluar una serie concreta de daños al ADN o eventos de genotoxicidad: mutaciones puntuales, aneuploidías y aberraciones cromosómicas (Doak et al., 2012). Las directrices actuales incluyen, por ejemplo: mutagenicidad en bacterias (test de Ames; OECD 471), mutagenicidad en células de mamíferos *in vitro* (ensayo de timidina quinasa en células de linfoma de ratón; OCDE 476) y un test de aberraciones cromosómicas *in vivo* en células de mamíferos o un ensayo de micronúcleos (OCDE 473 o 487, respectivamente) (Magdalenova et al., 2014). Las directrices de las pruebas de genotoxicidad de nanomateriales siguen las indicaciones generales de la EFSA (Comité Científico de la EFSA, 2011) teniendo en cuenta las propiedades de los nanomateriales.

5.3 Caracterización físico-química

Como consecuencia de la variedad de formas y comportamientos que puede presentar incluso un mismo nanomaterial a la hora de realizar un estudio, la caracterización físico-química detallada y exhaustiva del material que se testa se convierte en un elemento clave de cualquier estrategia de cribado de toxicidad (Sayes y Warheit, 2009). Éste es un factor crítico para correlacionar las características de las nanopartículas con cualquier respuesta biológica o toxicológica evaluada. También resulta un factor de gran relevancia determinar el

comportamiento de las NP en condiciones similares a aquellas en las que se realizan los estudios de nanotoxicidad *in vitro* o *in vivo* (Ji et al., 2010).

La metodología utilizada para dicha caracterización es muy variada, incluyendo microscopía, espectroscopía y cromatografía, entre otras (Sayes y Warheit, 2009). Estas técnicas proporcionan valiosa información sobre las propiedades físicas (tamaño, forma y estado de agregación) y químicas (carga superficial, solubilidad, etc.) que sirven como requisitos previos para interpretar las respuestas biológicas y los mecanismos asociados a la exposición (Doyle, 2006; Dhawan y Sharma, 2010)

5.4 Captación celular

Comprender las interacciones de las NP con las células y cómo estas interacciones influyen en su internalización es esencial para realizar un buen estudio de toxicidad (Adjei et al., 2014). Sus localizaciones en diferentes compartimentos celulares pueden proporcionar algunas respuestas con respecto a su posible toxicidad (Buzea et al., 2007). Por ello, es esencial caracterizar cuantitativa y cualitativamente su captación y distribución dentro de la célula (Rivera-Gil et al., 2012).

En general, las NP captadas por las células se ha identificado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) o por medio de técnicas de imagen. Los métodos de citometría de flujo también se han postulado como una herramienta de gran utilidad, arrojando luz sobre la heterogeneidad de las interacciones célula-NP, mejorando la objetividad y el rigor estadístico a través del análisis de células individuales con alto rendimiento (Behzadi et al., 2017).

La citometría de flujo mide la dispersión óptica y la fluorescencia en muestras de células en suspensión al enfocarlas con un láser a través de un canal en el que las células solo pueden fluir en fila de una en una. Puede analizar individualmente alrededor de mil células por segundo.

La luz que se dispersa en la dirección de la trayectoria del láser se denomina luz de dispersión directa (FSC). Su intensidad es proporcional al tamaño de la célula. La luz de dispersión lateral (SSC) se mide en un ángulo de 90° y se correlaciona con la granularidad interna de las células. (Jochums et al., 2017). Las células que han internalizado NP dispersan más luz que las células sin NP, principalmente debido a las NP localizadas en el citoplasma (Zucker et al., 2010). Estas células pueden ser diferenciadas mediante citometría de flujo por sus propiedades únicas de FSC y SSC.

6. Planificación del estudio

6.1 Nanopartículas de dióxido de titanio

El titanio (Ti) pertenece al grupo de los elementos más abundantes en la Tierra (Shi et al., 2013). La producción anual mundial de polvo de titanio en 2005 se estimó en alrededor de 5 millones de toneladas³ (Skocaj et al., 2011). Los nanoprodutos de dióxido de titanio (TiO₂) se sintetizan como nanopartículas, nanobastones, nanohilos y nanotubos (Chen y Mao, 2007).

El TiO₂ se presenta en la naturaleza en tres fases cristalinas diferentes (anatasa, rutilo y brookita), pero sólo anatasa y rutilo poseen interés industrial. (Diebold, 2003). La anatasa es más químicamente reactiva y capaz de generar ROS, mientras que el rutilo es la forma más natural de TiO₂ y se dice que es químicamente inerte (Shi et al., 2013; Galletti, 2016).

Este compuesto fue elegido como objetivo de estudio en este trabajo debido a la gran expansión que ha experimentado el uso de las NP de óxido de titanio en los últimos años. Se cree que esto ha sido debido a la mayor actividad catalítica que presentan estas dimensiones en comparación con el TiO₂ en tamaño de partícula fina. Se ha potenciado tanto su presencia en numerosas industrias que, a día de hoy se encuentran entre los cinco tipos principales de NP presentes en productos de consumo, pinturas y preparados farmacéuticos (Mohammadi et al., 2015). Se utiliza comúnmente en composiciones antisépticas y antibacterianas gracias a sus actividades fotocatalíticas, que también han sido aprovechadas en la fabricación de materiales resistentes a los rayos ultravioleta (Verdier et al., 2014). Esta capacidad, combinada con sus propiedades blanqueantes han propiciado su uso en cosméticos como cremas de protección solar, cremas blanqueadoras, cremas hidratantes, leches para la piel, etc. (Kaida et al., 2004; Wolf et al., 2003); en la industria alimentaria para mejorar el aspecto de muchos alimentos, como colorante alimentario (E-171) (Weir et al., 2012; Natarajan et al., 2015) en la biomedicina como componente de medicamentos y productos farmacéuticos o, como componente de implantes protésicos, debido a su alta estabilidad y propiedades anticorrosivas (Diebold, 2003).

6.1.1 Toxicidad del TiO₂-NP

Hasta hace muy poco tiempo, a las NP de TiO₂ (TiO₂-NP) se les atribuía de forma genérica una baja toxicidad, considerándolas inertes para los organismos. Pero, tras varias investigaciones, en 2010 la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) las catalogó como posible carcinógeno humano dentro del grupo 2B (Shi et al., 2013). Las evidencias apuntan que la principal forma que presentan las TiO₂-NP de provocar daño celular y al ADN es por medio de la generación de especies ROS cuando se exponen a la radiación ultravioleta (Miller et al., 2012).

La ubicua presencia de estos compuestos, junto con la variedad de vías de exposición, pueden conducir a la disponibilidad sistémica de estas NP. Basándose en los productos que las contienen, las vías de exposición más comunes son la vía oral, dérmica, subcutánea, intravenosa y, por último, respiratoria. Los riesgos de exposición respiratoria son, por el contrario, particularmente elevados cuando se trata de exposición laboral (Shi et al., 2013).

Las incongruencias descritas relativas a la toxicidad de este compuesto parecen deberse a que la toxicidad de las TiO₂-NP está influenciada por una serie de factores, que abarcan desde las propiedades físicas y químicas propias de la partícula, hasta algunos factores definidos por las características del entorno experimental o los rasgos biológicos del organismo expuesto (Galletti, 2016).

En general, las TiO₂-NP pueden provocar citotoxicidad (Saqib et al., 2012), genotoxicidad (Prasad et al., 2014), estrés oxidativo (Miller et al., 2012), inflamación y apoptosis en diferentes líneas celulares (Shuckla et al., 2013).

6.1 Hepatotoxicidad

Se ha demostrado por medio de estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, que el uso de productos que contienen TiO₂-NP puede conducir a una exposición y acumulación a nivel crónico en varios órganos (Natarajan et al., 2015). Esto es gracias a que las TiO₂-NP pueden acceder a la circulación sanguínea y alcanzar varios tejidos. Según Shi et al. (2013), la acumulación de TiO₂-NP en los órganos se produce siguiendo el orden: hígado > riñones > bazo > pulmón > cerebro > corazón.

El hígado, posee un endotelio que se fenestra con poros de hasta 100nm, lo que permite el paso fácil de partículas a través de él. Además, en presencia de inflamación promovida por el aumento de ROS, la permeabilidad del endotelio aumenta todavía más. En ocasiones las NP son metabolizadas y eliminadas por él (Buzea et al., 2007). El Programa Internacional de Seguridad Química para TiO₂ en 1982, anunció que la mayoría del TiO₂ ingerido, ya sea intencionadamente, indirectamente a través de la cesión de NP procedentes de recipientes de comida o por ingestión secundaria de partículas inhaladas, se excreta con la orina. La eliminación de partículas del hígado a través de la bilis en las heces también es reconocida (Shi et al., 2013).

El hígado destaca por el papel desempeñado en el efecto de primer paso que experimentan muchos tóxicos o fármacos que ingresan en el organismo por vía oral. El primer paso hepático ocurre cuando el compuesto absorbido en el tracto gastrointestinal es metabolizado por enzimas en el hígado, de tal manera que una determinada proporción del agente activo no sale del hígado

y, por lo tanto, no alcanza la circulación sistémica (Gibaldi et al., 1971). Conjuntamente, el aumento en la contaminación ambiental y la ingestión involuntaria a través del agua, los alimentos o el contacto con los animales pueden también dar como resultado un mayor contacto y acumulación de NP en este órgano (Natarjara et al., 2015).

Así, el hígado se convierte en uno de los órganos de mayor riesgo ante el daño de estas partículas. Por ello, en este estudio se eligieron células pertenecientes a la línea hepática humana (HepG2) como modelo *in vitro* para estudiar la genotoxicidad debido a que otros autores ya habían demostrado que su sensibilidad las convertía en aptas para ser usadas para evaluar la seguridad de los nanomateriales (Prasad et al., 2014; Sharma, 2012).

6.2 Ensayo de micronúcleos

Este trabajo se centró en el estudio de la posible genotoxicidad ejercida por las TiO₂-NP en células hepáticas humanas *in vitro*. Para ello, se utilizó el ensayo de micronúcleos (MN) que permite la detección y evaluación de aberraciones cromosómicas, estructurales y numéricas.

La evaluación de MN ha surgido como uno de los métodos de elección para evaluar el daño cromosómico porque permite medir la pérdida y rotura cromosómica de manera fiable. Los MN, representan material genético que se pierde del genoma de la célula durante la mitosis (Martínez et al., 2005). Estos fragmentos se retrasan en anafase y no pueden viajar a los polos con el huso. En telofase, se forma una envoltura nuclear alrededor de estos cromosomas y fragmentos rezagados, provocando que cuando se desenrollan, asuman gradualmente la morfología de un núcleo interfásico con la excepción de que son más pequeños que los núcleos principales de la célula, de ahí el término "micronúcleo" (Figura 4). Pueden contener uno o varios fragmentos de cromosomas acéntricos (como resultado de un efecto clastogénico), uno o varios cromosomas completos (por interferencia del agente inductor con el aparato del huso mitótico, denominado efecto aneugénico), o incluso combinaciones de ambos. (Nüsse et al., 1994).

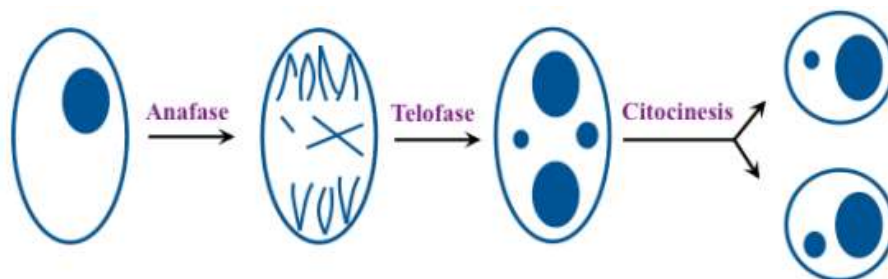


Figura 4: Proceso de formación de los micronúcleos (adaptada de Fenech, 2007). Los fragmentos de cromosoma o cromosomas completos retrasados en la anafase se rodean de envoltura nuclear en la telofase asumiendo la morfología de un micronúcleo.

La evaluación de MN generalmente se realiza por observación microscópica de las células. Debido a que éste es un procedimiento tedioso y lento (Roman et al., 1998), la citometría de flujo se ha postulado como una técnica poderosa para analizar rápidamente grandes cantidades de células. Permite analizar simultáneamente varios parámetros que facilitan la discriminación de aglomerados de NP, evitando así la errónea identificación de éstos como MN (Magdolenova et al., 2014; Laingam et al., 2008; Roman et al., 1998).

En este método se trata a las células con detergente, sales y un colorante fluorescente generalmente yoduro de propidio (PI), en un proceso de dos pasos. La membrana celular y el citoplasma se destruyen y se liberan núcleos y MN. Cada una de estas partículas, al ser excitadas por el láser, produce una señal que se registra por separado (Roman et al., 1998) No es necesario ningún tratamiento mecánico o pasos de centrifugación para obtener la solución de núcleos y micronúcleos lo que evita la posible presencia de desechos nucleares que en el dispositivo pudiesen superponerse a los MN pequeños en la medición (Nüsse et al., 1994).

Por todas estas ventajas, sumadas a la objetividad y rapidez de esta técnica, algunos autores proponen el conteo por citometría como una metodología fiable (Vallabani et al., 2014) y sensible a la hora de identificar la frecuencia de MN presentes en las células expuestas a diferentes tóxicos.

OBJETIVOS

En el siguiente trabajo se pretende estudiar el potencial genotóxico de las TiO₂-NP. Para ello, se llevará a cabo la caracterización físico-química de las NP, se evaluará su captación por parte de células hepáticas humanas de la línea HepG2 y la genotoxicidad que este nanomaterial ejerce en las mismas por medio del análisis de la frecuencia de MN tras la exposición durante 3, 6 y 24h a diferentes dosis. Así, los objetivos específicos que se plantearon son los siguientes:

1. Analizar las propiedades físico-químicas de las TiO₂-NP en suspensiones acuosas y en contacto con el medio de cultivo celular, y determinar las consecuencias de la interacción de las NP con las células, en términos de capacidad de penetración en el interior celular.
2. Evaluar los posibles efectos genotóxicos como consecuencia de la exposición de células hepáticas humanas a las TiO₂-NP mediante el análisis de la frecuencia de MN evaluados por medio de citometría de flujo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Nanopartículas

1.1 Preparación de las suspensiones

Para la realización del estudio de la posible toxicidad de las TiO₂-NP, se prepararon suspensiones del nanomaterial, que se encontraba en forma de polvo, a una concentración de 100µg/ml en medio de cultivo completo. Las NP utilizadas se correspondían con una mezcla que contenía las formas cristalinas anatasa y rutilo en proporción (80:20) (Degussa-Evonik).

Debido a que las NP presentan gran tendencia a la aglomeración tras la adición del medio de cultivo celular, antes de realizar su caracterización físico-química y cada ensayo experimental la suspensión que contenía las NP se dispersó mediante una sonda de ultrasonidos (Branson Sonifier, EE.UU.). Se sometieron a una potencia de 30W durante 5min (primero dos series de 1,5min con 1min de pausa entre ellas, y un último pulso de 2min) en un tubo de ensayo de plástico rodeado de hielo para amortiguar el calor generado por la sonicación.

Una vez se obtuvo la suspensión madre de TiO₂-NP de 100µg/ml, se prepararon las diluciones de trabajo necesarias para cada tratamiento.

1.2 Caracterización de las NP

Los ensayos de caracterización fueron realizados en el Departamento de Salud Ambiental del Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Oporto, Portugal), con cuyo grupo de investigación mantenemos una colaboración en la realización de estudios de nanotoxicología.

Para llevar a cabo la caracterización físico-química de las TiO₂-NP se estudió el tamaño hidrodinámico promedio, la distribución de tamaño y el potencial zeta, tanto en agua desionizada como en el medio de cultivo empleado, tal como se indica en las *“Recommendations of Nanomaterial Toxicity Screening Working Group”* (Oberdorster et al., 2005).

La determinación del tamaño promedio de partícula primaria de las dos formas cristalinas fue realizada y proporcionada por el fabricante. Se llevó a cabo mediante TEM. El tamaño, la distribución de tamaño y el potencial zeta se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y análisis de dispersión dinámica de la luz de modo mixto (M3-PALS), respectivamente, en un Zetasizer Nano-ZS, modelo ZEN3600 equipado con láser de 4,0mW, 633nm (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Las medidas se realizaron por duplicado empleando las NP en suspensión.

2. Cultivo celular

Las células utilizadas en el estudio fueron células hepáticas. Se eligieron las células HepG2 (línea celular inmortalizada de carcinoma hepatocelular humano, derivadas del tejido hepático de un varón caucásico de 15 años), que fueron obtenidas de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECCC, *European Collection of Cell Cultures*) (Figura 5). Son células adherentes de tipo epitelial que crecen como monocapa y en pequeños agregados, y que ya han sido utilizadas en estudios de toxicidad de nanomateriales por otros investigadores.

Las células HepG2 se cultivaron en frascos de 25cm² con medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS) y 1% solución de antibióticos y antimicóticos, todo de Invitrogen. Las células se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C y se realizaron pases cada 2-4 días (cuando la confluencia de los frascos era aproximadamente de 80-90%), tomando una pequeña cantidad de cultivo y diluyéndola en un volumen adecuado de medio fresco. Como estas células crecen adheridas a la superficie del frasco de cultivo, debieron ser previamente despegadas retirando el medio y añadiendo 1-2ml de tripsina 0,5g/l (Invitrogen) diluida con solución de tampón fosfato (PBS) a partes iguales.

Las células, que se mantienen criopreservadas en viales, necesitaron 3 semanas de crecimiento para eliminar el estrés propio del proceso de descongelación y que crecieran a ritmo normal, antes de poder utilizarlas para el estudio.

En este caso fue necesario obtener una buena densidad celular ya que para el análisis de MN se debe utilizar un cultivo celular de crecimiento exponencial, porque las células deben progresar a través del ciclo celular para que los MN puedan ser manifestados tras el tratamiento con el tóxico.

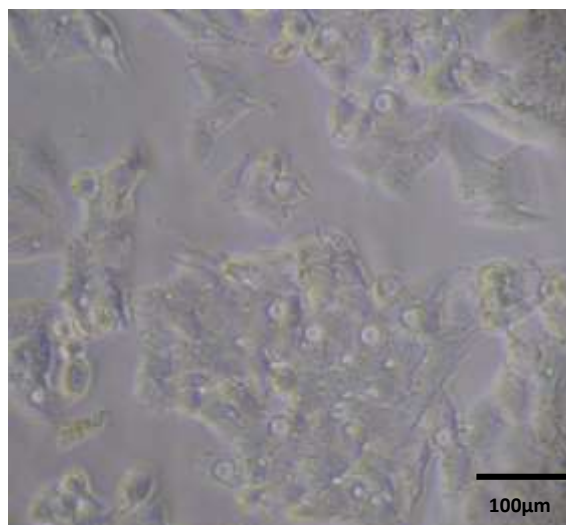


Figura 5: Células hepáticas HepG2 en cultivo.

3. Captación celular

Se evaluó el potencial de las TiO₂-NP para penetrar en las células HepG2 siguiendo el protocolo descrito por Suzuki et al. (2007).

Para ello, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Después de 24h de la siembra, las células se expusieron a TiO₂-NP (80, 120 y 150µg/ml) durante 3, 6 y 24h. Tras la exposición, se eliminó el medio de cultivo que contenía NP y las células se recogieron usando tripsina al 0,025%. Luego se centrifugaron a 250xg durante 5min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se volvió a suspender en 0,5ml de PBS. La proporción de células que habían incorporado NP se analizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). El análisis se llevó a cabo en función del tamaño y la complejidad intracelular de las células, midiendo el FSC y el SSC, respectivamente (Figura 6). Los datos se adquirieron de un mínimo de 20.000 eventos por muestra usando el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

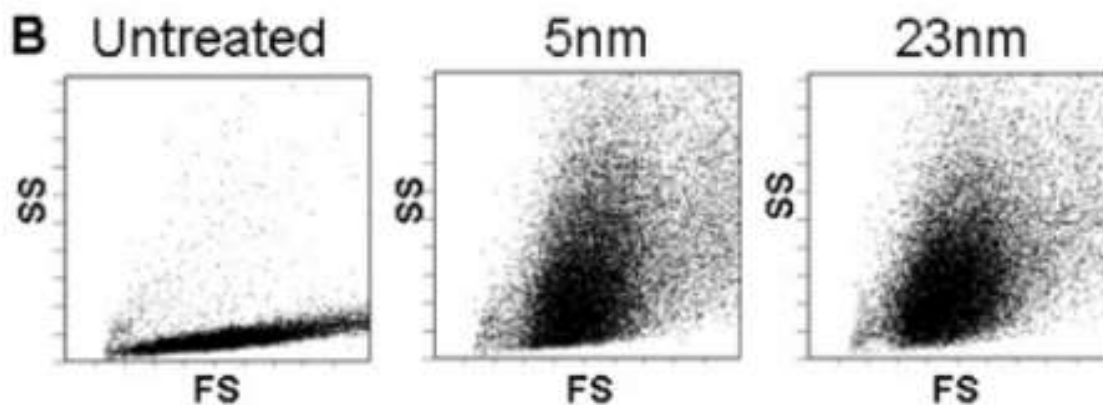


Figura 6: Diagramas de puntos mostrando las señales SSC y FSC de células control y expuestas a NP. Ejemplo de análisis de la captación celular llevado a cabo por citometría de flujo (adaptado de Suzuki et al., 2007). De izquierda a derecha se muestran células sin tratar, células tratadas con NP de 5nm y células tratadas con NP de 23nm. En el caso de las células expuestas, la captación de las NP se refleja en aumento en la dispersión lateral (SSC) de las poblaciones celulares.

4. Ensayo de micronúcleos

Debido a que el análisis de MN por citometría de flujo no había sido utilizado por otros autores previamente en estudios con células HepG2, tanto los tiempos de tratamiento como las dosis testadas requirieron de estandarización con el fin de adecuarlos a las características de la línea celular.

4.1 Tratamientos

Los cultivos celulares utilizados se establecieron según lo previamente descrito. Para la exposición de las células HepG2 a las TiO₂-NP una vez se alcanzó la confluencia adecuada en el frasco (80%), las células se transfirieron a una placa de 24 pocillos donde se llevó a cabo el tratamiento. Tras despegar las células con tripsina, como se ha descrito anteriormente, las células se sembraron a una densidad celular de aproximadamente 2×10^5 células/pocillo. Una vez dispuestas las células en la placa se incubaron durante 24h a 37°C para permitir su adhesión y, posteriormente se procedió a administrar los tratamientos.

Se realizaron tres réplicas del cultivo y en todos los casos se añadió la suspensión de TiO₂-NP a unas concentraciones finales de 10, 50, 100 y 200µg/ml, utilizando medio de cultivo fresco como control negativo y mitomicina C (MMC, 1,5µM 24h) como control positivo. Las células fueron incubadas a 37°C durante 3, 6 o 24h. Se realizaron dos réplicas de cada concentración para cada tratamiento.

4.2 Evaluación por citometría de flujo

La evaluación de la frecuencia de MN por citometría de flujo se realizó siguiendo los protocolos descritos por Nüsse et al. (1994) y Roman et al. (1998), con algunas modificaciones (Valdiglesias et al., 2011).

Después de la exposición predeterminada de las células a cada concentración de TiO₂-NP o a los controles, el medio de cultivo se eliminó y se repuso medio nuevo en el que se dejó crecer a las células durante otras 48h, que se corresponden con su tiempo de replicación, para permitir la expresión de las alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales en forma de MN. Al finalizar los cultivos, las células fueron preparadas para su análisis por citometría de flujo. Para ello se tripsinizaron y se suspendieron en PBS. Tras ello se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se añadieron 0,25ml de solución fría (4°C) compuesta por NaCl (10mM), citrato sódico (1g/l) y Nonidet P40 (0,3ml/l). También se añadieron a cada tubo 5µl de PI 50mg/ml y 1,25µl de RNasa A 0,1mg/ml, y se dejaron incubar durante 15min en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se añadió una segunda solución que contenía ácido cítrico (1,5mg/l) y sacarosa

(0,25M) y se incubó durante 30min. Por último, la suspensión se filtró a través de una malla de nylon de 50 μ m y se realizaron los análisis de citometría de flujo. Este procedimiento de dos etapas destruyó la membrana celular, de modo que la suspensión contenía núcleos y MN. Esta suspensión se analizó con un citómetro de flujo FACSCalibur (BectonDickinson). Los MN pudieron ser diferenciados en relación a su tamaño (canal FSC) e intensidad de señal de PI (canal FL2) siguiendo el protocolo de análisis descrito por Avlasevich et al. (2006) (Figura 7). Se evaluaron 50,000 eventos y el análisis de datos se realizó con el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

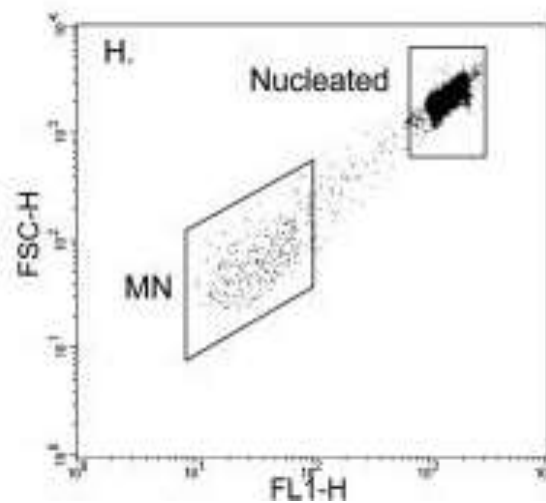


Figura 7: Análisis de MN por medio de citometría de flujo, mostrando las regiones en las que se localizan los MN y los núcleos (tomado de Avlasevich et al., 2006)

5. Análisis estadístico

Se realizó un mínimo de tres experimentos independientes para cada condición experimental testada, siempre por duplicado y bajo condiciones ciegas. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows (versión 21.0).

Los datos experimentales se expresaron como media \pm error estándar. Se comprobó mediante la prueba de bondad de ajuste de *Kolmogorov-Smirnov* que los datos no seguían una distribución normal, por lo que se consideraron las pruebas no paramétricas como las más adecuadas para el análisis estadístico de estos datos. Se empleó el análisis de *Kruskal-Wallis* para muestras independientes, que nos permitió, complementado con el test *U de Mann-Whitney* que compara los grupos dos a dos, establecer la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos realizados. La posible existencia de un patrón de correlación entre la dosis y la respuesta, se analizó mediante el test de *Spearman*. El valor de $P < 0.05$ se estableció como umbral de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de las NP

Para conseguir llevar a cabo una evaluación precisa de la toxicidad de un nanomaterial se requiere, además de una caracterización físico-química completa, una comprensión exhaustiva de las propiedades y el comportamiento de los nanomateriales en condiciones similares a las utilizadas en los estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo* (Ji et al., 2010).

En la Tabla 1, se recogen los resultados obtenidos en la caracterización de las TiO₂-NP utilizadas en el presente estudio. En ella se indican los valores obtenidos de: la proporción las distintas fases cristalinas de que se componen las NP utilizadas, el tamaño de partícula primario, el área superficial, el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta.

Tabla 1. Caracterización de las TiO₂-NP

NP	Fase cristalina	Tamaño de partícula (nm) ^a	Área superficial específica ^a (m ² /g)	Diámetro hidrodinámico (nm) (DLS) ^b		Potencial Zeta (mV) (DLS) ^b	
				Agua	Medio	Agua	Medio
TiO ₂	80% anatasa	25 (TEM)	35-45	Agua	Medio	Agua	Medio
	20% rutilo			160,5	228,3	-27,8	-10,7

TEM: Microscopio Electrónico de Transmisión, DLS: Dispersión dinámica de la luz

^a Datos proporcionados por la casa comercial ^b Datos proporcionados por el Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Portugal).

El tamaño de partícula primario fue analizado por TEM y proporcionado por el fabricante e indica un tamaño medio de 25nm. El área superficial específica, que también fue proporcionada por el fabricante, se correspondía con 35-45m²/g y la fase cristalina de las TiO₂-NP indicó una mezcla entre anatasa (80%) y rutilo (20%).

Del tamaño dependen la mayoría de características y comportamientos que presentan estas partículas en suspensión, como puede ser la capacidad de ser captadas por las células (Lu et al., 2009). Algunos autores sugieren que de él depende principalmente el tráfico a través de las membranas celulares, mostrando que NP con un tamaño menor de 40nm pueden entrar a las células e incluso les es posible migrar al núcleo e inducir genotoxicidad (Chen et al., 2014).

Sin embargo, los datos de TEM, que nos permiten conocer el tamaño de partícula en seco, no aportan la información suficiente para poder predecir el comportamiento que presentan las NP cuando se encuentran en contacto con un medio líquido como los medios de cultivo utilizados en el experimento. Por ello, resulta de gran utilidad calcular el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta que aportan datos complementarios. Estos dos parámetros fueron determinados

por medio de dispersión dinámica de la luz (DLS). Esta técnica ha sido propuesta por numerosos autores como una técnica útil para evaluar nanomateriales en suspensión. Se ha utilizado en numerosos estudios para analizar la estabilidad de la suspensión y la medición del tamaño de partícula en medio líquido (Murdock et al., 2008).

Comparados con las partículas a mayores escalas, las NP presentan, en general, una gran tendencia a aglomerarse. La aglomeración y la posterior sedimentación, generan problemas al considerar la toxicidad dependiente del tamaño y la dosis (Murdock et al., 2008; Teeguarden et al., 2006).

La formación de aglomerados se debe en parte a interacciones entre partículas conocidas como fuerzas de van der Waals. Aunque también, pueden formarse por un aumento de concentración de partículas en el disolvente o un cambio del pH o de la fuerza iónica del mismo (Handy et al., 2008).

La información obtenida sobre la funcionalidad de las NP suspendidas en suero, medios, tampones u otros fluidos biológicos puede ser diferente a la información adquirida en el agua. (Osman et al., 2010). En consecuencia, a la hora de realizar este estudio, se decidió analizar la tendencia a aglomerarse que seguía el compuesto tanto en agua desionizada como en el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las células hepáticas utilizadas como modelo.

Se cree que es posible que biomoléculas, como péptidos o proteínas, presentes en los medios de cultivo, sean adsorbidos por la superficie de la partícula, aumentando así su diámetro hidrodinámico y su tendencia a aglomerarse. Nuestros resultados corroboraron esta teoría ya que se observó un diámetro hemodinámico de 160,5nm en agua desionizada y 228,3nm en el medio de cultivo suplementado con suero, de elevado contenido en proteínas FBS.

A pesar de ello, el medio de cultivo suplementado con FBS ha sido postulado como uno de los solventes más dispersantes en las suspensiones con TiO₂-NPs (Ji et al., 2010). Este hecho parece encontrarse verificado en nuestros resultados, pues si comparamos la aglomeración obtenida, con la de otros estudios que han utilizado un tamaño de partícula semejante, pero en otros medios de cultivo diferentes, podemos observar que éstas presentan un nivel de aglomeración mayor (Bihari et al. 2008; Murdock et al., 2008; Tantra et al., 2010) expresado mediante un mayor tamaño hidrodinámico y un potencial Z más bajo.

El potencial zeta es un parámetro que ofrece información sobre la capacidad de agregación de las NP en función de su estabilidad coloidal. Un mayor valor de potencial zeta (tanto positivo como negativo) es resultado de mayores fuerzas de repulsión electrostática entre las partículas,

que se traducirán en mayores distancias de separación en suspensión, reduciendo así la aglomeración (Srivastava et al., 2013). Jiang et al. (2009) sugirieron que la estabilidad de la agregación influye también en su destino biológico, por lo que se cree que su modificación puede resultar útil para muchas aplicaciones, como la liberación del compuesto en la administración de fármacos o, de forma inversa, para facilitar la eliminación de partículas demasiado pequeñas en las aplicaciones de tratamiento de aguas.

Los datos obtenidos en nuestro estudio para este parámetro fueron $-27,8\text{mV}$ en agua desionizada y $-10,7\text{mV}$ en medio de cultivo. Es decir, la estabilidad que presentaban las NP en el medio de cultivo fue menor que la observada en agua.

Otros autores ya habían evidenciado la relación inversa entre el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta que se verifica en nuestros datos, observando que, con el aumento de tamaño de los aglomerados, los potenciales zeta netos de las suspensiones disminuían (Srivastava et al., 2013). Las NP se consideran estables en el solvente cuando presentan un potencial zeta de $\pm 30\text{mV}$. Nuestros datos en este trabajo, sobre todo en medio de cultivo, fueron menores que el umbral aceptable para la estabilidad ($\pm 30\text{mV}$), por lo que las $\text{TiO}_2\text{-NP}$ utilizadas mostraron tendencia a aglomerarse con el tiempo, a causa de su inestabilidad en el medio celular. En otros estudios que describen datos de caracterización similares como Shuckla et al. (2013) o Valdiglesias et al. (2013) se consideró que las NP elegidas eran adecuadas para realizar la evaluación. Además, mediante el análisis de los gráficos obtenidos para la distribución de tamaño de las NP en la solución (Figura 8), se pudo comprobar que las partículas mostraban una buena dispersión tanto en agua como en el medio de cultivo utilizado.

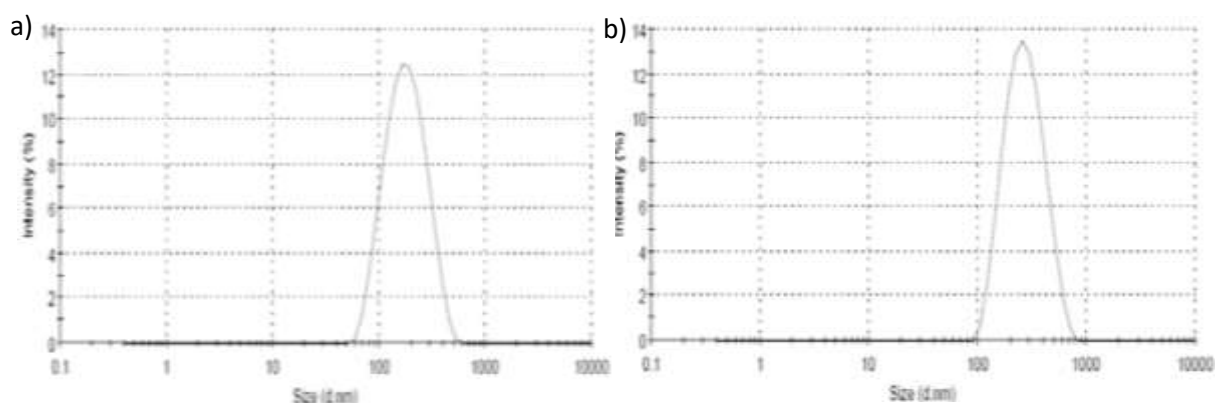


Figura 8: Gráfico de dispersión del tamaño las partículas en suspensión, obtenido por DLS en: a) agua desionizada y b) medio DMEM.

Diversos autores han apuntado que otro factor importante a tener en cuenta a la hora de realizar estudios de toxicidad de nanomateriales es la fase cristalina utilizada (Chen y taguachi, 2012), pues puede influir en el comportamiento de las NP, según las condiciones del estudio. Entre esta corriente de opinión, algunos apoyan que los aglomerados de anatasa tienden a ser de

mayor tamaño que los de rutilo (Di Bucchianico et al., 2016). Sin embargo, cuando ambas formas se encuentran juntas en suspensión, formando parte de una mezcla como la utilizada en este estudio, poseen la capacidad de formar agregados más grandes que los de anatasa sola, que también exhiben por lo general unos valores de potencial zeta más pequeños que las mezclas (Sygouni y Chrysikopoulos, 2015).

2. Captación celular

Uno de los aspectos importantes para evaluar el riesgo potencial de los nanomateriales es la observación y cuantificación de las NP que son capaces de penetrar en las células. La captación y localización de las NP son relevantes para la toxicidad (Marquis et al., 2009). Pese a ello, los estudios llevados a cabo hasta la fecha sobre la captación celular han brindado resultados muy contradictorios.

Como parte esencial de este estudio, se consideró necesario determinar si las NP testadas son capaces de entrar en las células hepáticas y en qué medida lo hacen o si, por el contrario, sólo interactúan con la membrana celular. Esta evaluación se llevó a cabo por medio de un análisis realizado mediante citometría de flujo, que se basó en la determinación del tamaño y la granularidad celular, según el protocolo de Suzuki et al. (2007).

Para cuantificar las células que habían internalizado NP se estudió el parámetro SCC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9, en la que se puede observar que la captación celular llevada a cabo por las células HepG2 fue progresiva, aumentando paulatinamente con la concentración y el tiempo de exposición testado.

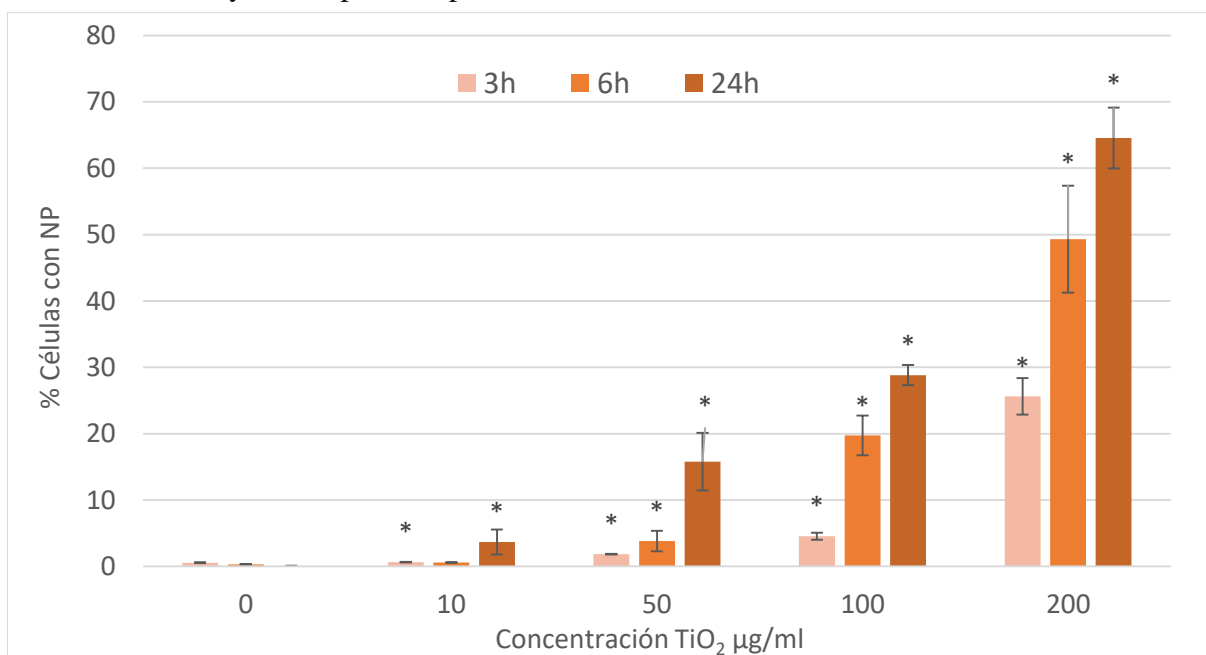


Figura 9: Resultados del análisis de captación celular de las TiO₂-NP. *P<0,05, diferencias significativas con respecto al control correspondiente.

El histograma evidencia el aumento en la intensidad media de SSC con el aumento de la dosis. Todas las dosis mostraron un aumento significativo respecto al control, excepto la dosis de 10µg/ml cuyo aumento a 6h de tratamiento no alcanzó la significación estadística. Esta dependencia fue verificada con los resultados del coeficiente de correlación de *Spearman* obtenido a partir de estos datos, observando un valor de $r=0,981$ para 3h de exposición, $r=0,942$ para 6h de exposición y $r=0,975$ para 24h de exposición; todas las correlaciones presentaron un valor de significación de $P<0,01$. De la misma manera, se pudo observar un aumento de la captación dentro de cada una de las dosis en función del tiempo de exposición.

El hígado, presenta un endotelio con poros de hasta 100nm, lo que permite el paso de grandes moléculas desde el endotelio a las células parenquimatosas subyacentes (Garnett & Kallinteri, 2006). Se ha mostrado que las células hepáticas son los lugares predilectos donde pueden depositarse en el organismo las NP captadas por diferentes vías (Meena y Paulraj et al., 2012). Y de la misma manera que en nuestro estudio, los resultados obtenidos evidenciaron que esta presencia de partículas aumenta significativamente ante dosis mayores (Zucker et al., 2010). Este resultado ha sido comprobado y corroborado tanto con células de otros tipos celulares (Alluoini et al., 2012), como con las propias HepG2 en condiciones experimentales diferentes, ya que, se ha probado que la unión celular y los datos de captación (medidos por SSC) dependen también de otros factores como el tipo de partícula, la concentración y el tiempo (Lankoff, et al., 2012; Jochums et al., 2017).

Respecto al factor tiempo de exposición, los resultados de Suckla et al. (2013) concuerdan con los del presente trabajo. También ellos observaron un aumento significativo en la internalización celular de las TiO₂-NP después de una exposición prolongada, evidenciado por el aumento en la intensidad de dispersión lateral (granularidad) de las células tratadas a los mayores tiempos de exposición.

Una de las mayores preocupaciones de la nanotoxicología es, como se ha comentado, que las partículas más pequeñas pueden ser más tóxicas para los humanos porque pueden transportarse más fácilmente a través de las membranas celulares (Oberdörster et al., 2005), hecho que ha sido probado de manera generalizada (Andersson et al., 2011; Lu et al., 2009). De hecho, varios estudios han corroborado que nanopartículas de tamaño semejante al nuestro pueden ser internalizadas por las células HepG2 (Lankoff et al., 2012; Shuckla et al., 2013).

El resultado de la captación también puede relacionarse con la maquinaria endocítica-exocítica específica o los procesos de fagocitosis y no fagocitosis de cada tipo celular. Por un lado, las células HepG2 no pueden internalizar sustancias por endocitosis dependiente de caveolas

porque carecen de la proteína, por lo que presentarán resistencia ante la captación de algunas NP que se internalicen por esta vía (Kou et al., 2013). Sin embargo, por otro lado, las células HepG2 no utilizan generalmente, mecanismos fagocíticos para la eliminación de partículas pequeñas (Zhang et al., 2016; Lankoff et al., 2012). Por lo tanto, se supone que existe una mayor exposición de éstas a ciertas sustancias, que puede explicarse por el hecho de que las nanopartículas no se eliminan rápidamente por esta vía. Su persistencia en el interior celular, puede favorecer la aparición de efectos citotóxicos (Lankoff et al., 2012). En este aspecto, puede ser relevante el factor tamaño de partícula o sus agregados, ya que los fagocitos generalmente eliminan la materia particulada $>500\text{nm}$; por consiguiente, tampoco podrán fagocitar las partículas más pequeñas, quedando estas retenidas en el tejido ejerciendo una carga sostenida y una exposición prolongada. Como prueba de ello, Skocaj et al. (2011) encontraron agregados unidos a la membrana ($> 200\text{nm}$) que tal vez no pudieron atravesar los poros. Sin embargo, sí que observaron agregados más pequeños dentro del citoplasma de eritrocitos que se correspondían con los tamaños de nuestras nanopartículas y que no habían sido eliminados.

Por tanto, generalmente se observa que partículas del mismo tamaño pero con mayor diámetro hidrodinámico, que refleja un mayor grado de aglomeración, tienen el mayor grado de asociación celular (tanto en forma de partículas unidas a la membrana celular como de partículas internalizadas). Esto también podría explicarse por el hecho de que las células entran en contacto más rápido y durante más tiempo con aglomerados más grandes que sedimentan primero (Allouni et al., 2009).

En estudios de citotoxicidad previos se demostró que la fase cristalográfica juega un papel crucial (Andersson et al., 2011; Sayes et al., 2006; Warheit et al., 2006). Se descubrió que la fase cristalina anatasa es más tóxica y genera una mayor cantidad de ROS que una muestra de NP de TiO_2 de fase rutilo equivalente (Sayes et al., 2006). Este resultado se atribuyó a un aumento de la captación celular de las NP de anatasa sola o de las mezclas en las que el contenido de anatasa es predominante, en comparación con las nanopartículas de rutilo solo (Allouni et al., 2012; Valdiglesias et al., 2013; Di Bucchianico et al., 2016). Estos hallazgos indican un efecto sinérgico entre anatasa y el rutilo en fases mixtas que ha sido probado (Li et al., 2010). Se debe básicamente, a que esta mezcla conduce a una mayor reactividad y, a su vez, a un mayor potencial de adsorción de proteínas séricas que potencia las interacciones electrostáticas entre las partículas y las células y favorece la internalización por diferentes rutas (Murdock et al., 2008). Este dato podría explicar por qué la mezcla utilizada en este estudio con 80% de la fase anatasa fue altamente interiorizada.

3. Ensayo de micronúcleos

El ensayo de MN evalúa roturas o pérdida de cromosomas. Un aumento en la frecuencia de células micronucleadas es una indicación de daño cromosómico inducido (Chen et al., 2014). La citometría de flujo constituye un método capaz de evaluar la frecuencia de MN en un conjunto celular de una manera rápida, sencilla y fiable (Di Bucchianico et al., 2016).

Para nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que analiza la frecuencia de MN inducida por TiO₂-NP en células hepáticas utilizando la evaluación por citometría de flujo. Debido a que esta técnica no había sido previamente empleada en nuestro laboratorio en el tipo celular HepG2, parte de este trabajo consistió en la optimización de la técnica para su aplicación en estas células.

Los resultados obtenidos en el ensayo de MN evaluado por citometría de flujo se muestran en la siguiente gráfica (Figura 10). No se obtuvieron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones testadas, en ninguno de los tiempos evaluados.

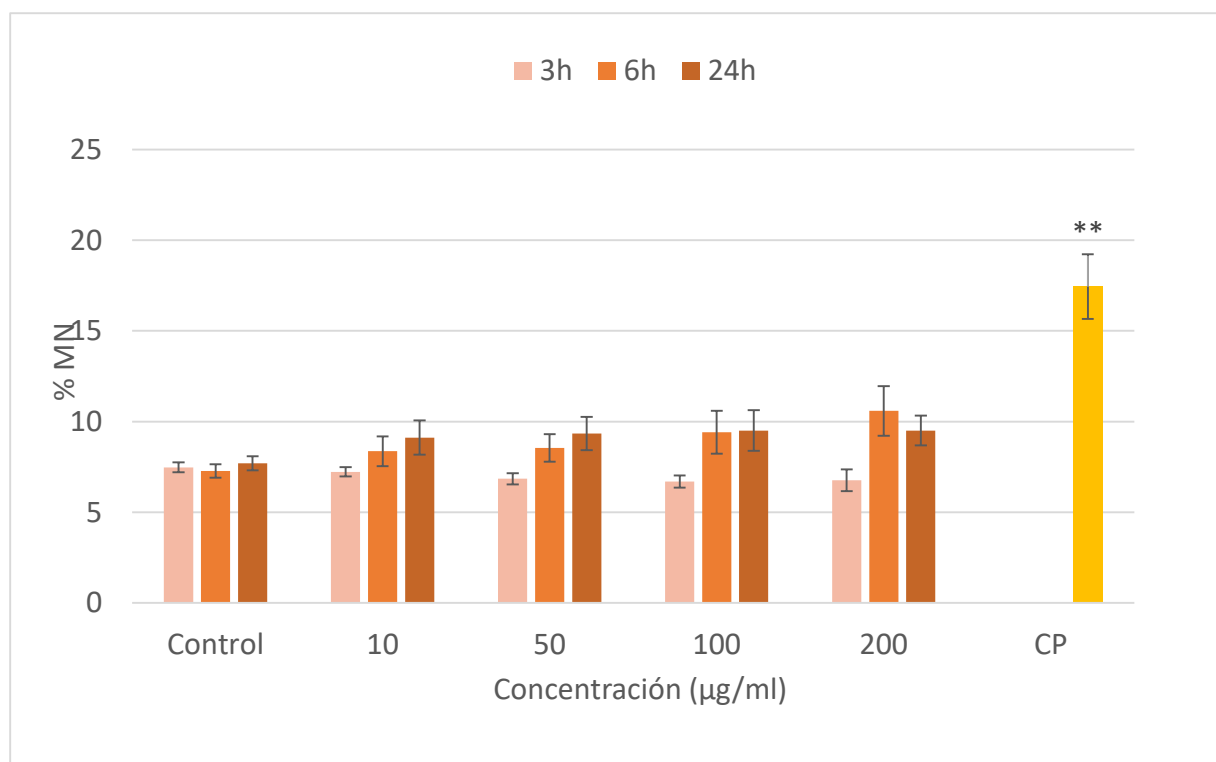


Figura 10: Resultados del test de MN en células HepG tratadas con TiO₂-NP. **P<0,01, diferencias significativas con respecto al control negativo. CP: control positivo.

Las correlaciones entre dosis y respuesta tampoco fueron significativas, según el test de *Spearman*. Todas las dosis testadas indujeron daños mayores entre las 6 y 24h de exposición, excepto los tratamientos de 3h que se mantuvieron prácticamente en el nivel del control negativo en todos los casos.

En nuestro estudio, al igual que en Linnainmaa et al. (1997), no se ha demostrado que el TiO₂ a nanoescala sea capaz de causar hepatotoxicidad a nivel del material. Puesto que no ha habido un aumento evidenciable de MN, no podemos afirmar que esta sustancia sea capaz de inducir daños ya sean de tipo aneugénico (fallo en la fijación del huso al cinetocoro, impidiendo la segregación de cromosomas) o clastogénico (daño estructural en los cromosomas, que implique roturas de cadena dobles) (Catalán et al., 2017), en estas condiciones.

Entre las investigaciones que utilizaron como modelo experimental la misma línea celular que el presente estudio, los resultados obtenidos fueron muy variopintos. En general, tampoco mostraron una asociación notable entre la dosis y la respuesta. Vallabani et al. (2014) encontraron un aumento significativo en el número de células HepG2 micronucleadas expuestas a 20µg/ml; sin embargo, a dosis mayores (40 y 80µg/ml) la formación de micronúcleos disminuyó. Por otra parte, Shuckla et al. (2013) sí que observaron que la frecuencia de micronúcleos en células HepG2 tratadas con bajas dosis de TiO₂-NP (30-70 µg/ml), se incrementaron de una manera dependiente de la dosis.

En otro estudio donde se analizó la capacidad de este nanomaterial de inducir MN en las células HepG2 según el medio de cultivo utilizado (suplementado con albúmina de suero bovino [BSA] o FBS), se describió un significativo aumento de MN, utilizando NP de un tamaño muy similar al de las utilizadas en este trabajo (27nm), a la dosis de 50µg/ml en ambos medios, más significativo en el medio que contenía mayor cantidad de proteína (medio DMEM suplementado con 10% de FBS). Por ello hipotizaron, que la cantidad de proteína del medio, favorecía la frecuencia de MN debido a una superior aglomeración (Prasad et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados para esta misma dosis, en medio DMEM que también posee 10% de FBS no fueron significativos. Por ello se debe aceptar que otras condiciones deben intervenir en la aparición de estas diferencias.

Diversos estudios han mostrado que las TiO₂-NP causan genotoxicidad provocando daño al ADN y formación de MN. A pesar de ello, son todavía demasiado escasos como para poder concluir cuáles son las dosis y los tiempos de exposición que pueden suponer mayor riesgo. En otras ocasiones, utilizando otras líneas celulares diferentes, se han obtenido también resultados positivos del ensayo de MN, que muestran la capacidad de las TiO₂-NP para producir daño *in vitro*. Entre ellos cabe destacar estudios que describieron la inducción de MN en: células de ovario de hámster chino (CHO-K1) usando TiO₂-NP con 80% de anatasa-20% de rutilo (Di Virgilio et al., 2010); linfocitos humanos usando anatasa pura y mezcla de 86% anatasa y 14% rutilo (Tavares et al., 2014); células epiteliales BEAS 2B tratadas con 99.7% de anatasa y 99,9% de rutilo (Falck et al., 2009); en keratinocitos HaCaT usando 80% anatasa y 30% rutilo

(Jaeger et al., 2012) y en células epiteliales pulmonares humanas A431 y A549 usando anatasa pura (Srivastava et al., 2013). También en estos estudios los rangos de respuestas fueron muy variables, evidenciando grandes diferencias en la intensidad con la que el compuesto ejerce genotoxicidad. Muchos autores lo justifican apuntando que las inconsistencias detectadas no solo dependen de la línea celular testada sino, como ya se ha comentado, que podrían ser provocadas por las características propias de la partícula testada y su comportamiento en suspensión. Entre estas características puede influir la forma, la fase cristalina o el estado de aglomeración que estas partículas presentan en el medio elegido (Ji et al., 2010).

Así, muchos han destacado que la forma anatasa de las NP de TiO_2 puede causar mayor daño en el ADN que las dosis equivalentes de la forma rutilo. Chen y taguachi., (2012) relacionaron este dato con la mayor actividad fotocatalítica que presenta la forma anatasa. Aun así, otros autores defienden que la diferencia observada entre las fases se deba en realidad a una cuestión de tamaño pues mostraron que las nanopartículas de TiO_2 de anatasa de hasta 20nm, inducen un aumento en la formación de micronúcleos, mientras que el de anatasa de 200nm o el TiO_2 de rutilo de 200nm no lo provocan (Gurr et al., 2005).

Otro hecho que posiblemente afecte a la diferente respuesta que causa cada fase cristalina puede ser el tiempo que tarda en ejercer toxicidad. En nuestro estudio, todas las concentraciones testadas durante 3h se mantuvieron en línea con el control negativo, lo que podría indicar que existe un umbral de tiempo para que las TiO_2 -NP puedan inducir MN. Sin embargo, en el estudio de Oshman et al. (2010), en el que en lugar de utilizar una mezcla trataron las células con anatasa pura al 99%, se observó que a las 2h ya existía respuesta, detectándose un aumento significativo en las células micronucleadas.

Las evidencias aportadas por los defensores de que la variable determinante es la aglomeración de las NP en suspensión, mostraron que las TiO_2 -NP que forman aglomerados grandes inducen daño en el ADN en diferentes líneas celulares, mientras que las NP que forman aglomerados más pequeños no tuvieron efecto sobre la genotoxicidad (Chen et al., 2014). Sin embargo, Lankoff et al. (2012) describieron que las TiO_2 -NP forman aglomerados de diversos tamaños según el protocolo de tratamiento, presentando los aglomerados más pequeños mayor captación y toxicidad celular que los aglomerados más grandes.

Otras investigaciones se han encargado de testar la genotoxicidad de este nanomaterial *in vivo*. Normalmente estos estudios utilizaron roedores como modelo animal y tampoco se observa un consenso sobre la genotoxicidad de las TiO_2 -NP en los resultados. Como ejemplos podemos destacar: Relier et al. (2017) que testaron la genotoxicidad ejercida en ratas tras su inhalación

por medio del análisis de MN a las células sanguíneas extraídas de los animales observando que inmediatamente después de la exposición los resultados de genotoxicidad fueron negativos; Meena y Paulraj. (2012) observaron la genotoxicidad ejercida en eritrocitos de ratas Wistar tras la ingestión de TiO₂-NP por medio de una dieta suplementada con las NP que, en este caso, sí que produjo un aumento de MN.

También ha sido comprobada la toxicidad en organismos marinos, como consecuencia del gran riesgo de exposición ambiental al que se enfrentan, a causa de las grandes cantidades de TiO₂-NP presentes en el ecosistema provenientes de los residuos de su uso y fabricación. En la revisión realizada por (Minetto et al., 2014) donde se muestran los resultados de toxicidad realizadas a diversos organismos marinos, se ha confirmado que estos contaminantes causan respuestas genotóxicas como fragmentación cromosómica o roturas de cadena de ADN, y que la genotoxicidad, en este caso, depende de las propiedades físico-químicas inherentes a las propias TiO₂-NP o de la presencia de co-contaminantes (Mahaye et al., 2017).

La interacción entre varios tóxicos presentes en un entorno puede dar lugar a efectos acumulativos o sinérgicos (Dar et al., 2016). Una evidencia derivada de esta situación ha surgido a partir de una de las aplicaciones del óxido de titanio nanoparticulado. Gracias a las habilidades fotocatalíticas que posee, el TiO₂-NP se utiliza en la depuración de aguas para eliminar el diclorodifeniltricloroetano (DDT), un pesticida organoclorado muy contaminante y altamente persistente. Un estudio realizado por Shi et al. (2010), mostró que se produce un efecto sinérgico en la toxicidad que estos compuestos provocan por separado cuando ambos se encuentran juntos en el medio. La adsorción efectiva de otros compuestos por las TiO₂-NP puede aumentar significativamente el nivel de exposición *in vivo* de los mismos. Este resultado fue considerado como relevante para este estudio ya que el hígado es el órgano diana de la exposición al DDT y las TiO₂-NP.

Respecto a los resultados de hepatotoxicidad que han surgido de esta y otras investigaciones, la mayoría de los autores coinciden en que el TiO₂ es capaz de causar toxicidad hepática tras la exposición, y que estos daños son mayores ante la forma nanoparticulada que con la forma de TiO₂ en partícula fina (Wang et al., 2007).

Diversos autores han intentado identificar el mecanismo por el cual las TiO₂-NP provocan efectos genotóxicos, y se ha llegado a varias conclusiones. Por ejemplo, Li et al. (2010) afirman que la forma anatasa podría acumularse en el ADN hepático insertándose entre las pares de bases de ADN o uniéndose a los nucleótidos. Sin embargo, numerosos indicios apuntan que el mecanismo por el cual una vez dentro del hígado ejercen genotoxicidad es por medio de un

aumento de ROS. Como ejemplo, en el estudio de Petkovic et al. (2011) se determinaron efectos citotóxicos y genotóxicos mediados por el estrés oxidativo, observando que la exposición a TiO₂-NP a una concentración de 250µg/ml eleva al doble los niveles de ROS, que provocó daños en el ADN en células HepG2, evidenciados mediante el ensayo del cometa. Shuckla et al. (2013), apoyaron esta hipótesis demostrando, que el estrés oxidativo inducido por las TiO₂-NP desencadena el daño del ADN, lo que inicia la expresión de proteínas apoptóticas que resultan en daño hepático. Otros autores han apoyado asimismo esta propuesta añadiendo que, en las células donde las ROS inducen daño oxidativo del ADN, se han observado otras consecuencias relacionadas entre las que destacan el aumento de la producción de ROS intracelulares y la regulación positiva de la expresión del ARN mensajero de genes sensibles al daño del ADN (*p53*, *p21*, *gadd45*) (Petkovic et al., 2011).

A pesar de todas estas suposiciones, la información existente hasta la fecha sobre la hepatotoxicidad producida por las TiO₂-NP no es suficiente para establecer unos estándares de seguridad adecuados, por lo que se debe seguir estudiando este compuesto para poder establecer los límites de seguridad tan pronto como sea posible.

CONCLUSIONES

Al igual que para muchos otros nanomateriales, se han observado resultados controvertidos sobre la genotoxicidad de las TiO₂-NP. Se ha llevado a cabo una gran cantidad de estudios, y una parte de ellos ha detectado respuestas positivas. Sin embargo, sigue habiendo notables controversias respecto a su genotoxicidad. Los resultados contradictorios obtenidos en varios estudios podrían deberse a diferencias en las características de las nanopartículas testadas, como el tamaño, la estructura cristalina o la tendencia a formar aglomerados. Estas diferencias resultan más acentuadas al comparar los efectos entre diversas líneas celulares, por lo que también el tipo celular utilizado puede influir sobre los resultados. En este estudio se llevó a cabo la caracterización de TiO₂-NP compuestas por una mezcla de las fases cristalinas anatasa y rutilo, en donde se comprobó que estas NP presentan una mayor tendencia a la aglomeración y una menor estabilidad en medio de cultivo DMEM que en agua desionizada. Una vez caracterizadas y comprobada la obtención de una buena dispersión en el medio de cultivo, se determinó la captación de las NP por las células HepG2 y se analizó la capacidad de estas partículas para inducir alteraciones cromosómicas por medio del ensayo de MN. A partir de los resultados experimentales obtenidos, así como de su análisis y discusión, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Las TiO₂-NP son capaces de penetrar en las células hepáticas de una forma directamente dependiente de la dosis y el tiempo de exposición.
- Las TiO₂-NP no indujeron genotoxicidad en las condiciones testadas, ya que no se observó aumento significativo de la frecuencia de MN en las células HepG2 tras la exposición a diferentes concentraciones durante 3, 6 o 24h.

BIBLIOGRAFÍA

- Adjei, I. M., Sharma, B., & Labhasetwar, V. (2014). Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. In D.G. Capco, Y. Chen (Eds.), *Nanomaterial*, Springer, Netherlands (2014), pp. 73-91
- Allouni, Z. E., Cimpan, M. R., Høl, P. J., Skodvin, T., & Gjerdet, N. R. (2009). Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), 83-87.
- Allouni, Z. E., Høl, P. J., Cauqui, M. A., Gjerdet, N. R., & Cimpan, M. R. (2012). Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO₂ nanoparticles by fibroblasts. *Toxicology In Vitro*, 26(3), 469-479.
- Andersson, P. O., Lejon, C., Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C., Ahlinder, L., Bucht, A., & Österlund, L. (2011). Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of TiO₂ nanoparticles in living lung epithelial cells. *Small*, 7(4), 514-523.
- Avlasevich, S. L., Bryce, S. M., Cairns, S. E., & Dertinger, S. D. (2006). In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environmental and molecular mutagenesis*, 47(1), 56-66.
- Bailon-Moscoso, N., & Romero-Benavides, J. C. (2016). Genotoxicidad de los nanomateriales, grandes discrepancias y desafíos. *Revista de Toxicología*, 33(1), 8-15
- Batley, G. E., Kirby, J. K., & McLaughlin, M. J. (2012). Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 854-862.
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., ... & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218-4244.
- Bhatia, S. (2016). Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In *Natural polymer drug delivery systems* (pp. 33-93). Springer, Cham.
- Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., ... & Krombach, F. (2008). Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle and fibre toxicology*, 5(1), 14.
- Borm, P. J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., ... & Krutmann, J. (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and fibre toxicology*, 3(1), 11.
- Boyes, W. K., Thornton, B. L. M., Al-Abed, S. R., Andersen, C. P., Bouchard, D. C., Burgess, R. M., ... & Reichman, J. R. (2017). A comprehensive framework for evaluating the environmental health and safety implications of engineered nanomaterials. *Critical reviews in toxicology*, 47(9), 771-814.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- Catalán, J., Stockmann-Juvala, H., & Norppa, H. (2017). A theoretical approach for a weighted assessment of the mutagenic potential of nanomaterials. *Nanotoxicology*, 11(8), 964-977.

- Chen, P., & Taniguchi, A. (2012). Detection of DNA damage response caused by different forms of titanium dioxide nanoparticles using sensor cells. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 3(05).
- Chen, T., Yan, J., & Li, Y. (2014). Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of food and drug analysis*, 22(1), 95-104.
- Chen, X., & Mao, S. S. (2007). Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chemical reviews*, 107(7), 2891-2959.
- Christian, P. (2009). Nanomaterials: properties, preparation and applications. *Environmental and human health impacts of nanotechnology*, 31-77.
- Dar, S. A., Yousuf, A. R., & Balkhi, M. H. (2016). An introduction about genotoxicology methods as tools for monitoring aquatic ecosystem: present status and future perspectives. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 7(1), 1-11.
- de Melo Reis, É., de Rezende, A. A. A., de Oliveira, P. F., Nicolella, H. D., Tavares, D. C., Silva, A. C. A., ... & Spanó, M. A. (2016). Evaluation of titanium dioxide nanocrystal-induced genotoxicity by the cytokinesis-block micronucleus assay and the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 309-319.
- Deng, J., & Gao, C. (2016). Recent advances in interactions of designed nanoparticles and cells with respect to cellular uptake, intracellular fate, degradation and cytotoxicity. *Nanotechnology*, 27(41), 412002.
- Dhawan, A., & Sharma, V. (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(2), 589-605.
- Di Bucchianico, S., Cappellini, F., Le Bihanic, F., Zhang, Y., Dreij, K., & Karlsson, H. L. (2016). Genotoxicity of TiO₂ nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*, 32(1), 127-137.
- Di Virgilio, A. L., Reigosa, M., Arnal, P. M., & De Mele, M. F. L. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 711-718.
- Diebold, U. (2003). The surface science of titanium dioxide. *Surface science reports*, 48(5-8), 53-229.
- Doak, S. H., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., & Singh, N. (2012). In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1), 104-111.
- Donaldson, K., & Poland, C. A. (2013). Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. *Current opinion in biotechnology*, 24(4), 724-734.
- Doyle, M. E. (2006). Nanotechnology: a brief literature review. Food Research Institute, UW-Madison.
- EFSA Scientific Committee. (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9(9), 2379.

- Evans, S. J., Clift, M. J., Singh, N., de Oliveira Mallia, J., Burgum, M., Wills, J. W., ... & Doak, S. H. (2016). Critical review of the current and future challenges associated with advanced in vitro systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis*, 32(1), 233-241.
- Falck, G. C. M., Lindberg, H. K., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalan, J., ... & Norppa, H. (2009). Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Human & experimental toxicology*, 28(6-7), 339-352.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084.
- Galletti, A. (2016). Toxicity Evaluation of TiO₂ Nanoparticles Embedded in Consumer Products.
- Garnett, M. C., & Kallinteri, P. (2006). Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occupational Medicine*, 56(5), 307-311.
- Gibaldi, M., Boyes, R. N., & Feldman, S. (1971). Influence of first-pass effect on availability of drugs on oral administration. *Journal of pharmaceutical sciences*, 60(9), 1338-1340.
- Gurr, J. R., Wang, A. S., Chen, C. H., & Jan, K. Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213(1-2), 66-73.
- Handy, R. D., Owen, R., & Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5), 315-325.
- Inshakova, E., & Inshakov, O. (2017). World market for nanomaterials: structure and trends. In MATEC Web of Conferences (Vol. 129, p. 02013). EDP Sciences.
- Jaeger, A., Weiss, D. G., Jonas, L., & Kriehuber, R. (2012). Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology*, 296(1-3), 27-36.
- Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., ... & Nel, A. E. (2010). Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. *Environmental science & technology*, 44(19), 7309-7314.
- Jiang, J., Oberdörster, G., & Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), 77-89.
- Jochums, A., Friehs, E., Sambale, F., Lavrentieva, A., Bahnemann, D., & Scheper, T. (2017). Revelation of different nanoparticle-uptake behavior in two standard cell lines NIH/3T3 and A549 by flow cytometry and time-lapse imaging. *Toxics*, 5(3), 15.
- Kaida, T., Kobayashi, K., Adachi, M., and Suzuki, F. (2004). Optical characteristics of titanium oxide interference film and the film laminated with oxides and their applications for cosmetics. *Journal of Cosmetic Science*, 55, 219-220.
- Khan, M., Naqvi, A. H., & Ahmad, M. (2015). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology reports*, 2, 765-774.

- Kolarova, H., KaterinaTomankova, M. H., Horakova, J., Malohlava, J., Cenklova, V., Bajgar, R., ... & Jirova, D. (2015). Cell Uptake of Titanium Dioxide Nanoparticles.
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., & He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1-10.
- Kumar, V., Dasgupta, N., & Ranjan, S. (Eds.). (2018). Environmental Toxicity of Nanomaterials. CRC Press.
- Laingam, S., Froschio, S. M., & Humpage, A. R. (2008). Flow-cytometric analysis of in vitro micronucleus formation: comparative studies with WIL2-NS human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 656(1), 19-26.
- Lankoff, A., Sandberg, W. J., Wegierek-Ciuk, A., Lisowska, H., Refsnes, M., Sartowska, B., ... & Kruszewski, M. (2012). The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicology letters*, 208(3), 197-213.
- Li, N., Ma, L., Wang, J., Zheng, L., Liu, J., Duan, Y., ... & Hong, F. (2010). Interaction between nano-anatase TiO₂ and liver DNA from mice in vivo. *Nanoscale research letters*, 5(1), 108.
- Linnainmaa, K., Kivipensas, P., & Vainio, H. (1997). Toxicity and cytogenetic studies of ultrafine titanium dioxide in cultured rat liver epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 11(4), 329-335.
- Lu, F., Wu, S. H., Hung, Y., & Mou, C. Y. (2009). Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*, 5(12), 1408-1413.
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., & Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233-278.
- Mahaye, N., Thwala, M., Cowan, D. A., & Musee, N. (2017). Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 134-160.
- Market, V. F. (2016). Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2017-2023 .
- Marquis, B.J., Love, S.A., Braun, K.L., Haynes, C.L., 2009. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* 134, 425–439.
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J. P., Gebel, T. W., ... & Marcos, R. (2005). Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicology letters*, 155(2), 319-327.
- Meena, R., & Paulraj, R. (2012). Oxidative stress mediated cytotoxicity of TiO₂ nano anatase in liver and kidney of Wistar rat. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94(1), 146-163.
- Miller, R. J., Bennett, S., Keller, A. A., Pease, S., & Lenihan, H. S. (2012). TiO₂ nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton. *PloS one*, 7(1), e30321.
- Minetto, D., Libralato, G., & Ghirardini, A. V. (2014). Ecotoxicity of engineered TiO₂ nanoparticles to saltwater organisms: an overview. *Environment international*, 66, 18-27.

- Mohammadi, F., Sadeghi, L., Mohammadi, A., Tanwir, F., Yousefi, V. B., & Izadnejad, M. (2015). The effects of Nano titanium dioxide (TiO₂NPs) on lung tissue. *Bratislavske lekarske listy*, 116(6), 363-367.
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological sciences*, 101(2), 239-253.
- Natarajan, V., Wilson, C. L., Hayward, S. L., & Kidambi, S. (2015). Titanium dioxide nanoparticles trigger loss of function and perturbation of mitochondrial dynamics in primary hepatocytes. *PLoS one*, 10(8), e0134541.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *science*, 311(5761), 622-627.
- Nüsse, M., Beisker, W., Kramer, J., Miller, B. M., Schreiber, G. A., Viaggi, S., ... & Wessels, J. M. (1994). Measurement of micronuclei by flow cytometry. In *Methods in cell biology* (Vol. 42, pp. 149-158). *Academic Press*.
- Oberdörster, G. (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine*, 267(1), 89-105.
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., ... & Olin, S. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology*, 2(1), 1.
- Osman, I. F., Baumgartner, A., Cemeli, E., Fletcher, J. N., & Anderson, D. (2010). Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in Hep-2 cells. *Nanomedicine*, 5(8), 1193-1203.
- Petković, J., Žegura, B., & Filipič, M. (2011). Influence of TiO₂ nanoparticles on cellular antioxidant defense and its involvement in genotoxicity in HepG2 cells. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 304, No. 1, p. 012037). IOP Publishing.
- Prasad, R. Y., Simmons, S. O., Killius, M. G., Zucker, R. M., Kligerman, A. D., Blackman, C. F., ... & DeMarini, D. M. (2014). Cellular interactions and biological responses to titanium dioxide nanoparticles in HepG2 and BEAS-2B cells: Role of cell culture media. *Environmental and molecular mutagenesis*, 55(4), 336-342.
- Pumera, M. (2011). Nanotoxicology: the molecular science point of view. *Chemistry—An Asian Journal*, 6(2), 340-348.
- Relier, C., Dubreuil, M., Lozano García, O., Cordelli, E., Mejia, J., Eleuteri, P., ... & Lacroix, G. (2017). Study of TiO₂ P25 nanoparticles genotoxicity on lung, blood, and liver cells in lung overload and non-overload conditions after repeated respiratory exposure in rats. *Toxicological Sciences*, 156(2), 527-537.
- Rivera_Gil, P., Clift, M. J., Rutishauser, B. R., & Parak, W. J. (2012). Methods for understanding the interaction between nanoparticles and cells. In J. Reineke, ed. *Nanotoxicity: methods and protocols*. Humana Press, New York.
- Roiter, Y., Ornatska, M., Rammohan, A. R., Balakrishnan, J., Heine, D. R., & Minko, S. (2008). Interaction of nanoparticles with lipid membrane. *Nano letters*, 8(3), 941-944.

- Roman, D., Locher, F., Suter, W., Cordier, A., & Bobadilla, M. (1998). Evaluation of a new procedure for the flow cytometric analysis of in vitro, chemically induced micronuclei in V79 cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, 32(4), 387-396.
- Saqib, Q., Al-Khedhairi, A. A., Siddiqui, M. A., Abou-Tarboush, F. M., Azam, A., & Musarrat, J. (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology in vitro*, 26(2), 351-361.
- Sayes, C. M., & Warheit, D. B. (2009). Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(6), 660-670.
- Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., Liu, Y., West, J. L., Ausman, K. D., ... & Colvin, V. L. (2006). Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 92(1), 174-185.
- Shakeel, M., Jabeen, F., Shabbir, S., Asghar, M. S., Khan, M. S., & Chaudhry, A. S. (2016). Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO₂-NP) through various routes of exposure: a review. *Biological trace element research*, 172(1), 1-36.
- Shang, L., Yang, L., Seiter, J., Heinle, M., Brenner-Weiss, G., Gerthsen, D., & Nienhaus, G. U. (2014). Nanoparticles interacting with proteins and cells: a systematic study of protein surface charge effects. *Advanced Materials Interfaces*, 1(2), 1300079.
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M. L., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2323-2343.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., & Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology*, 10(1), 15.
- Shi, Y., Zhang, J. H., Jiang, M., Zhu, L. H., Tan, H. Q., & Lu, B. (2010). Synergistic genotoxicity caused by low concentration of titanium dioxide nanoparticles and p, p'-DDT in human hepatocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(3), 192-204.
- Shukla, R. K., Kumar, A., Gurbani, D., Pandey, A. K., Singh, S., & Dhawan, A. (2013). TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology*, 7(1), 48-60.
- Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., & Novak, S. (2011). Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?. *Radiology and oncology*, 45(4), 227-247.
- Srivastava, R. K., Rahman, Q., Kashyap, M. P., Singh, A. K., Jain, G., Jahan, S., ... & Pant, A. B. (2013). Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Human & experimental toxicology*, 32(2), 153-166.
- Stone, V., Johnston, H., & Schins, R. P. (2009). Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical reviews in toxicology*, 39(7), 613-626.
- Suzuki, H., Toyooka, T., & Ibuki, Y. (2007). Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environmental science & technology*, 41(8), 3018-3024.

- Sygouni, V., & Chrysikopoulos, C. V. (2015). Characterization of TiO₂ nanoparticle suspensions in aqueous solutions and TiO₂ nanoparticle retention in water-saturated columns packed with glass beads. *Chemical Engineering Journal*, 262, 823-830.
- Tantra, R., Tompkins, J., & Quincey, P. (2010). Characterisation of the de-agglomeration effects of bovine serum albumin on nanoparticles in aqueous suspension. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 275-281.
- Tavares, A. M., Louro, H., Antunes, S., Quarré, S., Simar, S., De Temmerman, P. J., ... & Nessler, F. (2014). Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicology in vitro*, 28(1), 60-69.
- Teeguarden, J. G., Hinderliter, P. M., Orr, G., Thrall, B. D., & Pounds, J. G. (2006). Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences*, 95(2), 300-312.
- Tiwari, J. N., Tiwari, R. N., & Kim, K. S. (2012). Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57(4), 724-803.
- Valdiglesias, V., Costa, C., Sharma, V., Kiliç, G., Páraso, E., Teixeira, J. P., ... & Laffon, B. (2013). Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. *Food and chemical toxicology*, 57, 352-361.
- Valdiglesias, V., Laffon, B., Páraso, E., & Méndez, J. (2011). Evaluation of okadaic acid-induced genotoxicity in human cells using the micronucleus test and γ H2AX analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(15-16), 980-992.
- Vallabani, N. S., Shukla, R. K., Konka, D., Kumar, A., Singh, S., & Dhawan, A. (2014). TiO₂ nanoparticles induced micronucleus formation in human liver (HepG2) cells: comparison of conventional and flow cytometry based methods. *Molecular cytogenetics*, 7(S1), P79.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6, 1769.
- Verdier, T., Coutand, M., Bertron, A., & Roques, C. (2014). Antibacterial activity of TiO₂ photocatalyst alone or in coatings on E. coli: the influence of methodological aspects. *Coatings*, 4(3), 670-686.
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., ... & Li, Y. (2007). Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology letters*, 168(2), 176-185.
- Warheit, D. B., Webb, T. R., Sayes, C. M., Colvin, V. L., & Reed, K. L. (2006). Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicological sciences*, 91(1), 227-236.
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., & Von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental science & technology*, 46(4), 2242-2250.

Wolf, R., Matz, H., Orion, E., & Lipozencic, J. (2003). Sunscreens—the ultimate cosmetic. *Acta Dermatovenerol Croat*, 11(3), 158-162.

Zhang, Y. N., Poon, W., Tavares, A. J., McGilvray, I. D., & Chan, W. C. (2016). Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of controlled release*, 240, 332-348.

Zucker, R. M., Massaro, E. J., Sanders, K. M., Degn, L. L., & Boyes, W. K. (2010). Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 77(7), 677.