



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Biociencias

Departamento de Genética y de Microbiología

**EL PROYECTO NANOGENOTOX: HACIA EL DESARROLLO DE
UNA METODOLOGÍA ROBUSTA PARA LA DETERMINACIÓN
DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE LOS NANOMATERIALES**

TESIS DOCTORAL

Gerard Vales Segura

2013



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Biociencias

Departamento de Genética y de Microbiología

**EL PROYECTO NANOGENOTOX: HACIA EL DESARROLLO DE
UNA METODOLOGÍA ROBUSTA PARA LA DETERMINACIÓN
DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE LOS NANOMATERIALES**

Memoria presentada por GERARD VALES SEGURA en el marco de los estudios de doctorado en Genética de la *Universitat Autònoma de Barcelona* para optar al grado de Doctor por la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Dr. Ricard Marcos Dauder

Director de la Tesis

Gerard Vales Segura

A mi familia,

“Al ampliar el campo del conocimiento no hacemos sino aumentar el horizonte de la ignorancia.”

Henry Miller

Agradecimientos

Una Tesis es un proceso en el cual hay mucha gente implicada, que en mayor o menor grado ha contribuido a que haya salido adelante.

En primer lugar mi agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Ricard Marcos, por la oportunidad de poder realizarla, y por su guía, sabios consejos y explicaciones de del porqué de las cosas. Gracias por todo, ¡ojalá el conocimiento se transfiriera por ósmosis!

También al Dr. Hannu Norppa por acogerme en su laboratorio y por las interesantes conversaciones sobre el tema del que versa ésta Tesis, y a la Dra. Júlia Catalán por hacerme sentir como en casa.

Al proyecto Nanogenotox, que ha hecho posible que esta Tesis se desarrollara en su marco y a todos los que han estado involucrados en él, ha sido un placer.

A la UAB y a la beca PIF ya que si no esta Tesis no hubiera visto la luz.

A Gloria, Lourdes y Cristian: Porqué son los pilares del día a día en el laboratorio y si hay alguna duda existencial o sucede cualquier cosa, ellos están allí para echar una mano con una sonrisa o un comentario jocosos, gracias.

A Alba Hernández por sus consejos y orientación en los experimentos crónicos, y a Laura Rubio por su gran ayuda en el desarrollo de éstos. Sin ellas no hubiera sido posible.

A Lara, Jéssica, Cristian, Leo, Max y Alba por los cafés y las discusiones que hemos mantenido sobre un gran número de tópicos, nos lo hemos pasado bien.

A toda la gente del laboratorio, pasada y presente, con la que hemos compartido momentos y discusiones o conversaciones, ya sean de trabajo o no, que espero que nos hayan enriquecido mutuamente.

A Kirsi, todo ha sido mucho más fácil gracias a ella.

¡Gracias a todos!

Resumen

La nanotecnología es una ciencia emergente que investiga las propiedades de la materia en la escala nanométrica. En esta escala, las propiedades de los materiales empiezan a ser dominadas por los efectos cuánticos en lugar de por las leyes físicas por las que está regida la materia a escala micrométrica y superior. Son estas mismas propiedades, que despiertan tanto interés, las mismas que han levantado suspicacias sobre sus posibles efectos perniciosos sobre la salud humana. En consecuencia, el proyecto Nanogenotox se englobó dentro de los esfuerzos para desarrollar un marco para la regulación de los nanomateriales. Durante el desarrollo del proyecto, los resultados obtenidos en la fase de *screening* muestran que los distintos nanomateriales utilizados no inducen daño en el DNA de las líneas celulares Caco-2 y BEAS-2B (nanotubos de carbono), y 16HBE (SiO₂), evaluados mediante el ensayo del cometa. El ensayo de validación, realizado con todos los laboratorios involucrados en el grupo de trabajo de genotoxicidad *in vitro*, se llevó a cabo mediante los ensayos del cometa y de micronúcleos, analizando cuatro tipos de nanomateriales, en líneas celulares. Los resultados obtenidos no han mostrado una buena repetibilidad entre laboratorios que, más que atribuirse a deficiencias en los protocolos, puede ser debida a la baja potencialidad genotóxica de los nanomateriales seleccionados. Experimentos adicionales basados en tratamientos crónicos con bajas dosis con nanotubos de carbono y de TiO₂ en la línea BEAS-2B muestran que los primeros son capaces de inducir incrementos de ROS y alteraciones cromosómicas en estas condiciones, así como una disminución en la expresión de factores proinflamatorios y una inducción de la transformación celular *in vitro*. Las nanopartículas de TiO₂, pese a ser rápidamente internalizadas, no son capaces de inducir los efectos observados con los nanotubos de carbono. En conclusión, el desarrollo y la información obtenida en este proyecto ayudarán al establecimiento de criterios y metodologías específicas, y en consecuencia un marco regulatorio, para la correcta evaluación del potencial genotóxico de los nanomateriales.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. ¿QUÉ ES LA NANOTECNOLOGÍA? | 1 |
| 1.1.1. Historia | 1 |
| 1.1.2. El concepto de nanotecnología en ciencia | 3 |
| 1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS NANOMATERIALES | 4 |
| 1.2.1. Características fisicoquímicas | 5 |
| a) Tamaño | 5 |
| b) Superficie | 6 |
| c) Forma | 7 |
| d) Carga eléctrica (Potencial Z) | 8 |
| e) Estabilidad | 8 |
| 1.3. APLICACIONES DE LOS NANOMATERIALES | 9 |
| 1.4. PERSPECTIVAS DE FUTURO | 12 |
| 1.5. POSIBLES RIESGOS DE LOS NANOMATERIALES SOBRE LA SALUD | 13 |
| 1.5.1. Posibles fuentes de exposición | 15 |
| 1.5.2. Nuevos enfoques respecto a los nuevos retos planteados | 19 |
| 1.5. EL PROYECTO NANOGENOTOX | 20 |
| 1.5.1. Nanomateriales utilizados | 22 |
| 1.5.2. Tipos celulares utilizados | 24 |
| 1.5.3. Ensayos de genotoxicidad | 25 |
| 1.5.4. Desarrollo del proyecto | 27 |
| 1.5.4.1. Primera fase: <i>Screening</i> | 28 |
| 1.5.4.2. Estudio de validación: <i>Round Robin test</i> | 28 |
| 1.5.4.3. Tratamientos de larga duración | 29 |
| a) Internalización de los nanomateriales | 30 |
| b) Inducción de ROS endógenas | 31 |
| c) Cambios en la expresión génica | 32 |
| -Western blot | 32 |
| -RT-PCR | 32 |
| d) El ensayo del <i>soft-agar (soft-agar assay)</i> | 33 |
| 2. OBJETIVOS | 35 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 3.1. LÍNEAS CELULARES | 37 |
| a) Caco-2 | 37 |
| b) BEAS-2B | 37 |
| c) 16HBE | 38 |
| 3.2. NANOMATERIALES | 38 |
| 3.2.1. Dispersión de los nanomateriales (protocolo Nanogenotox) | 38 |
| 3.2.2. Pesado del nanomaterial | 39 |
| 3.2.3. Adición del medio de dispersión | 40 |
| 3.2.4. Sonicación | 40 |
| 3.3. ESTABLECIMIENTO Y TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS | 41 |
| 3.3.1. Fase de <i>screening</i> | 41 |
| 3.3.2. Estudio de validación (<i>Round Robin test</i>) | 42 |
| 3.3.2.1. Tratamiento | 42 |
| 3.3.2.2. Consideraciones | 43 |
| 3.3.2.3. Tiempo de tratamiento | 43 |
| 3.3.2.4. Establecimiento de los cultivos | 44 |
| 3.3.2.4.1. Ensayo de micronúcleos | 44 |
| 3.3.2.4.2. Ensayo del cometa | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.2.5. Dispersión y exposición | 45 |
| 3.3.3. Tratamientos crónicos | 47 |
| 3.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD | 48 |
| 3.5. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD | 49 |
| 3.5.1. Ensayo del cometa | 49 |
| 3.5.1.1. Modificaciones específicas del ensayo del cometa en el <i>Round Robin test</i> | 51 |
| 3.5.2. Ensayo de micronúcleos | 52 |
| 3.5.2.1. Recolección de las células | 52 |
| 3.5.2.2. Preparación de los portaobjetos | 53 |
| 3.5.2.3. Tinción | 53 |
| 3.6. ENSAYOS COMPLEMENTARIOS | 55 |
| 3.6.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 55 |
| 3.6.1.1. Visualización de nanomaterial | 55 |
| 3.6.1.2. Internalización | 55 |
| 3.6.3. Western blot | 56 |
| a) Recolección de células | 56 |
| b) Cuantificación de las proteínas | 57 |
| c) Preparación de los geles | 57 |
| d) Carga de las muestras | 58 |
| e) Hibridación de la membrana con anticuerpos | 58 |
| f) Detección y lectura de bandas | 59 |
| 3.6.4. RT-PCR | 59 |
| a) Extracción de RNA | 60 |
| b) Cebadores | 61 |
| c) Transcripción inversa | 62 |
| d) Amplificación por PCR | 62 |
| 3.6.5. Medición de ROS e internalización (FACS) | 63 |
| 3.6.6. Ensayo del <i>soft-agar (soft-agar assay)</i> | 63 |
| 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS | 65 |
| 4. RESULTADOS | 67 |
| 4.1. DISPERSIÓN DE LOS NANOMATERIALES | 67 |
| 4.2. FASE DE SCREENING | 67 |
| 4.2.1. Resultados obtenidos en la línea celular Caco-2 | 68 |
| 4.2.1.1. NM400 | 68 |
| a) Visualización | 68 |
| b) Citotoxicidad | 68 |
| c) Genotoxicidad | 68 |
| 4.2.1.2. NM401 | 70 |
| a) Visualización | 70 |
| b) Citotoxicidad | 71 |
| c) Genotoxicidad | 71 |
| 4.2.1.3. NM402 | 72 |
| a) Visualización | 72 |
| b) Citotoxicidad | 73 |
| c) Genotoxicidad | 73 |
| 4.2.1.4. NM403 | 74 |
| a) Visualización | 74 |
| b) Citotoxicidad | 74 |
| c) Genotoxicidad | 74 |
| 4.2.1.5. NRCWE006 | 76 |
| a) Citotoxicidad | 76 |
| b) Genotoxicidad | 76 |
| 4.2.1.6. NRCWE007 | 77 |
| a) Citotoxicidad | 77 |
| b) Genotoxicidad | 78 |
| 4.2.1.7. Consideraciones generales | 78 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.2 Resultados obtenidos en la línea celular BEAS-2B | 79 |
| 4.2.2.1. NM400 | 80 |
| a) Citotoxicidad..... | 80 |
| b) Genotoxicidad | 80 |
| 4.2.2.2. NM401 | 81 |
| a) Citotoxicidad..... | 81 |
| b) Genotoxicidad | 82 |
| 4.2.2.3. NM402 | 83 |
| a) Citotoxicidad..... | 83 |
| c) Genotoxicidad | 83 |
| 4.2.2.4. NM403 | 84 |
| a) Citotoxicidad..... | 84 |
| b) Genotoxicidad | 85 |
| 4.2.2.5. NRCWE006 | 86 |
| a) Citotoxicidad..... | 86 |
| b) Genotoxicidad | 87 |
| 4.2.2.6. NRCWE007 | 87 |
| a) Citotoxicidad..... | 87 |
| b) Genotoxicidad | 88 |
| 4.2.2.7. Consideraciones generales | 89 |
| 4.2.3. Resultados obtenidos en la línea celular 16HBE | 90 |
| 4.2.3.1. NM200 | 90 |
| a) Citotoxicidad..... | 90 |
| b) Genotoxicidad | 90 |
| 4.2.3.2. NM201 | 91 |
| a) Citotoxicidad..... | 91 |
| b) Genotoxicidad | 92 |
| 4.2.3.3. NM202 | 93 |
| a) Citotoxicidad..... | 93 |
| b) Genotoxicidad | 93 |
| 4.2.3.4. NM203 | 94 |
| a) Citotoxicidad..... | 94 |
| 4.2.3.5. Consideraciones generales | 96 |
| 4.3. ROUND ROBIN TEST | 96 |
| 4.3.1. Resultados obtenidos con el compuesto de dióxido de titanio (NM102) | 97 |
| 4.3.2. Resultados obtenidos con el compuesto de sílice (NM203) | 98 |
| 4.3.3. Resultados obtenidos con los nanotubos de carbono (NM403) | 100 |
| 4.3.4. Resultados obtenidos con el compuesto de óxido de zinc (NM110) | 101 |
| 4.3.5. Resultado global del <i>Round Robin test</i> | 102 |
| 4.4. EXPERIMENTOS CON TRATAMIENTOS CRÓNICOS..... | 103 |
| 4.4.1. Resultados con el dióxido de titanio (NM102)..... | 103 |
| 4.4.1.1. Estudios de internalización con NM102 mediante TEM..... | 103 |
| 4.4.1.2. Medición de la internalización mediante FACS..... | 106 |
| 4.4.1.3. Determinación de la producción de ROS endógenas | 108 |
| 4.4.1.4. Resultados con el ensayo del cometa | 108 |
| 4.4.1.5. Resultados con el ensayo de micronúcleos..... | 109 |
| 4.4.1.6. Expresión de la hemooxigenasa-1 mediante Western blot..... | 111 |
| 4.4.1.7. Expresión de factores proinflamatorios y de la hemooxigenasa-1 mediante RT-PCR.... | 112 |
| 4.4.1.8. Resultados obtenidos en el soft-agar assay con NM102 | 113 |
| 4.4.1.9. Consideraciones generales | 115 |
| 4.4.2. Resultados con nanotubos de carbono (NM403)..... | 116 |
| 4.4.2.1. Estudios de internalización con NM403 mediante TEM..... | 116 |
| 4.4.2.2. Medición de la internalización mediante FACS..... | 117 |
| 4.4.2.3. Determinación de la producción de ROS endógenas | 118 |
| 4.4.2.4. Resultados con el ensayo del cometa | 120 |
| 4.4.2.5. Resultados con el ensayo de micronúcleos..... | 121 |
| 4.4.2.6. Expresión de la hemooxigenasa-1 mediante Western blot..... | 122 |

| | |
|--|------------|
| 4.4.2.7. Expresión de factores proinflamatorios y de la hemooxigenasa-1 mediante RT-PCR.... | 123 |
| 4.4.2.8. Resultados obtenidos en el ensayo del soft-agar con NM403 | 124 |
| 4.4.2.9. Consideraciones generales | 126 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 129 |
| 5.1. CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS NANOMATERIALES EN LOS EXPERIMENTOS CON TRATAMIENTOS AGUDOS | 130 |
| 5.1.1. Factores que pueden afectar las capacidades citotóxicas y genotóxicas | 138 |
| 5.1.1.1. Estructura | 138 |
| 5.1.1.2. Composición del medio de cultivo..... | 139 |
| 5.1.1.3. Propiedades de la superficie..... | 140 |
| 5.1.2. Interacción de los nanomateriales con los componentes de los distintos ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad..... | 143 |
| 5.2. ESTUDIOS DE INTERCALIBRACIÓN (ROUND ROBIN TEST) | 144 |
| 5.2.1. Consideraciones a tener en cuenta en los estudios de intercalibración entre laboratorios | 146 |
| 5.3. EXPERIMENTOS CRÓNICOS..... | 146 |
| 5.3.1. Genotoxicidad e internalización | 147 |
| 5.3.1.1. Desventajas del TEM y del ensayo DCFH-DA para la medición de la internalización.... | 148 |
| 5.3.2 Expresión de factores proinflamatorios | 149 |
| 5.3.3. Potencial transformante de los nanomateriales | 150 |
| 5.4. CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO EN EL ANÁLISIS DEL POTENCIAL TOXICOLÓGICO DE LOS NANOMATERIALES | 151 |
| 5.4.1. El dilema de la dosis métrica..... | 152 |
| 5.4.2. La relevancia de la sonicación en las propiedades de los nanomateriales | 153 |
| 5.4.3. La relevancia de los ensayos <i>in vitro</i> | 155 |
| 5.4.4. La correlación entre los ensayos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 156 |
| 5.4.5. Perspectivas de futuro..... | 156 |
| 6. CONCLUSIONES | 159 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 161 |

TABLA ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| AFM | Microscopio de fuerza atómica (<i>Atomic Force Microscopy</i>) |
| ANOVA | Análisis de la varianza (<i>Analysis of Variance</i>) |
| ANSES | Agencia Nacional de la Seguridad Sanitaria de la Alimentación, del Ambiente y del Trabajo, Francia (<i>Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail</i>) |
| BEBM | Medio basal de células broncoepiteliales |
| BEGM | Medio de crecimiento de células broncoepiteliales |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CBMN | Ensayo de micronúcleos con citocinesis bloqueada (<i>Cytokinesis-Blocked MicroNucleus assay</i>) |
| CBPI | Índice de proliferación celular por bloqueo de citocinesis |
| cDNA | DNA complementario |
| CNT | Nanotubos de carbono |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato |
| DCF | 2'-7'-dicloro-dihidro-fluoresceína |
| DCFH-DA | 2'-7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato |
| DDT | Dicloro difenil tricloroetano |
| DMEM | Medio de Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EAHC | Agencia Ejecutiva para la Salud y los Consumidores (<i>Executive Agency for Health and Consumers</i>) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ENM | Nanomateriales manufacturados (<i>Engineered NanoMaterials</i>) |
| FACS | Citometría de flujo (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>) |
| FCS | FBS |
| FBS | Suero fetal bovino |
| FIOH | Instituto Finlandés de Salud Ocupacional (<i>Finnish Institute of Occupational Health</i>) |
| FISH | Hibridación fluorescente in situ (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>) |

| | |
|---------------|---|
| FPG | Formamido pirimidina glicosilasa |
| gr | Gramo |
| h | hora |
| HEPES | (ácido 4-(2-hidroxiethilo)-1-piperazinoetanosulfónico) |
| HMOX-1 | Hemooxigenasa-1 |
| INT | (2-p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio clórico |
| JA | Acción conjunta (<i>Joint Action</i>) |
| JRC | Centro Europeo de Investigación, Ispra, Italia (<i>Joint Research Center</i>) |
| LDH | Lactosa deshidrogenasa |
| LMP | Baja temperatura de fusión (<i>Low Melting Point</i>) |
| MEM | Medio esencial mínimo |
| milliQ | Agua ultrapura |
| mL | Mililitro |
| mV | Milivoltio |
| µm | micrómetro |
| MMT | Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio |
| MNBN | Células binucleadas con micronúcleos |
| MWCNT | Nanotubos de carbono multicapa |
| NF-κB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| NIOM | Instituto Nofer de Medicina Ocupacional, Polonia (<i>Nofer Institute of Occupational Medicine</i>) |
| nm | Nanómetro |
| NRCWE | Centro Nacional de investigación del ambiente de trabajo, Dinamarca (<i>National Research Centre for the Working Environment</i>) |
| PAHs | hidrocarburos aromáticos policíclicos |
| PLGA | Poliácido láctico-co-glicólico |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| RIPA | Ensayo de radioinmunoprecipitación (<i>Radio Immuno Precipitation Assay</i>) |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>) |

| | |
|------------------------|--|
| SAS | Sílice amorfa sintética |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SCC | Sodio citrato salino |
| SCC | Complejidad de dispersión lateral (<i>Side-Scatter Complexity</i>) |
| STM | Microscopia de efecto túnel (<i>Scanning Tunneling Microscopy</i>) |
| SWCNT | Nanotubos de carbono de una capa |
| TBS | Tampón tris salino |
| TEM | Microscopia electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>) |
| TEMED | Tetrametiletilendiamina |
| TiO₂ | Dióxido de titanio |
| TGS | tampón tris/glicina/SDS |
| TTBS | Tampón tris salino (0,1% tween) |
| TK | Timidina quinasa |
| UAB | Universidad Autónoma de Barcelona (España) |
| w/v | Peso/volumen |
| WP | Grupo de trabajo (<i>Work package</i>) |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ¿QUÉ ES LA NANOTECNOLOGÍA?

La nanotecnología es una ciencia emergente y eminentemente interdisciplinaria que investiga la manipulación de la materia, así como las diferentes propiedades y aplicaciones de ésta en la escala nanométrica.

En esta escala, las propiedades de los materiales empiezan a ser dominadas por los efectos cuánticos en lugar de por las leyes físicas por las que está regida la materia a escala micrométrica y superior. Por lo tanto, cuando la materia se encuentra en esta escala, varias de sus propiedades como pueden ser la fluorescencia, la conductividad eléctrica (Jana et al., 2007), las propiedades físicas (Lu et al., 2009), la temperatura de fusión, la reactividad (Haruta, 2003) o las propiedades ópticas (Huang y El-Sayed, 2010) cambian o aparecen en función del tamaño y/o forma de la misma. Esto permite, mediante pequeños cambios en los procesos de síntesis, obtener nanomateriales con tamaños y/o formas ligeramente distintas, permitiendo el ajuste de las propiedades de este nanomaterial hasta obtener aquellas de interés para una aplicación determinada. Por lo tanto, la manipulación y control de la materia a escala nanométrica, y la consiguiente fabricación de compuestos nanométricos u objetos con nanomateriales en su composición, tiene la capacidad de incrementar de manera significativa las prestaciones, o conferir propiedades novedosas respecto a aquellos compuestos u objetos que no contienen nanomateriales en su composición.

Es por todo lo anterior que la nanotecnología está despertando un enorme interés tanto a nivel de investigación como de desarrollo e innovación, debido a su potencial de revolucionar muchos de los aspectos de la vida cotidiana e introducir enormes mejoras y novedades en multitud de campos del conocimiento y de sus vertientes aplicadas.

1.1.1. Historia

Pese a que la investigación de las propiedades de los nanomateriales es relativamente reciente, debido a los nuevos métodos de síntesis desarrollados, siempre ha existido materia en esta escala. Así, existen nanomateriales de origen natural generados por distintos procesos, como son los formados en los

aerosoles de origen marino (O'Dowd et al., 2004), las nanopartículas emitidas por los volcanes, o los fullerenos generados por combustión (Howard et al., 1992).

Por lo tanto, en contraposición con los nanomateriales generados de manera natural, hay que considerar los generados por la industria nanotecnológica a los que se les denomina nanomateriales manufacturados (*nonostructured or engineered nanomaterials*, ENM). En este contexto, la posible exposición humana a nanomateriales no cabe atribuirle solamente a la nanotecnología, ya que esta exposición se viene dando a lo largo de toda la existencia humana. Sin embargo, es obvio que la producción masiva de estos compuestos puede suponer una futura mayor exposición a los mismos; como ejemplo de este tipo de exposición ancestral cabe citar la materia nanoparticulada encontrada en el tejido pulmonar de la momia alpina Ötzi, consistente en distintos carbonáceos, sílice y nano-cristales de TiO_2 (Murr et al., 2004).

Además de los nanomateriales de origen natural, a lo largo de la historia de la humanidad ésta ha ido desarrollando distintos procesos para la elaboración de sus objetos de uso. En algunos de estos objetos se han detectado distintos tipos de nanomateriales en su composición que mejoraban las propiedades de los mismos. Uno de los casos más antiguos del uso de nanomateriales se ha encontrado replicando una receta greco-romana para la tinción del cabello, en la cual se generan nanocristales de sulfato de plomo que posteriormente interaccionaban con el cabello, decolorándolo (Walter et al., 2006). Otro ejemplo de esa época, es el que concierne a las propiedades del material de las denominadas copas de Licurgo, originadas en el Imperio Romano durante el siglo IV DC. Éstas presentan un color verde que cambia a rojo cuando se expone a una fuente de luz, lo que es debido a la presencia de nanopartículas de oro y de plata en su composición (Gartia et al., 2013). Otro proceso que afecta a la coloración del cristal se encuentra en las vidrieras de las catedrales e iglesias de la edad media en Europa, algunas de las cuales presentan colores distintos en función del tamaño o la composición de las nanopartículas integradas en el cristal. Así, la búsqueda de nuevas propiedades de los materiales supuso, sin quererlo, la creación y utilización de varios tipos de nanoestructuras donde, además de los ejemplos antes citados, se pueden añadir los nanotubos de carbono y nanoalambres de cementita encontrados en

espadas árabes del siglo XVII, lo que incrementaba la fuerza y resistencia de las mismas (Reibold et al., 2006). Por lo tanto, aunque la nanotecnología como ciencia tiene un origen reciente, los nanomateriales tienen una aparición que se remonta a los orígenes de nuestro planeta.

1.1.2. El concepto de nanotecnología en ciencia

Las ideas y conceptos de los cuales nace la nanotecnología fueron concebidos antes de que la ciencia y los avances tecnológicos hicieran posible que empezara su desarrollo. Mucho antes de que el término nanotecnología empezara a usarse, el físico y premio Nobel Richard Feynman realizó una presentación titulada *“There is plenty of room at the bottom”* en la reunión de la Academia Americana de Física (*American Physical Society*) realizada en el Instituto de Tecnología de California (Caltech). En esta presentación, realizada el 29 de diciembre de 1959, describía cómo en el futuro los científicos serían capaces de manipular átomos y moléculas de manera individual. Sin embargo, el término nanotecnología se usó por primera vez quince años más tarde, cuando Norio Taniguchi la definió como la separación, consolidación, o deformación de un átomo o molécula de un material (Taniguchi, 1974).

Pese a que el concepto y definición de la nanotecnología son anteriores, no es hasta 1981 cuando se considera el inicio de la nanotecnología como ciencia. Esto fue la consecuencia de la invención del microscopio de efecto túnel (STM; *scanning tunneling microscopy*; Binnig et al., 1982), que permite la observación de átomos individuales. A partir de este momento el interés por este campo se disparó y rápidamente se han ido sucediendo distintos descubrimientos. Así, en 1985 se descubre un nuevo tipo de moléculas, los fullerenos, parecidos a esferas, compuestos por varias decenas de átomos de carbono. El descubrimiento de esta nueva clase de moléculas supuso el premio Nobel de química en 1996 (Kroto et al., 1985). En 1986 se desarrolló el microscopio de fuerza atómica (AFM; *atomic force microscopy*) que permite la detección de pequeños cambios de distintas fuerzas de corto alcance como por ejemplo Van der Waals, con una ligera mejor resolución que el STM y aplicable también a materiales no conductores. En 1989 ingenieros de IBM lograron reproducir el logo de la compañía manipulando 35 átomos de xenón con un microscopio AFM, siendo la primera demostración de la manipulación de

átomos de manera individual para un propósito concreto. Otra fecha relevante es 1991, cuando se realiza el descubrimiento de los nanotubos de carbono (Iijima, 1991). Como colofón de estos descubrimientos científicos, ya a partir de finales de los noventa y principios de siglo empiezan a aparecer distintos productos en el mercado que contienen nanomateriales en su composición. Por ejemplo, empiezan a aparecer en el mercado productos como parachoques, bolas de golf, calcetines anti-bacterias, tejidos resistentes a manchas y componentes de pantallas mejorados (Woodrow Wilson Project of Emerging Nanotechnologies, 2009a).

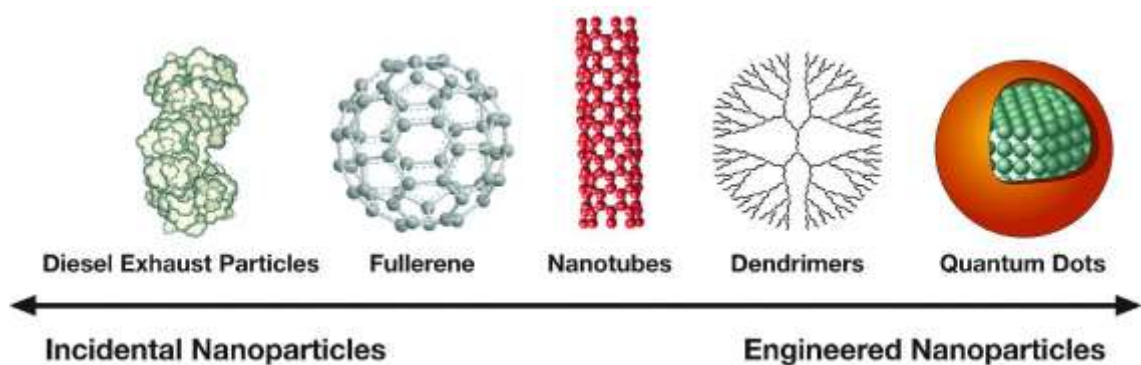


Figura 1: Diferentes nanopartículas ordenadas por origen, desde aquellas generadas incidentalmente como subproducto de otros procesos hasta aquellas sintetizadas con un objetivo o función concreta.

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS NANOMATERIALES

Como se ha comentado anteriormente, la existencia de nanopartículas de origen natural ha supuesto que la humanidad haya estado en contacto desde su origen a estos materiales. Sin embargo, la irrupción de nuevos tipos de nanomateriales en distintos productos y aplicaciones, está haciendo que la humanidad haya entrado en contacto con un tipo de nanomateriales distintos, ya que existen una serie de características que diferencian aquellas de origen natural con las de nueva aparición. Para ejemplarizar esto, en la figura 1 se indican algunos tipos de nanoestructuras, desde las naturales a las sintetizadas *de novo*. En estas últimas, la distribución del tamaño en una misma muestra es muy homogénea, debido a que en los procesos de síntesis, las condiciones están muy controladas para que estos nanomateriales presenten el tamaño adecuado para la función que se les quiere dar; en cambio, las nanopartículas

de origen natural presentan una distribución de tamaños muy amplia. Otra de las diferencias apreciables afecta a la forma de estos nanomateriales; así, mientras que las nanopartículas de origen natural presentan una gran variedad de formas (generalmente amorfas), las sintetizadas de manera artificial presentan formas muy específicas, dependiendo del propio proceso de síntesis, y también, ligadas a su función deseada.

Es de suponer que la constante exposición de los organismos a los nanomateriales de origen natural haya generado una presión evolutiva para desarrollar defensas frente a ellos. Sin embargo, la aparición de nuevos tipos de nanomateriales sintéticos, con las características distintas que se han explicado anteriormente, pueden suponer un nuevo tipo de exposición donde los mecanismos desarrollados frente a los de origen natural sean solamente efectivos de manera parcial, o que estas nuevas características puedan desencadenar efectos tóxicos mediante nuevos mecanismos, que las de origen natural no son capaces de ejercer.

1.2.1. Características fisicoquímicas

Un nanomaterial se puede definir como una estructura con al menos una dimensión de tamaño menor de 100 nm. Esto incluye, por ejemplo, a los nanotubos de carbono ya que se considera que entran en este rango al tener dos dimensiones por debajo de este tamaño, pese a que pueden llegar a medir varias micras de longitud. Por convención, se considera que un nanomaterial que supere ese tamaño ya no podría ser considerado como tal, aunque el límite, en realidad es más difuso, ya que hay materiales que superan este tamaño aunque pueden presentar alguna de las propiedades que se le suponen a los nanomateriales.

A continuación se describen algunas de las propiedades de los nanomateriales.

a) Tamaño

El tamaño es la característica de las nanopartículas que les confiere sus propiedades especiales. El efecto de reducir el tamaño de un material particulado supone el incremento de su superficie respecto al volumen, así como el incremento del número de partículas para una misma masa. Por ejemplo, para partículas 10 veces más pequeñas, habrá un incremento en la

concentración de las partículas 1000 veces superior a la concentración original. Así mismo una disminución del tamaño influye en la reactividad de las nanopartículas ya que, a menor tamaño, una mayor proporción de los átomos que la forman estarán en la superficie, donde pueden reaccionar con diferentes estructuras o compuestos.

Otro factor relacionado con el tamaño es el denominado tamaño crítico. Algunas nanopartículas con tamaños determinados pueden interactuar con estructuras biológicas concretas. Un ejemplo son las nanopartículas de oro de 55 nm, descritas como tóxicas ya que encajan con el surco mayor de la doble hélice del DNA (Tsoli et al., 2005) mientras que otras de menor o mayor tamaño no presentan esta propiedad. Si el objetivo fuera la introducción de nanopartículas en un organismo con fines médicos o de diagnóstico, habría que tener en cuenta que éste presenta diferentes estructuras que pueden actuar como barreras en función del tamaño de las nanopartículas. Por ejemplo, las uniones estrechas en los capilares del hígado, bazo o de la médula ósea tienen un límite de 100-1000 nm, mientras que en el riñón y en el intestino es de unos 50-60 nm, y en el de los músculos, piel y pulmones este límite es de 6 nm. Igual ocurre dentro de una célula, donde la maraña del citoesqueleto hace que las partículas mayores de unos 20 nm queden "atrapadas" mientras que las que tienen un tamaño menor pueden avanzar más fácilmente. De igual manera sucede con los nucleoporos, que tienen un diámetro de unos 8-9 nm. Por lo tanto, las zonas de un organismo a las cuales puede acceder una nanopartícula se verán limitadas por el tamaño de éstas.

b) Superficie

La superficie está íntimamente ligada al tamaño de las partículas. Por ejemplo, si tenemos un cubo de 1 centímetro de lado, la superficie total será de 6 cm^2 . Si este cubo estuviera formado por cubos más pequeños, de 1 mm de lado, la superficie total aumentaría a 60 cm^2 . Pero si este cubo estuviese formado por cubos de 1 nanómetro de lado, la superficie total sería de $60.000.000 \text{ cm}^2$, una superficie mayor a la de un campo de fútbol. Este ejemplo refleja claramente la importancia de la relación entre tamaño y superficie.

Dado que es en la superficie de las nanopartículas donde se dan las reacciones con el entorno, las reacciones (tóxicas o de otros tipos) que se

podrían generar podrían estar muy relacionadas con la superficie total disponible. De hecho, la superficie se ha propuesto como el mejor parámetro dosimétrico para estudiar fenómenos de toxicidad (Oberdorster et al., 2005).

La superficie de las nanopartículas se puede modificar mediante la conjugación con distintas moléculas. La conjugación de moléculas biológicas en la superficie de los nanomateriales es una estrategia prometedora de cara a los posibles usos médicos o de diagnóstico en humanos, ya que permite enmascarar la presencia de las nanopartículas en los organismos para que el sistema inmunitario no sea capaz de reconocer a éstas como tales. Estas modificaciones también pueden servir para mejorar la dispersión de las nanopartículas en solución, dificultando su agregación por interacciones estéricas. La conjugación de biomoléculas en la superficie también puede darse accidentalmente en medios de cultivo con las proteínas presentes en el suero, generando una corona proteica que puede ser un factor de confusión en experimentos *in vitro* al variar la reactividad biológica de las mismas (Jones et al., 2009).

c) Forma

Los nanomateriales pueden tener formas muy distintas. De hecho, el mismo material se puede encontrar bajo distintas formas en función de las condiciones en las que se hayan sintetizado, las cuales pueden conferir propiedades distintas (Xiao y Qi, 2011). La forma de los nanomateriales afecta directamente a la superficie expuesta, siendo las esferas las que menos superficie exponen por volumen. Por lo tanto, este hecho afecta a su reactividad ya que a más superficie disponible mayor reactividad por nanopartícula.

En general, todas las formas que se alejen de la esfera tendrán tendencia a una mayor agregación o aglomeración, a causa de su mayor superficie respecto al volumen por partícula. Otro aspecto importante relacionado con la forma es la propia coordinación de los átomos; así, aquellos que se encuentran en superficies planas están más coordinados entre sí y, por lo tanto, presentan una menor reactividad que aquellos que se encuentran en puntas o vórtices de la nanopartícula.

d) Carga eléctrica (Potencial Z)

La carga eléctrica de los nanomateriales determina la interacción de éstos con el medio biológico, ya que en función del signo de dicha carga éstas interaccionarán con unos u otros elementos (Nel et al., 2009). El parámetro de medida de la carga eléctrica es el denominado potencial Z, cuya definición es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido que interacciona con las nanopartículas.

La intensidad de esta carga eléctrica tendrá un efecto muy importante en la dinámica de agregación de las nanopartículas en dispersión, ya que las fuerzas de repulsión electrostáticas están contrapuestas con la tendencia a la agregación, debida a las fuerza de Van der Waals. Así, es necesario un potencial Z determinado (un mínimo de – o bien + 30 mV) para mantener a las partículas en dispersión de forma moderadamente estable.

e) Estabilidad

La estabilidad de los nanomateriales en un medio biológico determinará el patrón de agregación o de aglomeración de éstos y, por lo tanto, su tamaño efectivo. Esto conlleva que a mayor estabilidad, menor sea la agregación o aglomeración y, por lo tanto, éstas se encontrarán más dispersas y con tamaños más próximos al de su estado de dispersión. Un nivel de agregación elevado puede hacer que las partículas se salgan del rango nanométrico y pasen a comportarse como partículas micrométricas. Hay que tener en cuenta que el estado de aglomeración es hasta cierto punto reversible y se puede dar una disgregación posterior, mientras que el estado de agregación es prácticamente irreversible. Este proceso de aglomeración y desaglomeración se ha observado al llevar a cabo una simulación *in vitro* de una digestión, donde nanopartículas de sílice se aglomeran durante este proceso debido al bajo pH y a la elevada concentración de electrolitos. Al cambiar estas condiciones a las que se tienen en el tracto digestivo, las nanopartículas se desaglomeran, pudiendo así interaccionar con el tracto digestivo en su forma nanométrica (Peters et al., 2012).

Finalmente, hay que señalar que la estabilidad viene determinada por el conjunto de características descritas anteriormente, aunque las que tienen una mayor influencia son el tipo de material, la superficie total (que viene

determinada por el tamaño de las nanopartículas, así como por su forma y su concentración), la carga eléctrica y las interacciones de las nanopartículas con el medio, aunque otros factores como el pH y la presencia o ausencia de materia orgánica también pueden jugar un cierto papel (Baalousha, 2009). Un ejemplo de los mecanismos de estabilidad de las nanopartículas se indica en la figura 2, donde se ejemplarizan distintos mecanismos de estabilidad de las nanopartículas.

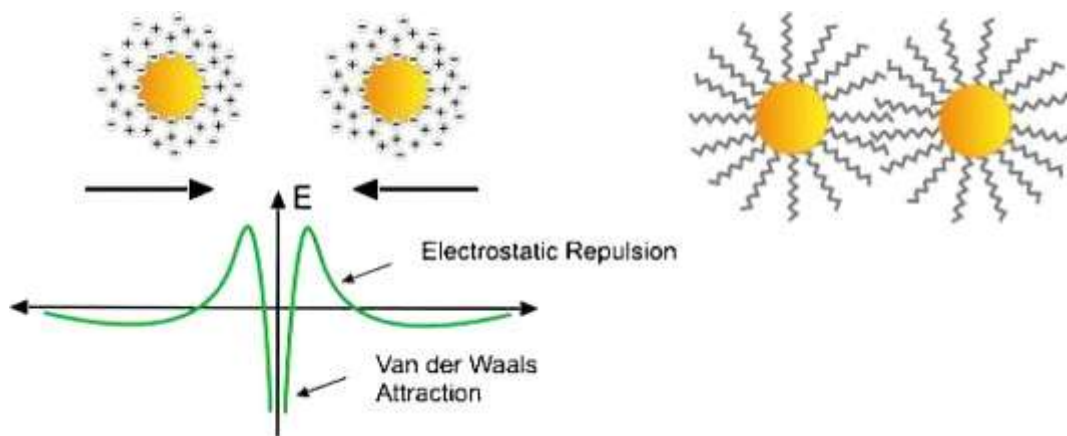


Figura 2: Estabilidad de las nanopartículas. En el primer caso, la repulsión electrostática impide que haya una aproximación suficiente entre ellas como para que las fuerzas de Van der Waals sean suficientemente fuertes como para inducir la agregación. En el segundo caso son las conjugaciones de distintas moléculas en la superficie de las nanopartículas las que impiden, debido a estas interacciones estéricas, que se agreguen.

1.3. APLICACIONES DE LOS NANOMATERIALES

Como se ha comentado, el gran despegue de la nanotecnología se debe al gran interés despertado en muchos sectores industriales. Debido a ello, se están dedicando importantes inversiones en la investigación y desarrollo en este campo, lo que está llevando a la aparición de nuevos productos conteniendo nanomateriales que han mejorado las prestaciones de los mismos. Actualmente ya se pueden encontrar un gran número de nanomateriales formando parte de distintos productos de consumo (figura 3) en campos tan variados como en la industria del automóvil, en alimentación como aditivos alimentarios (Lomer et al., 2002), en embalajes, en productos electrónicos, o en el área de la salud. En este último campo es donde existe un mayor número de productos conteniendo nanomateriales que, por su naturaleza, presentan un

contacto seguro con el organismo; esto sucede, por ejemplo, con los cosméticos (Hosokawa, 2008) y con los protectores solares (Brezová et al., 2005).

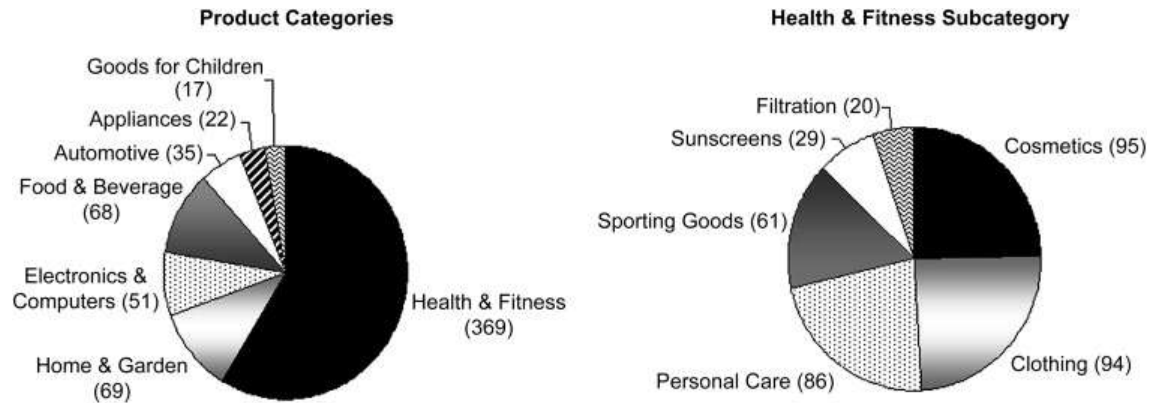


Figura 3: Productos comerciales que contienen nanomateriales. Se observa que una parte importante de estos productos entra en contacto directo con los usuarios debido a sus usos (Woodrow Wilson Database, 2009a).

Una de las características de los nanomateriales es su gran versatilidad, ya que sus propiedades se pueden explotar en un gran rango de productos. Así, por ejemplo, los nanomateriales compuestos por plata se suelen emplear como agentes antibacterianos, independientemente del producto en el que se encuentren, ya sea en dispersión o integrado en el tejido (vendajes para tratar quemaduras, sábanas, calcetines, detergentes, etc.). Otro ejemplo serían los nanotubos de carbono, que se suelen añadir a un producto para mejorar las propiedades de distintas estructuras (resistencia, fuerza, etc....) o como catalizadores (en baterías o en distintos procesos de fabricación). En el caso del dióxido de titanio (TiO_2) en su forma nanoparticulada, se usa principalmente como pigmento en pinturas debido a su color blanco, a su brillo y a su índice de refracción elevado. Su alto índice de refracción, también a la luz ultravioleta, lo hace útil como componente de los protectores solares para la piel. También se usa en otros productos por su color, como en la pasta de dientes o incluso como aditivo alimentario. Su uso en procesos industriales es significativo, especialmente por su actividad fotocatalítica cuando se somete a luz ultravioleta. Esta polivalencia de los nanomateriales se refleja en la figura 4 donde se observa que la nanoplata tiene un amplio rango de uso, encontrándose en 313 productos distintos (a fecha de marzo del 2011), seguido

a una distancia significativa por los nanotubos de carbono, que se encuentran en 91 productos distintos.

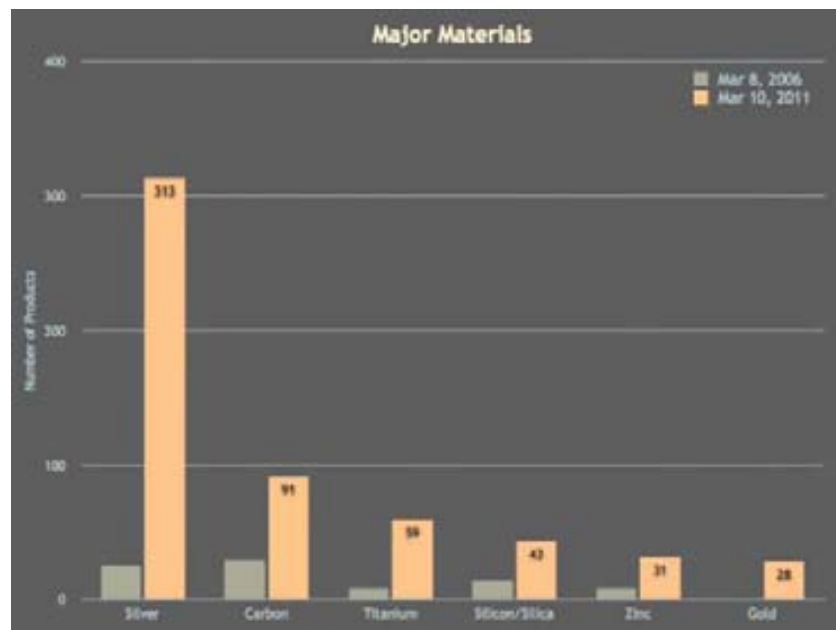


Figura 4: Número de productos que contienen nanomateriales en función del elemento que forma el compuesto. Se puede observar el crecimiento del número de productos del 2006 al 2011 para todos los elementos, dominando en términos absolutos los que tienen plata en su composición.

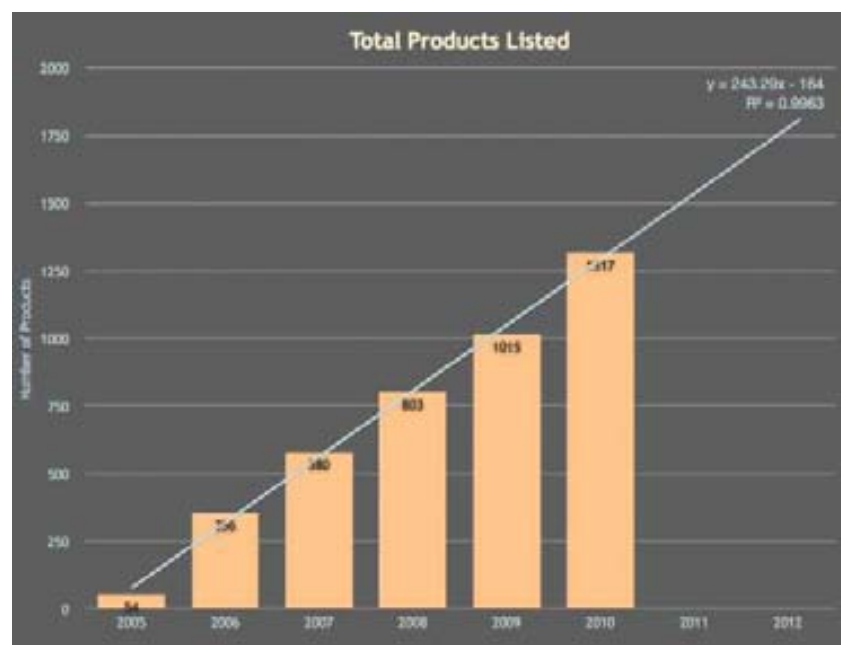


Figura 5: Número de productos a la venta en 24 países distintos (incluyendo los EEUU, China, Canadá y Alemania) que contienen nanopartículas. Se observa un incremento lineal de éstos a lo largo del tiempo, pudiéndose predecir un crecimiento importante de los mismos en un futuro próximo.

El auge de la nanotecnología ha hecho que el número de productos que contienen nanomateriales en su composición haya crecido de forma lineal desde 2005 (figura 5), que es cuando se empiezan a inventariar. Se prevé que este incremento se acelere, debido a la enorme inversión que se está realizando actualmente en este campo y a la implementación de la nanotecnología en nuevos campos (Woodrow Wilson Project of Emerging Nanotechnologies, 2009b).

1.4. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Al margen del uso extendido de los nanomateriales que existen actualmente, se espera que esta tecnología permita desarrollar nuevos compuestos y nuevas aplicaciones. Como en la mayoría de tecnologías revolucionarias, se están explorando de manera muy intensa sus distintas aplicaciones en el campo militar, ya sea para obtener mejoras en los materiales en uso, obtener nuevos materiales más ligeros y/o mejorar los blindajes (Ryu et al., 2012), así como en el desarrollo de materiales capaces de otorgar invisibilidad en el espectro lumínico (Valentine et al., 2009).

Sin embargo, uno de los campos donde se espera una mayor implementación de la nanotecnología es en el campo de la salud. Por ejemplo, el desarrollo de nuevos tipos de tratamientos contra el cáncer usando nanopartículas suscita un gran interés. Varias líneas de investigación están desarrollando nanopartículas capaces de detectar ciertos marcadores de membrana expresados en células cancerosas que, al hacerlo, introducirían en éstas el contenido de la nanopartícula con el objetivo de matarlas (Zhang y Misra., 2007; Veisheh et al., 2010). El desarrollo de este tipo de tratamientos permitiría la eliminación selectiva de células cancerosas. Siguiendo la misma línea, se está explorando el potencial de algunos tipos de nanopartículas de hierro para ser llevadas a un tumor dentro del cuerpo humano mediante campos magnéticos, para luego estimularlas con ondas de radio, con las que entrarían en resonancia, incrementado su temperatura hasta quemar el tejido tumoral (Jordan et al., 1999), o bien depositar agentes químicos para eliminarlas.

En otro frente, la elevada ratio superficie/volumen que los hace tan eficientes en procesos de catálisis, los puede llegar a ser muy útiles como partes integrales en herramientas para bioanálisis y técnicas de diagnóstico (Penn et

al., 2003; Martinez-Boubeta et al., 2010). Esta característica también las hace muy interesantes para su uso en biorremediación, ya que la gran cantidad de superficie disponible comportará que sean más eficientes para capturar distintos contaminantes. Así, diseñando el nanomaterial y la funcionalización de su superficie se puede conseguir que tenga una alta afinidad con el contaminante de interés para que se pueda eliminar del medio de manera específica (Yavuz et al., 2006). De hecho, en este campo ya se han desarrollado algunos nanomateriales que son capaces de mejorar la eliminación del arsénico del agua de forma muy eficaz (Yamani et al., 2012).

1.5. POSIBLES RIESGOS DE LOS NANOMATERIALES SOBRE LA SALUD

La rápida y creciente irrupción de la nanotecnología en la vida diaria está teniendo un gran impacto y beneficios palpables. Sin embargo, las mismas propiedades de los nanomateriales que despiertan tanto interés en determinados campos, son las mismas que han levantado suspicacias sobre sus posibles efectos perniciosos sobre la salud humana.

El pequeño tamaño de los nanomateriales es una de las principales causas de esta preocupación. A nivel de organismo, el tamaño de los nanomateriales puede permitir que éstos crucen varias barreras biológicas que otras partículas de mayor tamaño no pueden hacerlo. Se ha observado la translocación de varios tipos de nanomateriales a través del tracto gastrointestinal, probablemente debido a la absorción de moléculas orgánicas en su superficie, camuflándolas y permitiendo que éstas sean endocitadas y acaben en el torrente sanguíneo. Además, esta adsorción de moléculas en su superficie puede conllevar a que moléculas que no se hayan digerido o metabolizado sean absorbidas por el tracto gastrointestinal (Fröhlich y Roblegg, 2012).

En cuanto a los riesgos por inhalación, son varios los estudios experimentales *in vivo* que indican que ésta es baja, pese a que la translocación del nanomaterial puede ocurrir en los pulmones incluso cuando la dosis administrada, ya sea por instilación o inhalación, sea alta (Simko y Mattsson, 2010). La piel se considera que puede ser también una vía importante de entrada del nanomaterial en el organismo. Así, se han observado distintos grados de penetración en la piel por nanopartículas de oro, en función del tamaño de las mismas, siendo las más pequeñas las que presentan un índice

de penetración mayor (Sonavane et al., 2008). También se ha observado que las nanopartículas de hierro menores de 10 nm son capaces de penetrar en la piel humana de manera pasiva llegando al *stratum corneum* y a los folículos pilosos, y de manera excepcional, a la epidermis viable (Baroli et al., 2007).

En resumen, aunque la penetración a través de las barreras biológicas por parte de los distintos nanomateriales parece que es pequeña o limitada, los efectos que los nanomateriales pueden generar sobre éstas son objeto de preocupación ya que la mayoría de efectos perniciosos, desde la inflamación a los procesos cancerosos, podrían darse en las zonas que mantienen mayor contacto con los nanomateriales, ya que así parece ocurrir con otros tipos de partículas (Donaldson, 2002; Knaapen et al., 2004)

El tamaño también es un factor importante en la interacción del nanomaterial con la célula. Mientras que una nanopartícula puede tener un diámetro de 1 a 100 nm, una célula puede tener un diámetro medio de unos 10 μm , equivalente a 10.000 nm, es decir entre 100 y 10.000 veces mayor. Esta diferencia de tamaño comporta que un gran número de nanopartículas puedan interaccionar con la membrana de la célula y este rango de tamaño podría facilitar la endocitosis. La endocitosis de nanopartículas metálicas, y su posterior paso a iones en los lisosomas, se ha propuesto como un posible mecanismo de toxicidad celular. La solubilización de éstas en los lisosomas a su forma iónica permitiría que éstos entraran en el citoplasma e indujeran los efectos tóxicos, mientras que los iones libres fuera de la célula serían incapaces de entrar dentro e inducir el efecto tóxico, debido a los mecanismos celulares que lo evitarían (Park et al., 2010; Cronholm et al., 2013).

Hay que recordar que es en el rango nanométrico donde suceden la mayor parte de las interacciones bioquímicas, lo que implica que los nanomateriales podrían ser capaces, *a priori*, de interferir con estos procesos. Como ya se ha comentado, se han encontrado casos de nanopartículas que interaccionan con estructuras biológicas concretas, en este caso nanopartículas de oro de 55 nm con el surco mayor del DNA (Tsoli et al., 2005). También se ha postulado que los nanotubos de carbono podrían interferir con la segregación cromosómica debido a su interacción con los microtúbulos, ya que presentan una similitud estructural suficiente como para actuar de forma análoga (Sargent et al., 2010). Otro aspecto relacionado con la alta reactividad de los nanomateriales es que

su elevada superficie disponible podría conllevar a interacciones inespecíficas con distintas estructuras biológicas, lo que podría producir algún tipo de efecto tóxico.

Otro aspecto a destacar es la carga eléctrica, que puede llegar a tener influencia en el perfil toxicológico de los nanomateriales. Como ejemplo se pueden citar los efectos de las nanopartículas de cerio conjugadas con polímeros con una carga eléctrica distinta (neutra, negativa y positiva) en distintos tipos celulares observándose que, en función de este parámetro, las nanopartículas acaban en compartimientos celulares distintos, generando efectos tóxicos o no, dependiendo de ello (Asati et al., 2010).

Por lo tanto, existen cada vez más pruebas que apuntan a que varias de las características de los nanomateriales pueden modular el perfil toxicológico de los mismos. Este hecho conlleva a que dos nanopartículas del mismo material no tienen por qué ejercer los mismos efectos tóxicos, dado el posible efecto modulador de sus otras propiedades.

1.5.1. Posibles fuentes de exposición

Parece obvio que el gran incremento en el número de productos que contienen nanomateriales conllevará a que haya una mayor posibilidad de que éstos se depositen en el medio ambiente. Esta mayor presencia, incrementará la exposición humana a estos nuevos compuestos.

La exposición a los nanomateriales se puede dar en todas las fases de su ciclo de vida, es decir desde la fabricación del nanomaterial, su uso o la aplicación del producto que los contiene, su degradación en el ambiente, así como en su desecho como residuo o sometido al proceso de reciclado.

Durante la fabricación de los nanomateriales la población mayormente expuesta será aquella implicada directamente en el proceso de síntesis y producción. A diferencia de las grandes industrias clásicas, las industrias que fabrican nanomateriales suelen tener un número de operarios muy reducido, dificultando la posibilidad de realizar ensayos de biomonitorización, que es la herramienta clásica que ha permitido determinar el riesgo asociado a distintos procesos industriales; sin embargo, actualmente se están llevando a cabo investigaciones con la intención de simular escenarios de exposición ocupacional para desarrollar ensayos *in vivo*, que puedan determinar con

precisión cuál es el peligro al que están expuestos estos trabajadores (Yi et al., 2013).

En cuanto al riesgo por el uso de compuestos que contienen nanomateriales ya hemos visto que éstos se usan en un gran número de productos distintos, así que la posible exposición o interacción con el organismo es muy dependiente del tipo de uso que se le dé. En general, los nanomateriales se encuentran en los productos de dos formas distintas; en unas el nanomaterial se encuentra integrado en una matriz sólida, mejorando las propiedades de ésta, ya sea las propiedades físicas o catalíticas, u otorgándole propiedades nuevas, como podría ser un efecto antibacteriano. En otros casos los nanomateriales se encuentran dispersos, ya sea en una solución coloidal o como parte o componente de una sustancia no sólida (como por ejemplo cremas, detergentes o lociones). La diferencia entre estos dos tipos principales de integración en el producto afectará directamente a su posible interacción con células u organismos. Los nanomateriales integrados en una matriz sólida no tendrán un contacto directo con los organismos, a menos que la matriz en la que están integrados empiece a disgregarse a lo largo del ciclo de vida, pudiendo liberar, no sólo el nanomaterial en su forma pura durante la fase de fabricación, sino disgregados de la matriz en la que están integradas partículas del nanomaterial. Este fenómeno se ha descrito para nanotubos de carbono integrados en baterías de litio-carbono o en productos textiles (Köhler et al., 2008), así como en implantes de rodillas o caderas de cobalto-cromo de los cuales se pueden desprender nanopartículas como resultado de la fricción continuada (Papageorgiou et al., 2007).

En otros casos, algunos sectores de la población podrían verse expuestos a nanomateriales debido a la propia función de éstos, que se llevaría a cabo dentro del organismo. Así, aquellos pacientes que estuvieran sometidos a pruebas o tratamientos que involucraran el uso de nanomateriales podrían tener un cierto riesgo debido principalmente a las altas dosis usadas (serían dosis elevadas respecto a la exposición de la población general). En este caso, el nivel de riesgo sería aceptable en función de los potenciales beneficios que estos tratamientos tuvieran en el diagnóstico o tratamiento del sujeto.

Además de la exposición directa, la acumulación de los nanomateriales en el ambiente puede suponer una fuente de exposición secundaria. En estos casos

la pregunta pertinente es saber cuál es la persistencia de estos nanomateriales en el medio ambiente. Obviamente ésta puede variar mucho en función, tanto del material (metal/no metal) como de su forma (von der Kammer et al., 2012; McTeer et al., 2013; Yeo y Nam, 2013).

Muchos de los nanomateriales no son degradables *per se*, pero sí que puede pasar a su forma iónica y/o acumularse en microorganismos u otros organismos. El riesgo de su presencia en el medio ambiente puede depender de su biopersistencia. Así, los nanomateriales compuestos por óxidos de metales puros parecen ser más fácilmente solubles en medio acuoso, siendo por ejemplo las nanopartículas de zinc ejemplo de nanopartícula fácilmente soluble en medio acuoso. En este contexto cabe indicar que el efecto tóxico que pueda presentar un nanomaterial pueda depender de su existencia como nanopartícula o como forma soluble. En el caso de las nanopartículas de zinc, éstas parecen presentar un efecto tóxico debido a la solubilización en su forma iónica, que es la responsable de dicho efecto. En cambio, otras nanopartículas metálicas, como por ejemplo de óxido de cobre, su toxicidad parece depender más bien de su endocitosis como nanopartícula para con posteridad inducir un efecto tóxico. Esto se ha observado utilizando como modelo la línea celular A549, ya que la inactivación de la ruta que conlleva la autofagia de las partículas endocitadas mediante la 3-metiladenina, mejora significativamente la supervivencia celular (Sun et al., 2012).

La solubilidad, y por tanto la degradación de estas nanopartículas metálicas en el medio, se puede modificar mediante la funcionalización de su superficie, impidiendo que el óxido de metal esté en contacto con el medio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las moléculas también se pueden biodegradar, pudiendo quedar expuesta la nanopartícula a su posible solubilización en el medio. Por lo tanto, la biodegradación de las moléculas funcionalizadas también es un factor a tener en cuenta en la biopersistencia de las nanopartículas metálicas.

Otros nanomateriales, como sucede con los nanotubos de carbono, parecen ser mucho más biopersistentes. A nivel químico tienen cierto parecido con los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los cuales típicamente presentan resistencia a la degradación, aunque pueden acabar siendo biodegradados por diversos microorganismos. Los nanotubos de carbono podrían estar sujetos

también a degradación por medios físicos, aunque la alta hidrofobicidad de la gran mayoría de ellos hace probable su interacción con sedimentos porosos, dificultando su degradación. Probablemente este hecho lleve a que sea factible una bioacumulación de los mismos (Smith y Rodrigues, 2012). Existen estudios que indican que los nanotubos de carbono se pueden transformar a formas menos reactivas mediante métodos bioquímicos. Aunque esto se puede realizar fácilmente en el laboratorio, estas metodologías son de difícil aplicación *in situ* (Russier et al., 2011). Para tratar de disminuir su elevada persistencia actualmente se están sugiriendo distintos métodos de fabricación para que los nanotubos de carbono sean más biodegradables, por ejemplo introduciendo defectos en su estructura de manera deliberada, para que éstos sean más fácilmente atacados por enzimas (Bianco et al., 2011).

Independientemente de los procesos de degradación de los nanomateriales en el medio ambiente, lo que sí es cierto es que el incremento en el número de productos y en el número de toneladas de nanomaterial sintetizado en los próximos años, puede conllevar una elevada presencia de los mismos en el ambiente, actuando así como contaminantes en distintos ecosistemas acuáticos y terrestres (Handy et al., 2008); por lo tanto, el conocer como los nanomateriales pueden afectar los distintos ecosistemas, es un reto al que se debe dar una pronta respuesta.

Entre los distintos estudios desarrollados hasta el momento, se ha demostrado experimentalmente que las nanopartículas de oro son capaces de entrar en la cadena alimentaria de un modelo artificial de ecosistema de estuario marino, ecosistema en el cual se explotan especies de bivalvos y peces para consumo humano (Ferry et al., 2009). También se ha observado un efecto adverso en la reproducción de caracoles *Potamopyrgus antipodarum* expuestos a nanopartículas de óxido de cobre (CuO) presentes en el sedimento. Esta toxicidad es mayor que la observada en su forma iónica o en partículas micrométricas, apuntando a una mayor biodisponibilidad de la forma nanométrica respecto a las otras (Pang et al., 2012). Otros estudios llevados a cabo con nanotubos de carbono parecen indicar que sus efectos tóxicos, una vez asociados a sedimentos, son muy bajos incluso a concentraciones muy elevadas, comparadas con sus efectos en dispersión en medio acuoso. Sin

embargo, la posible resuspensión de estos sedimentos podría llegar a incrementar el riesgo potencial (Petersen et al., 2011).

Por lo tanto, el incremento en la cantidad de nanomateriales de origen antropogénico presentes en los distintos ecosistemas, puede conllevar a la posible acumulación de los nanomateriales en distintos segmentos del ecosistema, así como su posible bioacumulación en la cadena alimentaria. Dado el desconocimiento que se tiene, tanto de los procesos de degradación, bioacumulación y efectos tóxicos, se requiere obtener más información en todos los ámbitos sobre sus posibles efectos perniciosos.

1.5.2. Nuevos enfoques respecto a los nuevos retos planteados

A lo largo de la historia han ido apareciendo nuevas tecnologías y compuestos novedosos que han supuesto, mediante su integración en diferentes aplicaciones y procesos, una mejora en algún aspecto inmediato de la calidad de vida o productividad. Sin embargo, en algunos casos se han detectado con posteridad efectos sobre la salud humana suficientemente importantes como para restringir su uso e incluso prohibirlo por completo. Un claro ejemplo es el DDT cuyo uso incrementó de manera espectacular el rendimiento de la producción agrícola, debido a su capacidad de eliminar plagas, aunque sus efectos sobre la salud humana y biopersistencia, así como la aparición de resistencias, desembocaron en su prohibición en los países desarrollados a mediados de los 70. A pesar de esto se sigue usando en países en vías de desarrollo para evitar la propagación de mosquitos vectores de la malaria, y de manera ilegal (aunque minoritaria), en la producción agraria (Foss Hansen et al., 2008).

Debido a los casos acontecidos con otras anteriores tecnologías prometedoras, que han acabado presentando efectos adversos, se han obtenido una amplia experiencia sobre cómo enfocar estos retos al tiempo que se ha incrementado todos los sistemas de regulación del uso de agentes y compuestos que pueden suponer un riesgo. Así, la aparición de la nanotecnología, como una nueva tecnología de rápida implementación en la que existen sospechas sobre un posible efecto adverso para la salud humana y el medio ambiente, está suponiendo un importante esfuerzo por parte de las autoridades competentes

para determinar y caracterizar este potencial con vistas a establecer posibles efectos reguladores.

A nivel de regulación actual no se tiene en cuenta el tamaño de las unidades del material, sino que un material se regula independientemente de si es soluble o si se encuentra en el rango macrométrico o micrométrico. Así, si el material en su forma no nanométrica no genera efectos tóxicos en las baterías estandarizadas de ensayos toxicológicos, se ha dado luz verde a la forma nanométrica, considerando que era el mismo material y que ya había pasado por el proceso de evaluación. Sin embargo, la información acumulada en la última década empieza a considerar el tamaño de las partículas como un factor que puede influenciar el perfil toxicológico del compuesto. Esto está conllevando a que los distintos organismos legisladores se replanteen el posible riesgo de los nanomateriales y se estén subvencionando múltiples proyectos encaminados a dilucidar los aspectos toxicológicos de los nanomateriales, en vista a su futura regulación.

1.5. EL PROYECTO NANOGENOTOX

Dentro de este contexto, en el que se están replanteando las estrategias para la regulación de los nanomateriales, se han detectado lagunas importantes en nuestro conocimiento sobre las capacidades tóxicas y especialmente genotóxicas de estos compuestos, siendo ésta una de las cuestiones clave a resolver. Así, los resultados obtenidos a veces contradictorios y la falta de evidencia científica sobre la seguridad de su uso dificultan la actuación de las autoridades desde un punto de vista regulatorio. Para paliar esta falta de información, la EAHC (*Executive Agency for Health and Consumers*) concedió en 2009 una subvención a través del segundo programa de la Comunidad Europea en el campo de la salud (2008-2013) para una acción conjunta (JA; *Joint Action*) englobada en la “Seguridad de los nanomateriales” denominada proyecto Nanogenotox. Este proyecto se inició en Marzo de 2010 para un periodo de 3 años. Un total 16 instituciones de 11 países de estados miembros de la Comunidad Europea han formado parte de esta acción conjunta (figura 6), que ha sido coordinada por ANSES (*Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail*) de Francia, con sede en Paris.



Figura 6: Integrantes de la acción conjunta del proyecto Nanogenotox.

La acción conjunta se ha separado en distintos bloques de trabajo (*Work Packages*; WP) Los WP 1, 2 y 3 se han dedicado a la coordinación, organización y diseminación del trabajo del proyecto, mientras que el trabajo experimental se ha desarrollado en los WP 4, 5, 6 y 7. El WP4 se ha dedicado a desarrollar un método de dispersión que fuera aplicable a todos los nanomateriales utilizados en el proyecto y a la caracterización de las distintas propiedades de éstos, tanto en su forma sin dispersar como una vez dispersados En el WP5 se han desarrollado los ensayos *in vitro* con distintos tipos celulares con el objetivo de identificar las líneas celulares más sensibles y los nanomateriales que presentan un efecto tóxico más pronunciado con la idea llevar a cabo un estudio de validación (*Round Robin test*) para determinar la reproducibilidad de los ensayos usados y la fiabilidad de los datos obtenidos. Los ensayos *in vivo* por distintas rutas de exposición se han llevado a cabo por el WP6, y los estudios de la toxicocinética y bioacumulación de los nanomateriales se ha realizado en el WP7.

El objetivo de la acción conjunta ha sido de trabajar hacia el establecimiento de un método robusto (específico, a la vez que sensitivo) para caracterizar el

potencial genotóxico de los distintos nanomateriales y generar información sobre los efectos genotóxicos de varios tipos de los nanomateriales que se pueden encontrar de manera más común en productos que están al abasto del consumidor.

Como punto inicial del proyecto, y para determinar aquellos aspectos donde falta información relevante, se realizó de manera previa una recogida de información a través de la búsqueda bibliográfica. De manera más específica los tres puntos más relevantes del WP5 han sido la relación de los materiales a utilizar, las líneas celulares que pudieran ser relevantes de cara a la exposición a los nanomateriales y, finalmente, los ensayos de genotoxicidad con mayor importancia y relevancia en cuanto a indicadores del riesgo genotóxico.

1.5.1. Nanomateriales utilizados

La selección inicial de los nanomateriales a ensayar se basó en la utilización y difusión de los mismos en los productos de consumo. Así, se optó por escoger compuestos de dióxido de titanio, nanosílice y nanotubos de carbono. Dado que distintas características de los nanomateriales como tamaño, estructura cristalina, método de síntesis, entre otros, pueden afectar la toxicidad, se seleccionaron distintos compuestos de cada grupo; todos ellos suministrados por el JRC (*Joint Research Center* en Ispra, Italia). Así, de sílice amorfa sintética (SAS) se seleccionaron 4 compuestos, de dióxido de titanio (TiO_2) se seleccionaron 5, mientras que de nanotubos de carbono (CNT) se seleccionaron 6. Es decir, un total de 15 compuestos. Estos nanomateriales fueron elegidos debido a que se encuentran con elevada frecuencia en productos al alcance del consumidor, además, son representativos del espectro de nanomateriales que se pueden encontrar actualmente en el mercado (tabla 1). La elección del tipo de nanomateriales dentro de cada grupo, se llevó a cabo en función de distintos criterios, siempre con el objetivo de que hubiera una variedad representativa de los que se pueden encontrar en productos actualmente en el mercado. Entre los compuestos de SAS se seleccionaron en función de su uso en distintas aplicaciones y de su método de síntesis. En el caso de las nanopartículas de TiO_2 , no sólo se han seleccionado para tener nanopartículas involucradas en usos distintos, sino también para que hubiera tipos con distinta estructura cristalina. Entre los nanotubos de carbono el

criterio fue tener nanomateriales con distintas características físicas: distinto diámetro, longitud, rigidez, etc. La descripción de los materiales utilizados se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1: Listado de los nanomateriales utilizados en el proyecto Nanogenotox. En la tabla se pueden observar sus usos mayoritarios así como su estructura cristalina o método de síntesis.

| | Referencia | Tipo | Usos mayoritarios | Analizado en WP5 |
|------------------|------------|------------------------------|---|------------------|
| TiO ₂ | NM-100 | Anatasa | Papel, caucho, cosméticos, adhesivos, pinturas | No |
| | NM-101 | Anatasa | Catalizador, catalizador semiconductor en procesos fotocatalíticos | No |
| | NM-102 | Anatasa | Fotocatalítico | x |
| | NM-103 | Rutilo | Cosméticos (protección solar, coloración), productos farmacéuticos, aditivo alimentario | x |
| | NM-104 | Rutilo | | x |
| | NM-105 | Anatasa/Rutilo | Catalizador, estabilizador de calor | x |
| SAS | NM-200 | Precipitado | Procesado de alimentos | x |
| | NM-201 | | Refuerzo estructural, propiedades ópticas | x |
| | NM-202 | Pirólisis | Tintas, adhesivos, cosméticos, productos farmacéuticos, alimentos | x |
| | NM-203 | | Alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos | x |
| CNT | NM-400 | Deposición química por vapor | Compuesto estructural y aplicación en procesos energéticos | x |
| | NM-401 | | | x |
| | NM-402 | | | X |
| | NM-403 | | | X |
| | NRCWE006 | | Batería litio/iónica | X |
| | NRCWE007 | | Compuesto estructural | X |

Según la legislación actual, para que se apruebe el uso de un compuesto determinado, sobre todo si va a formar parte de productos a los cuales los consumidores van a estar expuestos, éste tiene que ser evaluado en una serie

de ensayos para determinar su potencial efecto sobre la salud humana. En esta batería de ensayos, los primeros suelen ser ensayos *in vitro* ya que son fáciles de realizar, baratos y se llevan a cabo en un tiempo relativamente corto, sobretodo comparado con los ensayos de carcinogénesis *in vivo*. Evidentemente, la fiabilidad de que los resultados obtenidos en estos ensayos sean equiparables al efecto del compuesto, en casos de exposición humana reales, es menor que los obtenidos en los ensayos *in vivo*. En este tipo de baterías para la detección de riesgos potenciales, los ensayos *in vitro* forman parte de la primera línea de ensayos y, en el caso que haya sospechas sobre un posible efecto genotóxico, se procede a realizar ensayos complementarios *in vivo*. En consecuencia, la cuestión principal por lo que se refiere a la genotoxicidad de los nanomateriales, consiste en determinar hasta qué punto estos ensayos *in vitro* se pueden usar para revelar el potencial genotóxico de los nanomateriales, cuáles de ellos son adecuados para esta función y que modificaciones precisarían para el estudio de estos compuestos.

Otro aspecto relevante en los estudios *in vitro* es el tipo celular con el que se va a llevar a cabo el ensayo. Idealmente, el tipo celular a escoger debería ser representativo de las rutas de exposición más probables: pulmonar, intestinal y dérmica.

1.5.2. Tipos celulares utilizados

En base a la información bibliográfica y la experiencia de los grupos participantes, se seleccionaron distintas líneas celulares representativas de los distintos tejidos que pueden constituir el blanco de los nanomateriales. Como modelos de la exposición pulmonar se seleccionaron las líneas BEAS-2B y 16-HBE que son de origen broncoepitelial, así como la línea A549, que es de origen alveolar. Como modelo de exposición intestinal se utilizó la línea Caco-2, en su versión no diferenciada, mientras como modelo de exposición dermal se seleccionó la línea NHEK. Los linfocitos humanos se escogieron como modelo de exposición general y, para el ensayo de linfoma de ratón se usó la línea celular L5178Y TK^{+/-} que es heterocigota para el gen timidina quinasa (TK).

Dado el elevado número de tipos celulares seleccionados, los distintos grupos utilizaron un número limitado de éstos. Así, a nuestro grupo se le asignó la

utilización de las líneas BEAS-2B, Caco-2 y 16-HBE, de las que se va a dar una pequeña descripción.

Las células Caco-2 constituyen una línea celular cancerosa establecida a partir de un adenocarcinoma colorectal. Presentan diferenciación espontánea si se mantienen en cultivo durante un largo periodo de tiempo tras alcanzar la confluencia, expresando, en estas condiciones, varias características típicas de los enterocitos del intestino delgado (Sambuy et al., 2005). Esta línea se ha seleccionado como una posible diana representativa de la exposición a nanomateriales por ingestión.

La línea celular BEAS-2B proviene de células epiteliales de pulmón obtenidas a partir de la autopsia de un individuo sin patología cancerosa. Éstas se transformaron con un adenovirus híbrido 12-SV40 (Ad12SV40) deficiente en cuanto a su capacidad de replicación y posteriormente clonadas (Reddel et al., 1988). Esta línea celular se ha seleccionado para ser considerada como representativa de la exposición a nanomateriales por vía respiratoria.

Finalmente la línea 16HBE 14-o (abreviada 16HBE) se desarrolló originalmente a partir de cultivos primarios de tejido broncoepitelial humano transformado con un adenovirus SV40 (Cozens et al., 1994). Estas células mantienen varias características de las células broncoepiteliales diferenciadas, como por ejemplo la formación de uniones estrechas y el transporte iónico vectorial. La línea celular 16HBE se seleccionó como una posible línea celular representativa de la exposición a nanomateriales por vía respiratoria.

1.5.3. Ensayos de genotoxicidad

Inicialmente se establecieron tres tipos de marcadores: Daño primario en el DNA (normalmente roturas), daño cromosómico (roturas y aneuploidias) y mutación génica.

Para determinar el daño primario en el DNA se usó el ensayo del cometa, tanto la versión alcalina como la versión complementada con el uso del enzima formamido pirimidina glicosilasa (FPG). El ensayo del cometa se basa en la inclusión de células en una matriz de agarosa donde, mediante varios tratamientos, se consigue la eliminación de las estructuras celulares quedando únicamente el DNA superenrollado en la matriz (nucleoide). Al realizar una electroforesis en un medio alcalino, aquellos lazos que han sufrido alguna

rotura de simple o doble cadena, y que por lo tanto han relajado su estructura, migrarán hacia el ánodo, asemejándose a la forma de un cometa, cuando se utiliza tinción específica en un microscopio de fluorescencia.

Aunque los primeros experimentos con células individualizadas se remontan a 1978 (Rydberg and Johanson, 1978) no es hasta 1984 que se aplica por primera vez un campo eléctrico al gel (Ostling y Johanson, 1984). Posteriormente se introdujo la lisis alcalina (a $\text{pH} > 13$; Singh et al., 1988) que permite observar no sólo las roturas de doble cadena, sino también las roturas de cadena simple, así como los sitios álcali-lábiles. La introducción de protocolos que incluyen la incubación del gel con enzimas que detectan bases dañadas (generalmente FPG) permite la detección de daño oxidativo a nivel de bases del DNA, ya que estas enzimas están implicadas en el proceso de reparación por escisión del nucleótido que contiene la base dañada.

El ensayo del cometa tiene algunas ventajas interesantes, la más evidente es su alta sensibilidad, que permite detectar daño en el DNA a concentraciones muy bajas del agente; otra ventaja consiste en que se obtiene el valor del daño de cada célula, lo que permite detectar diferencias intercelulares, tanto en daño como en reparación. Además, este ensayo permite trabajar con células no proliferativas que es especialmente importante cuando se trabaja con muestras de un organismo vivo. Su sencillez y rapidez ha hecho que este ensayo se haya expandido de forma extraordinaria, aplicándolo a numerosos campos de la biología.

Aunque la manera clásica de medir daño cromosómico ha sido mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas, que mide aberraciones de tipo estructural, la complejidad de este ensayo ha hecho que se haya substituido por el denominado ensayo de micronúcleos. Este ensayo se usa para detectar agentes que tienen la capacidad de afectar la estructura del cromosoma o interferir con la segregación durante la división celular, y se basa en la detección en el citoplasma de pequeñas masas de cromatina llamadas micronúcleos, las cuales están rodeadas también por una membrana nuclear. Éstos se forman como consecuencia de la pérdida de un fragmento cromosómico o de un cromosoma entero, debido a una rotura o a una segregación incorrecta durante la mitosis. El ensayo de micronúcleos se desarrolló inicialmente en 1975 (Schmid, 1975) y, entre las posteriores mejoras,

destaca la llevada a cabo por Fenech y Morley (1985) quienes incluyeron en el ensayo el uso de la citocalasina-B (que es un compuesto que impide la citocinesis sin afectar la cariocinesis) lo que permite identificar en la población de células a analizar, aquellas que se han dividido en el cultivo, debido a su aspecto de células binucleadas. Actualmente es uno de los ensayos de evaluación de daño genético más usados, sobre todo cuando se plantea el tema del riesgo, dada la asociación encontrada entre frecuencia elevada de micronúcleos e incidencia de cáncer (Bonassi et al., 2006). La ventaja principal de este ensayo es que detecta daño fijado en la célula, con lo que se puede calcular el nivel de daño de un individuo o una población celular de manera precisa y con pocos medios. En todos los experimentos se ha usado citocalasina-B con la intención de impedir la citocinesis, menos en la línea celular 16-HBE.

Además, algunos laboratorios han usado el ensayo de linfoma de ratón para detectar mutaciones puntuales. Este ensayo se basa en el uso de la línea celular L5178Y, que presenta heterocigosis para el gen TK (timidina quinasa), cuyo producto se encarga de reciclar la timidina, que acabará incorporada al DNA. Las células se cultivan con varias concentraciones del compuesto a analizar, en presencia y ausencia de la fracción S9 de hígado de ratón, en un medio con presencia de trifluorotimidina. Este compuesto es un análogo de la timidina que presenta toxicidad cuando es metabolizada por la célula, debido a su interferencia con el metabolismo del DNA. Por lo tanto, aquellas células que hayan sufrido una mutación puntual en el alelo funcional del gen TK, serán capaces de crecer en un medio con trifluorotimidina.

1.5.4. Desarrollo del proyecto

El desarrollo del WP5 ha sido complejo y, para alcanzar el objetivo previsto, que es el de obtener protocolos robustos para ensayar, se plantearon dos fases. Una inicial con todos los compuestos, líneas celulares y ensayos para, en una segunda fase, seleccionar algunos de sus componentes para ser replicados, utilizando los mismos protocolos, en distintos laboratorios, para ver la bondad (reproducibilidad) de los protocolos propuestos. Teniendo en cuenta que el potencial carcinogénico de un nanomaterial puede venir determinado por una vía no genotóxica, nosotros hemos incluido una tercera fase para detectar

el potencial transformante de estos nanomateriales seleccionados, aspecto no incluido en el proyecto Nanogenotox.

1.5.4.1. Primera fase: *Screening*

El Grupo de Mutagénesis de la UAB ha estado involucrado en la fase de *screening*, realizando el ensayo del cometa utilizando tres líneas celulares, cada una con un subconjunto de nanomateriales distinto (tabla 2). En este caso se ha procedido a realizar ensayos del cometa en dos tiempos de tratamiento por cada ensayo: 3 y 24 horas. El objetivo era determinar qué líneas celulares y qué ensayos presentan una mayor sensibilidad frente al tratamiento con nanomateriales, así como determinar cuáles de éstos presentan algún tipo de efecto genotóxico.

Tabla 2: Trabajo experimental desarrollado en el WP5, en gris el trabajo asignado al Grupo de Mutagénesis. CBMN, *Cytokinesis-blocked micronucleus assay* (ensayo de los micronúcleos).

| | | Tejido diana | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-----|--------------|-----------|---------|------|--------|------|-----------|------|--------|------|------------|------|-------------------|
| | | Pulmón | | | | | | Intestino | | Piel | | Linfocitos | | TK ^{+/+} |
| | | 16HBE | | BEAS-2B | | A549 | | Caco-2 | | NHEK | | | | |
| | | Cometa | CBMN | Cometa | CBMN | Cometa | CBMN | Cometa | CBMN | Cometa | CBMN | Cometa | CBMN | |
| Nanomaterial | SAS | -NM200 | | | | | | | | | | | | |
| | | -NM201 | | | | | | | | | | | | |
| | | -NM202 | | | | | | | | | | | | |
| | | -NM203 | | | | | | | | | | | | |
| MWCNT | | | -NM400 | | | | | -NM400 | | | | | | |
| | | | -NM401 | | | | | -NM401 | | | | | | |
| | | | -NM402 | | | | | -NM402 | | | | | | |
| | | | -NM403 | | | | | -NM403 | | | | | | |
| | | | -NRCWE006 | | | | | -NRCWE006 | | | | | | |
| | | | -NRCWE007 | | | | | -NRCWE007 | | | | | | |
| TiO ₂ | | | | | | | | | | | | | | |

1.5.4.2. Estudio de validación: *Round Robin test*

Del análisis de los resultados obtenidos en la etapa inicial no se pudo concluir que hubiera un tipo celular mucho más sensible que los otros, ni que un ensayo produjera una mejor detección de genotoxicidad que los otros. Así, por

consenso, se llegó al acuerdo de seleccionar dos líneas celulares (BEAS-2B y Caco-2) y dos ensayos (cometa y micronúcleos), así como un nanomaterial de cada grupo, representativo del mismo y que hubiera generado indicios de genotoxicidad en la etapa inicial. Con estos componentes se llevó a cabo la segunda fase del proyecto denominada *Round Robin test*, que no es más que un proceso de validación en el que, utilizando idénticos protocolos en cada laboratorio se replican experimentos para ver la homogeneidad de los resultados obtenidos. Así, de los 12 grupos participantes en esta fase, 6 evaluaron los productos seleccionados, con los dos ensayos utilizando la línea BEAS-2B (entre los que ha estado incluido el Grupo de Mutagénesis de la UAB), mientras que los otros 6 grupos han realizando lo mismo con la línea Caco-2.

1.5.4.3. Tratamientos de larga duración

Las investigaciones realizadas *in vitro* sobre los efectos tóxicos y genotóxicos de los nanomateriales, así como con otros compuestos, generalmente usan dosis y concentraciones muy elevadas y tiempos de tratamiento cortos, no superiores a 24-48 h, con el objetivo de ser capaces de detectar los posibles efectos tóxicos. Es obvio que este tipo de tratamiento no mimetiza los tipos de exposición que se dan *in vivo*. Una alternativa, quizás más realista y acorde con lo que sucede en exposiciones humanas, es bajar las dosis a estudiar y alargar las exposiciones a períodos de varias semanas para detectar lo que sucede en estas condiciones.

Mientras que en los ensayos de corta duración sólo se pueden valorar efectos genotóxicos, los de larga duración permiten no tan sólo detectar efectos genotóxicos sino carcinogénicos. Hay que recordar que, aunque un agente genotóxico se considera como un agente carcinogénico por el papel inicial que tiene la mutación en el proceso tumoral, lo contrario no es cierto. Así, los agentes carcinogénicos pueden actuar por otras vías, potenciando la capacidad expansiva de las células previamente mutadas. Hay que recordar el ejemplo del amianto que, pese a ser un potente agente carcinogénico no es considerado como un agente genotóxico y, en este contexto, hay que recordar las similitudes que parece existir en su manera de afectar a las células entre los nanotubos de carbono y el amianto. Así, los tratamientos de larga duración

tienen una doble ventaja. Por una parte se puede obtener información sobre la actividad genotóxica de un determinado nanomaterial, en condiciones de exposición más equivalente a lo que puede suceder en condiciones naturales y, por otra parte, se puede obtener información sobre su potencial carcinogénico. Para ello, los ensayos de genotoxicidad se deben complementar con otros ensayos que miden la capacidad transformante del material ensayado, sobre la línea celular utilizada. En este tipo de tratamiento hemos utilizado distintas metodologías para a) determinar si el compuesto ha sido capaz de entrar en las células tratadas, b) si es capaz de inducir estrés oxidativo, produciendo incrementos en los niveles endógenos de ROS (especies reactivas de oxígeno), c) si determinados genes ligados a procesos de inflamación y de respuesta a estrés oxidativo cambian su expresión tras las exposiciones y d) si el tratamiento supone cambios en la manera de crecer de las células, dejando su dependencia del sustrato y pudiendo crecer en medio semilíquido. Esto se diserta a continuación.

a) Internalización de los nanomateriales

Un punto relevante en los estudios con nanomateriales es poder demostrar su internalización en las células expuestas. Existen distintas metodologías para esta visualización, siendo el uso de la microscopía electrónica y la citometría de flujo las utilizadas en este estudio. En el caso del TEM (*transmission electron microscopy*), ésta es una técnica que ha permitido la observación de distintas muestras con una resolución mucho más alta que la de los microscopios ópticos (Williams y Carter, 1996) debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones pudiendo alcanzar, en consecuencia, una resolución mucho mayor de las imágenes tomadas. Desde el inicio de esta técnica, se desarrollaron rápidamente modificaciones para poder observar muestras biológicas (Porter et al., 1945). Este hecho ha permitido que actualmente se puedan observar las estructuras internas de la célula, así como la internalización de partículas extrañas, incluidos nanomateriales, en caso de que ésta existiera.

Por lo que se refiere a la tecnología de citometría de flujo, ésta está basada en el paso de células individuales por un tubo transparente en el que incide un láser. El pase de las células modifica la transmisión de la luz, así como la

dispersión de ésta, información que es recogida por unos dispositivos de detección. Esta tecnología ha permitido desarrollar multitud de aplicaciones que permiten medir desde el recuento y clasificación de distintos tipos de células (De Rosa and Roederer, 2001), la viabilidad celular (Nicoletti et al., 1991), la fase del ciclo celular en la que se encuentran (Rabinovitch et al., 1988) o la detección de biomarcadores específicos (Pala et al., 2000; Barnard, 2012) hasta la internalización de nanopartículas (Suzuki et al., 2007). En este caso la citometría de flujo mide la complejidad celular, en el sentido de que cuantas más partículas se internalizan en el interior celular, mayor es la intensidad de la luz refractada.

b) Inducción de ROS endógenas

La entrada de las nanopartículas en el interior de las células puede generar una serie de reacciones entre las que cabe destacar el denominado estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede generar distintos tipos de daño como daño oxidativo en el DNA, apoptosis y alteración de la expresión de genes ligados con la inflamación, por lo que existen diversos caminos para detectarlo. Una manera fácil, útil como primera aproximación para ver si determinado nanomaterial actúa mediante este mecanismo es utilizar compuestos que, una vez oxidados, pueden visualizarse y cuantificarse de manera sencilla. Así, mediante la adición del compuesto DCFH-DA (2'-7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato) se puede detectar la presencia de ROS intracelular ya que el DCFH-DA entra fácilmente en el citoplasma y allí puede ser transformado a DCF (2'-7'-dicloro-dihidro-fluoresceína) mediante la acción de esterasas y, en caso de haber agentes oxidantes, pasar a su forma oxidada que es la que emite la fluorescencia al incidir una luz láser sobre ésta. Por otra parte, con el parámetro SCC (*side-scatter complexity*) se puede analizar la densidad de la muestra de células, donde un incremento de la misma estaría indicando un incremento de la internalización (Suzuki et al., 2007). Este ensayo permite la medición de la generación de daño oxidativo dentro de la célula y a la vez la internalización del nanomaterial (Toduka et al., 2012). La sencillez del ensayo, y la buena correlación con los resultados obtenidos con metodologías más complejas, ha hecho de este ensayo una metodología muy utilizada en

diversos campos, incluidas aquellos que evalúan los efectos inducidos por nanomateriales (Aranda et al., 2013).

c) Cambios en la expresión génica

Otra manera de visualizar los efectos inducidos por los nanomateriales es detectar si los tratamientos inducen cambios significativos en la funcionalidad de algunos genes involucrados en distintos procesos como la respuesta al estrés oxidativo o procesos inflamatorios. Dichos cambios se pueden detectar a nivel de proteína (Western blot) o de mRNA (RT-PCR). Estas son las dos técnicas que hemos utilizado en nuestros estudios con exposiciones crónicas.

-Western blot

El Western blot es un ensayo que permite detectar específicamente una proteína concreta en una mezcla compleja de proteínas, mediante la electroforesis de un gel en la que se separan las proteínas desnaturalizadas por tamaño. El objetivo del uso de este ensayo es la detección de una serie de proteínas que indican la existencia de una respuesta celular a la presencia de daño oxidativo o de otro tipo de efecto. En nuestro caso hemos decidido detectar los cambios en la expresión de HMOX-1 (hemooxigenasa-1), proteína involucrada en la respuesta al estrés oxidativo. Muchos agentes que inducen ROS activan una batería de genes involucrados en la respuesta antioxidante, de las cuales la hemooxigenasa-1 es una de las proteínas ejecutoras de la respuesta a este tipo de estrés, catalizando la degradación de heme a biliverdina, hierro y monóxido de carbono. Cabe destacar que su expresión viene dada no sólo como respuesta a daño oxidativo sino también a la presencia de metales pesados, hipoxia o presencia de citoquinas (Kikuchi et al., 2005).

-RT-PCR

La RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) es una variante de la PCR (*polymerase chain reaction*) que permite la detección de los niveles de expresión de RNA (Freeman et al., 1999). Esta técnica se basa en la retrotranscripción (o transcripción inversa) de los RNA presentes en la célula mediante el uso de una retrotranscriptasa, obteniendo el DNA complementario

(cDNA) del conjunto de moléculas de RNA presentes. El cDNA obtenido es usado como molde en una PCR estándar, donde sólo se amplificarán aquellos cDNA de las moléculas del RNA de interés, de las cuales se habrán añadido los cebadores correspondientes, con el objetivo de que se lleve a cabo esta amplificación. En nuestro caso se ha decidido determinar si existe un incremento en la expresión del RNA de distintas interleucinas (un grupo de moléculas de señalización) ligadas al sistema inmune y, por lo tanto, a procesos inflamatorios. Las razones han sido que se ha observado *in vivo* el incremento de genotoxicidad en tejidos cercanos a aquellos que presentan inflamación (Westbrook et al., 2011) y que hay indicios claros de que la inflamación crónica está relacionada con un incremento en la incidencia de procesos carcinogénicos (Coussens y Werb, 2002; Reuter et al., 2010). Las interleucinas de las cuales se ha medido su nivel de expresión han sido la IL-1 β , IL-6 y la IL-8. Aparte, se ha medido también en los niveles de expresión de la hemoxigenasa-1.

d) El ensayo del *soft-agar* (*soft-agar assay*)

La posibilidad de encontrar ensayos *in vitro* que mimeticen el proceso oncogénico ha sido una meta a la que se han dedicado muchos esfuerzos con diversos resultados. Los primeros ensayos, denominados de transformación, median la capacidad de que las células iniciaran un crecimiento en multicapa dentro de la placa de cultivo (Vanparys et al., 2012). Obviamente, estos ensayos *in vitro* cortos de carcinogénesis evitan los largos y complejos ensayos *in vivo* de dos años de duración, siendo capaces de medir algunas fases del proceso carcinogénico, como puede ser la transformación morfológica, la adquisición de inmortalidad celular y la formación de foci asociados con el crecimiento en agar semilíquido sin necesidad de anclarse a la superficie de la placa de cultivo.

En nuestro caso hemos utilizado el ensayo del *soft-agar assay* que es un ensayo *in vitro* que permite medir la capacidad de las células de crecer sin estar ancladas a una superficie. Esta posibilidad es un marcador de dediferenciación celular, ya que conlleva una pérdida de las características propias y de los mecanismos inhibidores que acaba permitiendo el crecimiento sin anclaje. Para llevar a cabo este ensayo, las células (en nuestro caso BEAS-

2B) se siembran en una matriz de agar, si son capaces de crecer sin anclaje crecerán formando colonias, que posteriormente serán cuantificadas y comparadas entre tratamientos. No tan sólo el número de colonias que crecen en estas condiciones es un factor importante sino que medir el tamaño de las mismas también resulta ser un parámetro indicativo de la potencia transformante del tratamiento. Que estos foci que crecen en suspensión en el agar corresponden a un proceso oncogénico se puede demostrar inyectando dichas células en ratones, donde son capaces de generar tumores, como se observa en células tratadas con arsénico (Huang et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Dado que esta Tesis se ha desarrollado en el marco del proyecto europeo Nanogenotox, nuestros objetivos han sido fundamentalmente los determinados por el proyecto.

Así, se ha tenido como objetivo principal el establecimiento de una metodología robusta que permita el estudio sistemático del potencial genotóxico de los nanomateriales para ser usada como herramienta en procesos regulatorios.

- Para ello, se ha desarrollado una primera fase de *screening* con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre las capacidades genotóxicas de distintos nanomateriales introduciendo múltiples variables (nanomaterial, línea celular, ensayo, protocolos,..) para seleccionar aquellas más prometedoras para una correcta evaluación genotóxica de los nanomateriales.
- El objetivo de la segunda fase ha sido evaluar la robustez de la metodología seleccionada mediante la realización de un estudio de validación (*Round Robin test*) con algunos ensayos de genotoxicidad y líneas celulares seleccionados a partir de los resultados obtenidos en la primera fase. Fruto de este estudio de intercalibración se debe comprobar la bondad del protocolo propuesto.

Aparte de los objetivos planteados por el proyecto Nanogenotox, se han establecido otra serie de objetivos ligados a determinar el riesgo que la exposición a nanomateriales puede suponer, pero utilizando experimentos crónicos a bajas dosis y 4 semanas de exposición. Esto se concreta en:

- Determinar el posible efecto genotóxico y su evolución, a lo largo del tiempo, de las exposiciones de dos tipos de nanomateriales distintos (MWCNT y TiO₂) para comparar sus efectos con los obtenidos en los ensayos cortos (con dosis agudas), realizados en el proyecto Nanogenotox.
- La obtención de información complementaria sobre el riesgo de los nanomateriales mediante la utilización de otros ensayos no específicamente genotóxicos, como por ejemplo la determinación de la

aparición de marcadores de iniciación tumoral mediante el ensayo del *soft-agar*.

- La observación de la internalización de los nanomateriales en las células mediante TEM y citometría de flujo.
- La detección de alteración en los patrones de expresión de genes ligados con la respuesta al estrés oxidativo y a la respuesta inflamatoria.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Como ya se ha indicado, en este estudio se ha utilizado una selección de nanomateriales incluidos en el proyecto Nanogenotox, así como tres líneas celulares distintas. La evaluación del daño genotóxico se ha evaluado utilizando los ensayos del cometa y de micronúcleos. Se han utilizado también otros ensayos como el western blot, la RT-PCR, la medición de ROS intracelulares y la internalización de los nanomateriales mediante DCFH-DA y TEM, así como el ensayo del *soft-agar* para determinar la existencia de transformación celular. Todos estos experimentos se han utilizado en los tratamientos crónicos llevados a cabo para determinar otros efectos que pudieran tener los nanomateriales sobre las células utilizadas.

3.1. LÍNEAS CELULARES

Hay que señalar que el Grupo de Mutagénesis no tenía experiencia previa en la manipulación de las tres líneas celulares que se han usado en este estudio, por lo que se debió proceder a su puesta a punto y establecer las condiciones óptimas de cultivo. A continuación se realiza una breve descripción de cada una de las líneas utilizadas.

a) Caco-2

Como se ha comentado anteriormente, esta línea celular es representativa del tracto gastrointestinal, presentando características típicas de las células del intestino delgado. Estas células se cultivan en medio MEM + glutamax (Labclinics) + 10% FBS (Labclinics) + 1% de aminoácidos no esenciales (PAA) + 1% antibióticos (penicilina/ estreptomycin; Labclinics)

b) BEAS-2B

Esta línea celular es representativa de la vía respiratoria superior, ya que proviene de tejido broncoepitelial. La línea celular BEAS-2B se cultiva en medio BEGM (medio BEBM más aditivos; Lonza), el cual no contiene FBS.

c) 16HBE

Esta línea celular también proviene de tejido broncoepitelial, como la línea BEAS-2B, aunque en este caso mantienen características propias de células broncoepiteliales diferenciadas (formación de uniones estrechas y transporte iónico vectorial). Se cultivan en medio MEM + glutamax + 10% FBS + 1% de aminoácidos no esenciales + 1% antibióticos (penicilina/ estreptomycin)

3.2. NANOMATERIALES

Los nanomateriales utilizados en este proyecto fueron proporcionados por el JRC (*Joint Research Centre*, Ispra, Italia), cada uno en 8 viales (tabla 3). Hay que exceptuar los nanomateriales NRCWE006 y NRCWE007, que fueron proporcionados por el NRCWE (*National Research Centre for the Working Environment*, Copenhague, Dinamarca).

Tabla 3: Tabla con los nanomateriales utilizados en el proyecto NANOGENOTOX. En gris se señalan aquellos compuestos utilizados en la segunda fase.

| Nanomateriales | | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|----------|----------|-------|-------|
| TiO ₂ | | | MWCNT | | | SAS | |
| NM100 | NM101 | NM102 | NM400 | NM401 | NM402 | NM200 | NM201 |
| NM103 | NM104 | NM105 | NM403 | NRCWE006 | NRCWE007 | NM202 | NM203 |

3.2.1. Dispersión de los nanomateriales (protocolo Nanogenotox)

Uno de los objetivos principales del proyecto ha sido desarrollar una metodología armonizada para los ensayos de genotoxicidad que sea fácilmente incorporable a cualquier laboratorio. Dada la no solubilidad de los nanomateriales y su tendencia a formar agregados, uno de los pasos que más puede afectar a los resultados obtenidos puede ser la metodología aplicada en la dispersión de los nanomateriales, ya que no existe una pauta o criterio comúnmente aceptado, y ha existido una gran variabilidad de procedimientos entre los distintos laboratorios. En este proyecto se ha optado por aceptar un protocolo consensuado por todos los participantes, desarrollado por el WP4. El criterio principal a seguir ha sido que el protocolo de dispersión sea aplicable a distintos tipos de nanomateriales, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, alcanzando un estado de dispersión elevado en todos ellos. Es decir, se ha

buscado obtener un estado de dispersión aceptable para todos los nanomateriales utilizados, y que las dispersiones sean estables durante un espacio de tiempo suficiente como para realizar los tratamientos de los cultivos celulares o de los animales en los ensayos *in vivo*. El proceso se inicia con la preparación de una solución que contiene una proporción de 1% de BSA (VWR; w/v) con el objetivo de evitar la aglomeración de los nanomateriales, una vez dispersados mediante la acción de un proceso de sonicación. Para ello, se añaden 50 mL de agua milliQ en una botella de 100 mL. A continuación se pesa 1 gr de BSA y se añade a la botella, luego se agita durante un minuto para disolver el BSA en la medida de lo posible. Posteriormente se añaden 50 mL más de agua milliQ, recuperando el BSA que se haya podido quedar adherido a la bandeja de pesaje. Se agita dos minutos más, de manera suave, intentando evitar la formación de espuma, y se deja a 4 °C durante toda la noche. El día siguiente se filtra la solución con un filtro de 0,22 µm con el objetivo de esterilizarla. La solución stock puede usarse durante un máximo de dos semanas si se guarda en la nevera. Antes de añadir la solución de BSA al nanomaterial, es necesario realizar una dilución 1/20 del mismo en agua milliQ estéril, hasta una concentración de 0,05% de BSA.

3.2.2. Pesado del nanomaterial

Para realizar el pasaje se requiere que la balanza esté dentro de la campana de flujo para evitar, en la medida de lo posible, que una parte del nanomaterial contamine el resto del área de trabajo y/o que pueda haber exposición a los mismos. La balanza ha de situarse en uno de los extremos para evitar que las vibraciones causadas por el flujo de aire dificulten la estabilidad de la medición del peso.

Después se sitúa el resto del material necesario dentro de la campana (incluyendo el vial de pesado y la espátula de acero) y se procede a esterilizar todo con luz ultravioleta. El vial de 20 mL se sitúa en la balanza y se usa el neutralizador electrostático para evitar que el material se adhiera a las paredes del vial o a las distintas superficies de la balanza. A continuación se abre el vial que contiene el material sobre una superficie lisa cerca de la balanza con cuidado y sin agitarlo. Se utiliza el neutralizador electrostático sobre la espátula de acero para evitar que el nanomaterial se quede adherido y se procede a

pesar 15,36 mg en el vial de 20 mL. Una vez realizada la operación se cierra el vial de 20 mL y se limpia el interior de la balanza con papel con propanol.

3.2.3. Adición del medio de dispersión

Una vez el material está dentro del vial, se vuelve a aplicar el neutralizador electroestático en la superficie del mismo. Luego se añaden 30 μ L de etanol al nanomaterial y se golpea el vial hasta que el nanomaterial esté homogenizado. A continuación se añaden los 6 mL de la solución 0,05% w/v BSA-agua milliQ, depositando el primero en el fondo del vial y los 5 restantes por las paredes, con la intención de recuperar todo el material que haya podido quedar adherido.

3.2.4. Sonicación

Para realizar la sonicación se disponen una serie de barras de plomo en varios pisos dentro de una caja de porexpan. El objetivo es dejar un espacio en medio donde se situará el vial de 20 mL con el nanomaterial y el medio de dispersión para que éste quede bien fijado y no se desplace durante la sonicación, evitando así que la sonda toque las paredes del vial y aplique menos energía en el medio de dispersión (figura 7).

La aplicación de los ultrasonidos en la muestra induce el calentamiento de ésta así que, para evitar el incremento de temperatura y los efectos que pudiera tener en la dispersión y la estabilidad de los nanomateriales, se llena la caja de porexpan con hielo y se añade agua fría, sin que el nivel de ésta supere el nivel del medio de dispersión dentro del vial. A continuación se introduce la caja de porexpan dentro del soporte de muestras del sonicador (Branson Sonifier D250) y se modifica la altura del mismo hasta introducir la sonda en el medio de dispersión, teniendo en cuenta que la sonda debe estar entre 0,5 i 1 cm por debajo de la superficie del medio de dispersión, para que la sonicación tenga la máxima eficiencia.

Cuando la muestra está lista se lleva a cabo la sonicación a una amplitud del 10% durante 16 minutos. Una vez acabada, la muestra se considera que es estable durante un máximo de una hora. Para limpiar la sonda se prepara una solución al 50% agua destilada - 50% etanol absoluto y se sonica durante 8

minutos a una amplitud del 10%, se descarta la solución y se limpia la sonda con isopropanol.

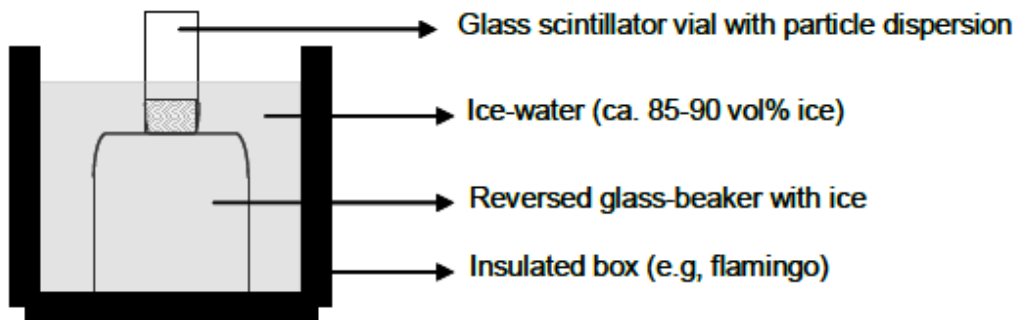


Figura 7: Esquema del método propuesto para realizar la dispersión en el sonicador. En nuestro caso se ha optado por descartar el vaso de precipitado invertido y fijar el vial mediante barras de plomo para minimizar el movimiento del mismo.

Se realizan diluciones seriadas en agua milliQ hasta alcanzar las concentraciones 10x de las finalmente deseadas para el tratamiento en cuestión y, a continuación, se realizan las diluciones 1/10 en medio y se aplica éste en los cultivos correspondientes. Una vez realizada la dilución en medio hay que aplicarlo a los tratamientos lo más rápido posible para evitar la agregación y sedimentación del nanomaterial.

3.3. ESTABLECIMIENTO Y TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS

En función de la parte experimental del proyecto, las condiciones del tratamiento de los cultivos celulares han sido ligeramente distintas, adecuándose a los acuerdos alcanzados en el proyecto Nanogenotox.

3.3.1. Fase de *screening*

La primera fase realizada, ha sido la fase de *screening* en la que se han utilizado las líneas celulares y los nanomateriales indicados en la tabla 4. El establecimiento de los cultivos, tanto para el ensayo de citotoxicidad como para los ensayos del cometa, ha variado ligeramente en función del tipo celular. En esta fase se han usado placas de 24 pocillos (Nunc). Con las líneas celulares BEAS-2B y 16HBE se han sembrado 20.000 células por pocillo y se han dejado crecer durante 72 horas, siguiendo el protocolo usado en el FIOH (*Finnish Institute of Occupational Health*, Helsinki, Finlandia). Pasado este tiempo se ha

realizado el tratamiento pertinente. En cambio, con la línea celular Caco-2 se han sembrado 200.000 células por pocillo y se han dejado crecer durante 24 horas antes de iniciar el tratamiento, siguiendo el procedimiento sugerido en el NIOM (*Nofer Institute of Occupational Medicine*, en Polonia), miembro del WP5.

Tabla 4: En esta tabla se indican los nanomateriales usados en el proyecto Nanogenotox. Los nanomateriales sombreados en verde se han utilizado en la fase de *screening* con las líneas celulares BEAS-2B y Caco-2. Los nanomateriales sombreados en azul se han utilizado en la fase de *screening* con la línea celular 16HBE.

| Nanomateriales | | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|----------|----------|-------|-------|
| TiO ₂ | | | MWCNT | | | SAS | |
| NM100 | NM101 | NM102 | NM400 | NM401 | NM402 | NM200 | NM201 |
| NM103 | NM104 | NM105 | NM403 | NRCWE006 | NRCWE007 | NM202 | NM203 |

3.3.2. Estudio de validación (*Round Robin test*)

En el *Round Robin test* se realizaron tanto el ensayo del cometa como el de micronúcleos. Ambos se realizaron simultáneamente para los cuatro nanomateriales seleccionados en dos líneas celulares distintas. Se seleccionó un nanomaterial de cada tipo, siendo elegidos aquellos que mostraron una mayor tendencia a la genotoxicidad en la fase de *screening*: El NM102 (dióxido de titanio), el NM203 (dióxido de silicio o SAS) y el NM403 (MWCNT), así como el NM110 (óxido de zinc), que se investigó como un posible control positivo para ensayos genotóxicos con nanomateriales.

Los ensayos se realizaron con dos tipos celulares distintos, Caco-2 y BEAS-2B, que resultaron ser los más atractivos, por los resultados obtenidos en la primera etapa, al tiempo que se consideró que eran representativos de dos tipos de posible exposición, oral y respiratoria. De los 12 laboratorios integrantes en el WP5, 6 realizaron los ensayos con BEAS-2B y los otros 6 con la línea Caco-2, estando nuestro Grupo involucrado en los ensayos con la línea celular BEAS-2B.

3.3.2.1. Tratamiento

Debido a la propia naturaleza del *Round Robin test*, en el que distintos laboratorios realizan el mismo experimento y con idénticas metodologías, es

necesario especificar de manera muy precisa distintos aspectos del mismo. Para ello, se acordó un protocolo de tratamiento común muy detallado con el objetivo de disminuir, en la medida de lo posible, los efectos derivados de ligeros cambios en la metodología utilizada.

Las consideraciones a tener en cuenta, así como el protocolo del establecimiento de cultivos y tratamiento, se describen a continuación:

3.3.2.2. Consideraciones

En el *Round Robin test* se llevan a cabo a la vez los dos ensayos con cada uno de los cuatro nanomateriales elegidos. El tratamiento se realiza en dos tandas distintas de dos nanomateriales (separadas por dos horas) para trabajar con una cantidad de muestras asumibles. También, teniendo en cuenta que las dispersiones son estables durante una hora aproximadamente, el tratar los cultivos de esta manera permite tener la seguridad de que se ha respetado esta ventana temporal. Las ventajas de este diseño consisten en poder correlacionar los datos obtenidos en los ensayos de manera más precisa, ya que en ambos se usa la misma solución stock del nanomaterial (evitando que la posible variación observada sea resultado de una eficiencia de dispersión distinta), así como que ambos controles puedan ser comunes para los cuatro nanomateriales en cada uno de los ensayos.

En la primera fase no todos los laboratorios han usado la misma ratio de volumen de medio de tratamiento : superficie de cultivo total. Teniendo en cuenta que no está claro que métrica de las usadas es la más adecuada en el caso de los nanomateriales, si $\mu\text{g/mL}$ o si $\mu\text{g/cm}^2$, se ha optado por que la relación entre éstas sea de 2:1 ya que en la mayoría de los resultados positivos en BEAS-2B, ésta era la proporción respetada. En el protocolo seguido, las células se siembran en placas de 6 pocillos (Nunc), donde cada uno tiene una superficie de $9,6 \text{ cm}^2$. Para mantener la ratio 2:1, los cultivos se tratan con 4,8 mL de medio BEGM.

3.3.2.3. Tiempo de tratamiento

El tiempo de tratamiento acordado para el ensayo del cometa fue de 24 horas, mientras que para el ensayo de micronúcleos el tiempo no se modificó respecto

a la primera fase, siendo de 48 horas, añadiendo la citocalasina-B a las 6 horas para la línea BEAS-2B.

3.3.2.4. Establecimiento de los cultivos

Todos los laboratorios que han trabajado en el *Round Robin test* han recibido del FIOH una misma muestra de las células, con el objetivo de que al trabajar todos los laboratorios con células provenientes de la misma muestra se redujeran las posibles variaciones que podría suponer usar células con un número de pasajes distinto. Para el establecimiento de los cultivos se sembraron 5×10^5 células BEAS-2B por pocillo en placas de 6 pocillos (Nunc), y se cultivaron durante 48 horas antes de iniciar el tratamiento.

3.3.2.4.1. Ensayo de micronúcleos

En la realización de este ensayo, se han analizado un total de 4 nanomateriales distintos, utilizando 3 concentraciones de cada uno de ellos, además de sus respectivos controles.

| | | | | | |
|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| D1 R1 P1 | D2 R1 P1 | D3 R1 P1 | D1 R2 P1 | D2 R2 P1 | D3 R2 P1 |
| D1 R1 P2 | D2 R1 P2 | D3 R1 P2 | D1 R2 P2 | D2 R2 P2 | D3 R2 P2 |
| C-1 R1 P1 | C-2 R1 P1 | - | C+1 R1 P1 | C+2 R1 P1 | - |
| C-1 R1 P2 | C-2 R2 P2 | - | C+1 R1 P2 | C+2 R2 P2 | - |

Figura 8: Esquema del establecimiento de los cultivos necesarios en placas de 6 pocillos para llevar a cabo el ensayo de micronúcleos en el *Round Robin test*. Este esquema es para un sólo material, exceptuando las placas de los controles, que son para todo el experimento. D corresponde a la dosis, R a la réplica del cultivo y P al número de pocillo de la réplica.

Para cada concentración se han hecho dos réplicas y, debido a que en un solo pocillo podría no haber suficientes células para el ensayo, se establecieron dos pocillos por réplica. Así, el experimento supuso trabajar con 48 pocillos (Figura 8), a los que hay que sumar los 4 utilizados para el control negativo (dilución 0,05% de BSA en agua milliQ) y los 4 utilizados para el control positivo (150 ng/mL mitomicina-C, Sigma), alcanzando un total de 56 pocillos en 10 placas de 6 pocillos.

3.3.2.4.2. Ensayo del cometa

El número de células requeridas para llevar a cabo este experimento es mucho menor que el que se necesita en el ensayo de micronúcleos; así que, con un sólo pocillo por réplica es suficiente. Con lo cual el total de pocillos necesarios es de 28, que representa la mitad de los utilizados en el ensayo de los micronúcleos (figura 9).

| | | | | | |
|----------|----------|----------|-----------|----------|---|
| D1 R1 | D2 R1 | D3 R1 | C-1 R1 | C+ R1 | - |
| D1 R2 | D2 R2 | D3 R2 | C- R2 | C+ R2 | - |

Figura 9: Esquema del establecimiento de los cultivos necesarios en placas de 6 pozos para llevar a cabo el ensayo del cometa en el *Round Robin test*. Este esquema es para un sólo material excepto la placa con los controles, que hay una para todo el experimento.

El control negativo también consiste en la adición de la dilución 0,05% de BSA en agua milliQ, como en el ensayo de micronúcleos, mientras que para el control positivo se ha usado etilmetanosulfonato a la concentración de 0,5 mM (EMS; Sigma).

3.3.2.5. Dispersión y exposición

El esquema temporal de cómo se han preparado las concentraciones de los distintos nanomateriales se indica en la figura 10. Se aplica el protocolo Nanogenotox de dispersión con el NM203.

Figura 10: Esquema de las distintas diluciones realizadas y la preparación de las concentraciones utilizadas para los tratamientos para cada nanomaterial durante el desarrollo del *Round Robin test*. El procedimiento depende de las concentraciones que se usan de cada uno, siendo la misma en el caso del NM102 y NM403 ya que se usan las mismas concentraciones para ambos. Las flechas en rojo indican el destino de los volúmenes de cada uno de los distintos pasos de las diluciones

| | | | |
|---|------------|------------|------------|
| NM102 y NM403 | 2,56 mg/mL | 1,28 mg/mL | 0,32 mg/mL |
| Dispersión <i>stock</i> | 3 mL | 2,7 mL | 1 mL |
| Solución 0,05% BSA | - | 2,7 mL | 3 mL |
| Dilución 1/10 en BEGM: Concentraciones finales | | | |
| Concentración experimento | 256 µg/mL | 128 µg/mL | 32 µg/mL |
| Dispersión añadida | 3 mL | 3 mL | 3 mL |
| BEGM | 27 mL | 27 mL | 27 mL |

| | | | | |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|
| NM203 | 2,56 mg/mL | 0,64mg/mL | 0,32mg/mL | 0,08mg/mL |
| Dispersión añadida | | 1,5 mL | 2,5 mL | 1 mL |
| Solución 0,05% BSA | | 4,5mL | 2,5 mL | 3 mL |
| Dilución 1/10 en BEGM: Concentraciones finales | | | | |
| Concentración experimento | | 128 µg/mL | 32 µg/mL | 8 µg/mL |
| Dispersión añadida | | 3 mL | 3 mL | 3 mL |
| BEGM | | 27 mL | 27 mL | 27 mL |

| | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|
| NM110 | 2,56 mg/mL | 0,64 mg/mL | 0,32 mg/mL | 0,08 mg/mL |
| Dispersión <i>stock</i> | | 1,5 mL | 2,5 mL | 1 mL |
| Solución 0,05% BSA | | 4,5 mL | 2,5 mL | 3 mL |
| Dilución 1/10 en BEGM: Concentraciones finales | | | | |
| Concentración experimento | | 128 µg/mL | 32 µg/mL | 8 µg/mL |
| Dispersión añadida | | 3 mL | 3 mL | 3 mL |
| BEGM | | 27 mL | 27 mL | 27 mL |

Una vez finalizada, se eliminan los posibles restos de nanomaterial de la sonda con una sonicación de 8 minutos en un medio 50% agua destilada – 50% etanol absoluto, se pulveriza isopropanol y se seca con un papel. A continuación se realiza el protocolo de dispersión con el NM102 y se vuelve a limpiar la sonda. Una vez obtenidas las dos dispersiones stock se llevan a cabo diluciones seriadas en una solución 0,05% BSA en agua milliQ, en función de la concentración a la que se quiera tratar las células. Para cada concentración se preparan 30 mL ya que hay que exponer 4 pocillos para el ensayo de micronúcleos y 2 para el ensayo del cometa. Seguidamente, se realiza la exposición a los controles negativos y a los controles positivos de ambos ensayos. En el caso de los controles negativos, estos se tratan con una dilución 1/10 de solución 0,05% BSA en medio BEGM. Se preparan 30 mL. Se añaden 10,3 µL de solución de EMS en 50 mL de medio BEGM para lograr una concentración de 2 mM. A partir de ésta se realiza una dilución ¼ en medio BEGM (3 mL + 9 mL) para alcanzar la concentración de tratamiento, 0,5 mM. El control positivo para el ensayo de micronúcleos ha sido tratado con mitomicina C (150 ng/mL).

Una vez realizada la exposición con los nanomateriales NM203 y NM102 y la preparación de los controles, se procede a realizar la segunda tanda de tratamientos. En este caso se procede a aplicar el protocolo de sonicación con el nanomaterial NM110. Una vez acabada, se vuelven a eliminar los posibles restos de nanomaterial con el procedimiento aplicado anteriormente. Luego se realiza el protocolo de sonicación con el nanomaterial NM403 y se vuelve a limpiar la sonda. Se realizan las diluciones pertinentes y se tratan los cultivos.

3.3.3. Tratamientos crónicos

Los tratamientos crónicos se han llevado a cabo durante 3 semanas, para los distintos ensayos planificados, más una semana de tratamiento extra para el establecimiento del ensayo del *soft-agar*. Se han usado tres concentraciones (1, 10 y 20 µg/mL) de dos de los nanomateriales analizados en el *Round Robin test*: El NM102 (TiO₂) y el NM403 (MWCNT), así como de un control negativo (sin tratamiento) y controles positivos para los ensayos específicos. Como se ve, las concentraciones utilizadas han sido sensiblemente menores a las

utilizadas en los tratamientos agudos. Se ha realizado cultivos por triplicado para cada concentración, sembrando 250.000 células BEAS-2B en flascos T-75 en un volumen de 13,5 mL. A las dos horas de iniciado el cultivo, una vez que las células se han adherido a la superficie, se añade el tratamiento con el nanomaterial en un volumen de 1,5 mL, para llegar a la concentración deseada. En el control negativo se añaden 1,5 mL de la solución de dispersión sin nanomaterial. A los cuatro días, se reemplaza el medio de todos los cultivos, sustituyéndolo por nuevo medio con el nanomaterial deseado.

Pasada una semana desde la siembra se procede a tripsinizar los cultivos, resembrando 250.000 células a un nuevo flacon, para continuar con el experimento, y usando las demás células para los ensayos planificados.

3.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

En la fase de *screening*, para decidir las concentraciones a utilizar en el ensayo del cometa, se realizaron ensayos de citotoxicidad, mediante el ensayo de *trypan blue* (Sigma). En este ensayo se realiza un recuento del número de células totales de los cultivos, así como de su viabilidad, ya que las células que hayan perdido la integridad estructural de la membrana aparecerán con el citoplasma azul en el microscopio, en lugar de ser refringentes. El desarrollo de este ensayo de toxicidad supone los siguientes pasos.

- 1) Para cada compuesto a utilizar se siembran 2 placas de 24 pocillos, una de las placas corresponde al experimento de 3 horas mientras que la otra corresponde al tratamiento de 24 horas. En cada placa se siembran 14 pocillos con 20.000 células en 0,5 mL de medio BEGM por pocillo. Se dejan crecer durante 72 horas. A continuación se tratan dos pocillos con cada una de las siete concentraciones del nanomaterial analizado (5, 20, 40, 50, 80, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$) así como para el control negativo. Una vez pasado el tiempo de tratamiento, se aspira el sobrenadante, se limpian los cultivos con 1 mL de PBS y se aspira de nuevo.
- 2) Se aplican 250 μL de tripsina (Labclinics)1x durante 20 minutos en cada pocillo. Una vez pasados los 20 minutos se neutraliza la tripsina con 750 μL de una solución de 10% FBS en PBS.
- 3) Se mezclan 50 μL de la muestra con 50 μL de *trypan blue*. Se añade la muestra a una cámara de Neubauer y se cuentan el total de células y el

número de ellas con el citoplasma oscuro (membrana no intacta) en los cuatro campos de las esquinas.

- 4) Se extrapola el resultado al número total de células por mililitro de muestra. Debido a que las células se han recuperado en 1 mL de volumen, se obtiene el número total de células por pocillo.

3.5. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD

3.5.1. Ensayo del cometa

El ensayo del cometa se ha llevado a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo y utilizando dos tiempos de tratamiento, 3 y 24 horas:

- 1) Se establecen los cultivos en placas de 24 pocillos, sembrando 20.000 células/cm² (superficie total de 1,9 cm²) en 0,5 mL de medio por pocillo. Las células se dejan crecer durante 72 horas antes del tratamiento. Por cada experimento se siembran 14 pocillos (control negativo, 5 dosis y control positivo, cada uno por duplicado) en dos placas de 24 pocillos. Una para el tratamiento de 3 horas y la otra para el tratamiento de 24 horas.
- 2) Después de preparar la dispersión del nanomaterial y las diluciones requeridas en función de la toxicidad de los mismos, se tratan los cultivos.
- 3) Los cultivos se incuban durante 3 y 24 horas a 37 °C en una atmósfera con un 5% CO₂.
- 4) Una vez cumplido el tiempo de tratamiento se aspira el sobrenadante y se realiza un lavado con PBS para cada uno de los pocillos. A continuación se aspira el PBS y se tratan los cultivos con 250 µL de tripsina 1x durante 20 minutos. Posteriormente se neutraliza la tripsina con 750 µL de PBS con 10% FBS.
- 5) A continuación se determina la densidad celular de cada tubo mediante el uso de la cámara de Neubauer, luego se procede a centrifugar durante 8 minutos a 130 G. Se descarta el sobrenadante y se añade la cantidad de PBS necesario para ajustar la densidad celular a 700.000 células/mL.
- 6) Se preparan 225 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 0,75% en PBS (sin CaMg) con EDTA a 10 mM y un pH de 7,4 en tubos de PCR de 0,5 mL para posteriormente añadir 25 µL de la suspensión celular.
- 7) Se colocan 3 gotas de 7 µL (de la primera serie de cultivos) por tratamiento en un Gelbond (Lonza; figura 11) Éstas son unas láminas que tienen una

superficie hidrofílica donde la agarosa se adhiere firmemente anclado en su soporte específico, sobre una placa de aluminio que descansa encima de una caja con hielo. Es necesario realizar esta operación en un total de 7 Gelbonds mediante el uso de una pipeta con multicanales expandibles (eQualizer). A continuación se colocan 3 gotas más por tratamiento, esta vez provenientes de la segunda serie de cultivos.

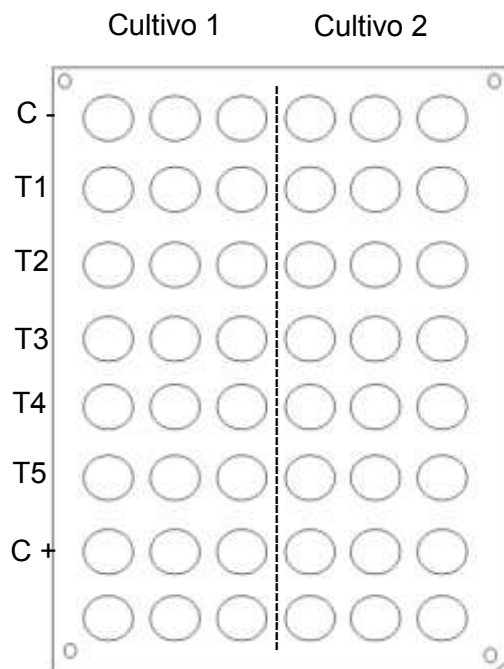


Figura 11: Esquema de un Gelbond. Las tres primeras columnas de gotas de agar corresponden a las muestras del cultivo 1 mientras que las tres últimas corresponden a las del cultivo 2. C- corresponde al control negativo y C+ al positivo. T1-5 representan las concentraciones usadas.

- 8) Se incuban los 7 Gelbonds en dos bandejas con la solución de lisis (20 mL de DMSO, 2 mL de Triton-X y 2 mL de lauril-sarcosinato en 176 mL de una solución de 2,5 M NaCl; 0,1 M EDTA; 10 mM Tris a pH10 en cada una), a 4 °C durante al menos una hora, aunque se suele dejar durante toda la noche.
- 9) Se retiran 3 de los Gelbonds (el cuarto será el control de daño basal) de la solución de lisis y se les realiza un prelavado lavado de 10 minutos y posteriormente un prelavado de 50 minutos con el tampón de reacción enzimático (40 mM HEPES; 0,1 M KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/mL BSA a pH precalentado a 37 °C). Dos de los Gelbonds se incuban en tampón, mientras que los otros dos se sumergen en 5 µL del stock (5 µg/mL) de la enzima FPG diluida en 25 mL del tampón durante 30 minutos a 37 °C.

- 10) Para parar la reacción se realiza un lavado de 5 minutos con la solución de electroforesis (0,3 M NaCl; 1 mM EDTA a pH 13,2) a 4 °C. A continuación se realiza el tratamiento alcalino sumergiendo los 3 Gelbonds en la solución de electroforesis durante 35 minutos.
- 11) Se lleva a cabo la electroforesis a 20 voltios y 300 miliamperios durante 20 minutos, asegurándose previamente de que la bandeja está nivelada y que los Gelbonds están cubiertos por la solución.
- 12) Para neutralizar el pH de los Gelbonds se realizan 2 lavados de 5 minutos en PBS. Después se lavan con H₂O destilada durante 1 minuto.
- 13) Para fijar los Gelbonds se lavan en etanol al 100% una vez y luego se incuban en un baño de etanol al 100% nuevo, durante un mínimo de 90 minutos, aunque se puede dejar durante toda la noche. Una vez realizada la fijación, se secan en la oscuridad durante al menos 2 horas. Posteriormente se cortan los Gelbonds por la mitad para poder visualizarlos, ya que no caben en el soporte del microscopio.
- 14) La tinción se realiza mediante la inmersión de los geles en 25 mL de TE (10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA) donde se ha añadido 40 µL de una dilución 10x de Sybr Gold. Se mantiene durante 20 minutos en agitación (50 rpm). Posteriormente se lavan con H₂O destilada y se dejan secar. Luego se añaden 20 µL de H₂O destilada sobre el gel y encima se le pone un cubreobjetos grande.
- 15) El análisis se realiza en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 y se usa el programa Komet 5.5 a 200x. El número de células a contar por concentración depende de la versión del ensayo y del experimento realizado. El parámetro medido es el porcentaje de DNA en la cola de los cometas.

3.5.1.1. Modificaciones específicas del ensayo del cometa en el *Round Robin test*

Cuando el ensayo del cometa se ha llevado a cabo en el *Round Robin test* se han llevado a cabo pequeñas modificaciones de algunos parámetros para armonizar el ensayo entre los distintos laboratorios. Para ello, se acordó que el porcentaje de LMP fuera de 0,8% (en lugar del 0,75% usado en el laboratorio), que el tratamiento alcalino tuviera una duración de 30 minutos (en lugar de 35)

y que el voltaje fuera de $0,8 \text{ v/cm}^2$ a 300 miliamperios, lo que en el laboratorio equivale a 16 voltios a 300 miliamperios, durante 25 minutos (en lugar de 20 voltios a 300 miliamperios durante 20 minutos). Aparte, cabe recordar que en el *Round Robin test* se han sembrado 5×10^5 células en pocillos de placas de 6 pocillos durante 48 horas en lugar de 20.000 células en pocillos de placas de 24 pocillos, como se ha realizado en la fase de *screening*. Además, se decidió utilizar dos Gelbonds para el ensayo del cometa por razones prácticas.

3.5.2. Ensayo de micronúcleos

Debido a que este ensayo no se llevó a cabo en nuestro laboratorio en la fase de *screening* se ha adoptado el protocolo acordado para el *Round Robin test*. Primero se establecen los cultivos de BEAS-2B en medio BEGM, tal y como se ha especificado anteriormente (se siembran 5×10^5 células y se dejan crecer durante 48 horas). Se realizan los tratamientos y, a las 6 horas de tratar los cultivos, se les añaden $9 \mu\text{g/mL}$ de citocalasina-B y, a las 48 horas de iniciado el tratamiento, se procede a la recolección de las células.

3.5.2.1. Recolección de las células

- 1) Se aspira el sobrenadante y se lavan los cultivos con 5 mL de PBS.
- 2) Se aplican 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,05% durante 20 minutos a 37°C
- 3) La neutralización de la tripsina se lleva a cabo añadiendo 1 mL de una solución 10% FBS en PBS a cada cultivo. Se transfieren las células a tubos, uniendo los dos pocillos de cada réplica.
- 4) Se centrifugan los tubos a 210 G durante 6 minutos, se aspira el sobrenadante y se rompe el pellet golpeando con los dedos.
- 5) Se añaden 6 mL de PBS y se repite la centrifugación y la aspiración del sobrenadante, se resuspende el pellet
- 6) Se añaden 4 mL de la solución hipotónica a cada tubo de manera rápida y constante y se repiten los pasos de la centrifugación inmediatamente.
- 7) Se añaden 0,5 mL de fijador 1 (25% ácido acético – 75% metanol) a cada tubo, y se mezcla de manera vigorosa para disgregar las posibles agregados celulares.
- 8) A continuación se añaden 8 mL más de fijador 1 y se repiten los pasos de la centrifugación.

- 9) Luego se añaden 4 mL más de fijador 1 y se vuelven a repetir los pasos de la centrifugación.
- 10) Se añaden 8 mL del fijador 2 (3% ácido acético – 97% metanol) y se guardan las muestras a -20 °C durante una noche.

3.5.2.2. Preparación de los portaobjetos

Para el análisis de los micronúcleos se preparan 3 portas por cada réplica, siempre que haya suficiente muestra, de los cuales se cuentan 2, dejando una extra por si ocurriese cualquier eventualidad. Para ello:

- 1) Se centrifugan las muestras a 210 G durante 6 minutos, se aspira el sobrenadante y se resuspende el pellet.
- 2) Se añaden varias gotas de fijador 2 hasta que la suspensión tenga un aspecto ligeramente turbio. Luego se realiza una prueba de densidad en un portaobjetos. Para ello con una pipeta pasteur se deja caer una gota desde una altura de 2-3 centímetros.
- 3) Si la densidad es aceptable, se procede a realizar el resto de portas. Si la densidad es demasiado alta, se sigue diluyendo la suspensión y preparando portas de prueba hasta obtenerla.
- 4) Se dejan secar los portas en la campana de extracción durante toda la noche.

3.5.2.3. Tinción

Hay que indicar que la presencia del nanomaterial (especialmente con nanomateriales opacos como los CNT) en las muestras, puede dificultar el análisis de éstas cuando se utilizan las tinciones más comunes, como por ejemplo la tinción Giemsa, debido a que es frecuente que haya superposición de los nanomateriales encima de las células o que estén internalizados, dificultando la discriminación de los micronúcleos. Para evitar este hecho hemos realizado una tinción con naranja de acridina (Sigma) y DAPI (Sigma), ya que es una tinción fluorescente específica para la observación del DNA lo que permite observar con mayor facilidad los micronúcleos sin interferencia del nanomaterial.

Para realizar esta tinción es necesario trabajar a temperatura ambiente y sin que la luz directa incida en las muestras.

- 1) Se sumergen las muestras (portas) en una cubeta con la solución de naranja de acridina (solución stock - 0,1% w/v en agua destilada. Se guarda a 4 °C protegida de la luz. Solución de trabajo - Dilución 1/30 de solución stock en tampón Sörensen, pH 6,8) durante 1 minuto.
- 2) Transcurrido este tiempo, se realizan 3 lavados de 3 minutos en tampón Sörensen (solución A - 18,15 gr KH_2PO_4 en 2000 mL H_2O ; solución B - 23,74 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ en 2000 mL H_2O . Ambas se guardan en la oscuridad a temperatura ambiente. Solución de trabajo - 53,4 mL solución A + 46,6 mL solución B)
- 3) Se añaden 1-2 gotas de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI en 2xSCC. Para preparar esta solución de trabajo es necesario preparar la solución stock (20x SCC). Primero se disuelven 170 gr de citrato sódico $\times 2 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) en 1.7 L de agua destilada con un agitador magnético y se añaden 350 gr NaCl gradualmente. Posteriormente se añade agua destilada hasta obtener un volumen de 2 L. Para preparar 2xSCC a partir de la solución stock se diluye esta última (1/10) en agua destilada. Finalmente se realiza una dilución 1/1000 de la solución stock de DAPI (5 mg/mL) en 2xSCC para alcanzar una concentración de DAPI de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que es la solución de trabajo.
- 4) A continuación se cubren con cubreobjetos durante 5 minutos. Se sacan los cubreobjetos y se eliminan los restos bajo agua del grifo. Se dejan secar las muestras, protegidas de la luz. Se guardan las muestras a 4 °C.
- 5) Se añaden 1-2 gotas de tampón Sörensen y se cubre el portaobjetos con un cubreobjetos, justo antes de analizar la muestra.

Por cada porta se cuentan el número de núcleos de 250 células y se calcula el CBPI (*cytokinesis-blocked proliferation index*) utilizando la fórmula $\frac{(M1+2*M2+3*(M3+M4))}{N}$. Siendo M el número de núcleos por célula (ya sea 1, 2, 3 o 4) y N el número total de células contabilizadas. Se analizan los micronúcleos de 500 células binucleadas por porta, es decir se cuenta un total de 2000 células por concentración.

3.6. ENSAYOS COMPLEMENTARIOS

3.6.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para comprobar la bondad de la dispersión se utiliza la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Ésta tiene una resolución suficiente para permitir la observación de las partículas primarias del nanomaterial, obteniendo así información al respecto.

3.6.1.1. Visualización de nanomaterial

De manera no rutinaria se ha realizado la observación de las dispersiones de los nanomateriales en el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Para ello se procede a realizar la dispersión del nanomaterial de interés (según el protocolo ya explicado) y a su dilución en agua destilada hasta alcanzar la concentración más alta utilizada. A continuación se añade una gota encima de una rejilla de cobre, se retira el exceso de líquido con un papel y se acerca una fuente de calor a la rejilla para que el resto de líquido se evapore rápidamente para impedir un incremento de la agregación. Esta rejilla es la que se utiliza en el TEM para su visualización.

3.6.1.2. Internalización

Aparte de determinar el grado de agregación/dispersión, el TEM es una herramienta útil para determinar si éste se ha internalizado en las células tratadas. Esta aproximación se ha utilizado en los tratamientos crónicos.

- 1) Para empezar, después de tripsinizar los cultivos para su pasaje, se recolectan un mínimo de 2 millones de células de éstos, se centrifugan a 130 G durante 8 minutos, se retira el sobrenadante y se resuspenden en 1,5 mL de 2% glutaraldehído en tampón cacodilato a pH 7,2 y se guardan a 4 °C.
- 2) Después de al menos dos horas, las células se lavan con PBS y se centrifugan a 1278 G durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1% (w/v) de paraformaldehído en PBS. Luego las muestras se centrifugan a 7676 G durante 5 minutos y se lavan tres veces en PBS, repitiendo la centrifugación.
- 3) Luego, las células se postfijan durante 2 horas en una solución del 2% de tetróxido de osmio (w/v) con un 0,8% de potasio hexocianoferrato en PBS.

Seguidamente se realizan 4 lavados en H₂O MilliQ y luego se deshidratan las muestras en concentraciones ascendentes de acetona.

- 4) Una vez las muestras han pasado por este proceso, éstas se embeben en resina Eponato 12 polimerizada a 60 °C durante 48 horas. Luego se obtienen secciones semifinas con un micrótopo (Leica ultracut microtome) y se tiñen con 1% (w/v) de azul de toluidina, solución acuosa para determinar las zonas con una mayor concentración celular. De éstas, se realizan secciones ultrafinas con una cuchilla de diamante, se sitúan en una rejilla de cobre y se contrastan con acetato de uranilo durante 30 minutos y citrato de plomo de Reynolds durante 5 minutos. A continuación se observaron las muestras en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1400.

3.6.3. Western blot

Para la detección de la expresión a nivel de proteína de diversos marcadores se utiliza el ensayo de Western blot. En nuestro caso hemos utilizado la expresión de la hemooxigenasa-1, como marcador de estrés oxidativo. Para ello el proceso seguido ha sido:

a) Recolección de células

- 1) Se aspira el sobrenadante de los distintos cultivos tratados y se añaden 3 mL de tripsina 1% y se incuba a 37 °C durante 20 minutos. Luego se añade 7 mL de solución de inactivación (2% FBS en PBS). Se transfieren las células a tubos de 15 mL. Se cuantifica el número de células por mililitro de cada tubo y se centrifugan a 130 G durante 8 minutos. Se aspira el sobrenadante y se congelan los tubos a -80 °C.
- 2) Se prepara el tampón RIPA (Millipore; *radio inmuno precipitation assay*) añadiendo 1 mL de la solución stock 10x a 9 mL de agua MilliQ y se añade 1 pastilla de inhibidores de proteasas (Roche) y de inhibidores de fosfatasa (Roche) por cada 10 mL de RIPA 1x.
- 3) Se descongelan los tubos guardados a -80 °C y se añaden 50 µL de RIPA 1x por cada 1x10⁶ células. Luego se sonicán las muestras 3 veces durante 15 segundos en el sonicador Branson Sonfier D250. Por último se centrifugan durante 5 minutos a 13000 rpm y se recoge el sobrenadante con las proteínas descartando los residuos insolubles.

b) Cuantificación de las proteínas

Para determinar la cantidad de proteína en cada muestra se usa el Bio-Rad *Protein Assay 5X*.

- 1) Para llevar a cabo esta cuantificación, se diluye el stock de Bradford 5x a 1x con agua MilliQ y se añaden a una placa de 96 pocillos 100 μ L de Bradford 1x en dos pocillos por cada muestra que se va a cuantificar, ya que se realizan duplicados y se usa la media para los cálculos.
- 2) Se añade 1 μ L de la muestra en el pocillo, se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos y se lee la absorbancia de las muestras en el lector de placas a 595 nm de longitud de onda. Para obtener el blanco se usa el mismo procedimiento reemplazando la muestra por RIPA 1x y se descuenta el valor obtenido de la absorbancia del resto de muestras.

c) Preparación de los geles

- 1) Primero se monta el soporte para preparar los geles y se comprueba que los soportes estén bien sellados con agua MilliQ. El gel está compuesto por dos partes, el *stacking* gel (donde están los pocillos) y el *resolving* gel (donde están los carriles). El *stacking* está al 4% mientras que el *resolving* en nuestro caso será del 10%.
- 2) La composición de cada uno de los geles (volumen final = 10 mL) ha sido para el *stacking*: 6,1 mL agua MilliQ + 1,3 mL de 30% acridina + 2,5 mL tampón del *stacking* gel (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8)+ 0,1 mL SDS. Para el *resolving*: 4,1 mL agua MilliQ + 3,3 mL de 30% acridina + 2,5 mL tampón del *resolving* gel (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8)+ 0,1 mL SDS. Para que el gel polimerice es necesario añadir APS 10% (amonio persulfato; Sigma; 100 μ L cada 10 mL de gel) y TEMED (Applichem, 10 μ L por cada 10 mL de gel). Hay que añadir estos compuestos justo antes de cargar el soporte.
- 3) Para iniciar la preparación se añade el *resolving* hasta la línea inferior verde del soporte (unos 7 mL), después de adicionarle los agentes de polimerización. Se añaden los agentes de polimerización a la preparación del gel *stacking*, se añade la mezcla hasta el tope del soporte y se inserta el peine con cuidado de no formar burbujas. A continuación se montan los geles en el soporte y se sitúa el en el aparato de transferencia. Luego se llena el aparato hasta el nivel de los peines de los geles, con

aproximadamente 1 litro de *running* buffer (TGS 1x: 100 mL TGS 10x + 900 mL H₂O).

d) Carga de las muestras

- 1) Una vez el gel está listo se prepara el tampón de carga para observar el desplazamiento de la banda a través del *running* gel. Se añaden 100 µL de β-mercaptoetanol a 900 µL tampón 5x (tampón de carga; 2,5 mL Tris-HCl 1 M pH=6,8, 1 gr de SDS, una gota de bromofenol, 5 mL de glicerol, 1,5 mL H₂O destilada). El volumen de muestra a cargar depende de la concentración de proteína total de la muestra (son necesarios un mínimo de 25 µg). Una cuarta parte del volumen de proteína es el volumen de tampón de carga que hay que añadir para obtener una concentración de éste de 1x.
- 2) Las muestras se mantienen en hielo y cuando están todas listas se desnaturalizan a 95 °C durante 5 minutos. Luego se hace un pulso de centrifugación para recuperar la muestra y se realiza un shock térmico en hielo durante 1 minuto. A continuación se cargan las muestras en los pocillos, cargando algunos con el control de pesos moleculares, *ladder* (Invitrogen). Una vez realizada la carga se deja correr la muestra durante 1-1:30 horas a 120 v.
- 3) Luego se pone en una bandeja el tampón de transferencia (10 mL TGS 10x + 20 mL isopropanol + 70 ml H₂O para cada gel).
- 4) A continuación se preparan 6 hojas de papel Whatman (VWR), así como un trozo de membrana de nitrocelulosa (VWR) del mismo tamaño. Y se sitúan en la bandeja con tampón de transferencia. A continuación se desmonta el contenedor del gel y se traslada el *running* gel a la bandeja.
- 5) Se ponen tres hojas Whatman superpuestas y se añade la membrana encima. A continuación se añade el gel, y se añade tampón de transferencia encima del gel. Finalmente se superponen tres hojas Whatman, y se añade el resto de tampón de transferencia encima, se tapa el aparato de transferencia y se inicia la transferencia a 20 v durante una hora.

e) Hibridación de la membrana con anticuerpos

- 1) Se retira la membrana de nitrocelulosa y se realiza un lavado de ésta con TTBS (TBS 10x: 200 mM Tris, 5 M NaCl, pH 7,5; TTBS: TBS 1X/ 0,1%

Tween 20) durante 5 minutos en agitación. Luego se transfiere la membrana a una bandeja con Red Ponceau durante 1 minuto en agitación lo que permitirá observar las bandas de proteínas y cortar la membrana.

- 2) Luego, se recupera el Red Ponceau, se limpia la membrana con agua indirectamente y se realizan tres lavados de TTBS durante 5 minutos en agitación.
- 3) Se bloquean las membranas en una bandeja con 5% de leche en polvo en TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incuba la membrana con el anticuerpo primario en un tubo donde se añaden 5 mL de la solución de anticuerpo primario (TTBS + 5% de leche en polvo + el anticuerpo primario (HMOX-1, Abcam), ambos en una dilución de 1:2000) + azida sódica al 0,1%, siendo el stock 1000x, 1 M) y se incuba durante toda la noche girando a 4 °C (Lab Rollell, Speedy 7).
- 4) El día siguiente se realizan tres lavados de 5 minutos con TTBS en agitación y se transfiere a otro tubo con 5 mL de la solución con el anticuerpo secundario (Santa Cruz; TTBS + 5% de leche en polvo + anticuerpo secundario con una dilución de 1:2000) y se deja incubar durante 1 hora. Se realizan tres lavados de 5 minutos de la membrana con TTBS en agitación y posteriormente uno más de 5 minutos en TBS 1x.

f) Detección y lectura de bandas

- 1) Se añade la solución de detección (Pierce ECL Western Blotting Substrate; Millipore; que se prepara mezclando en proporciones iguales cada una de las soluciones, 1x peróxido de hidrógeno y 1x Luminol, 1,5 mL por membrana) a la membrana situada en la bandeja del GeneGnome y se incuba durante 3 minutos, se retira el exceso de líquido con papel. Se realizan las tomas de fotografía acumulando la señal, tomando como tiempo 1 min, 2 min, 5 min, 5 min, 10 min, 10 min, 20 min 20 min 30 min o hasta que la señal se sature.

3.6.4. RT-PCR

El ensayo de RT-PCR se ha llevado a cabo a las tres semanas de tratamiento, analizando dos de las tres réplicas de cada tratamiento. Para obtener las muestras para este el ensayo, después de realizar la resiembra en nuevos

falcons T-75, se resiembran 1×10^6 células en falcons T-25 y a las dos horas se vuelven a realizar los tratamientos pertinentes a cada uno.

a) Extracción de RNA

- 1) A las 24 horas se procede a realizar la extracción total de RNA de los cultivos con el uso del reactivo Trizol (Invitrogen). Para ello se retira el medio, se añaden 2 mL de Trizol y se resuspende las muestras hasta que éstas sean homogéneas en el microscopio. A continuación se guarda cada muestra en dos eppendorfs (1 mL en cada una) y se guardan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso, o bien se continua el protocolo directamente.
- 2) Para realizar la extracción del RNA primero se dejan las muestras de 1 mL de cada cultivo a temperatura ambiente hasta que se hayan atemperado. Luego se añaden 0,2 mL de cloroformo y se deja incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Una vez finalizado el tiempo de incubación se procede a centrifugar las muestras a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 12000 rpm durante 15 minutos. Una vez acabada se transfieren las fases acuosas a eppendorfs nuevos.
- 3) A cada eppendorf se añade 500 μL de isopropanol y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente, a continuación se centrifugan a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 12000 rpm durante 10 minutos.
- 4) Después del paso anterior se puede observar el precipitado de RNA. A continuación se retira el sobrenadante y se añade 1 mL de etanol (75%), se usa el vortex para homogenizar las muestras y se centrifugan las muestras a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 7500 rpm durante 5 minutos. Después de la centrifugación se retira el sobrenadante y se deja secar las muestras al aire. Luego se añaden 20 μL de H_2O libre de RNAsa y se incuba en hielo durante 1 hora.
- 5) A continuación se tratan las muestras con DNAsa para minimizar una posible contaminación de DNA genómico. Primero se cuantifica el RNA extraído mediante el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Luego se incuban 11,5 μg de RNA con 1 μL de DNAsa, 2,5 μL de tampón DNAsa 1x y H_2O sin RNAsa hasta llegar a un volumen final de 25 μL . Para que la DNAsa actúe, se incuban las muestras a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Pasado este tiempo se añade 1 μL de inhibidor de DNAsa y se deja a temperatura ambiente durante 2 minutos. Luego se centrifuga a 10000 rpm durante 1 minuto y se recupera el sobrenadante.

b) Cebadores

Los cebadores se seleccionaron a partir de una búsqueda bibliográfica (tabla 5). Para la IL-6 y la IL-8 (Sigma) se utilizaron los cebadores utilizados por Wang et al. (2012) mientras que para la IL-1 β (Sigma) se usaron los cebadores utilizados en el artículo de Kumagai et al. (2004). Para la hemooxigenasa-1 se diseñaron los cebadores en el laboratorio. Se ha utilizado la β -actina como gen *housekeeping* (Sigma).

Tabla 5: Cebadores utilizados en el estudio de la expresión de interleucinas en el experimento crónico.

| Genes | Secuencia | Tm (°C) |
|-------------------------|-------------------------------|---------|
| β -actina directo | 5'-GCATGGAGTCCTGTGGCATC-3' | 62 |
| β -actina reverso | 5'-CCACACGGAGTACTTGCGCT-3' | 62 |
| IL-1 β directo | 5'-AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-3' | 65,9 |
| IL-1 β reverso | 5'-GAGAACACCACTTGTTGCTCCA-3' | 66,4 |
| IL-6 directo | 5'-CCAGGAGCCCAGCTATGAACT-3' | 66,5 |
| IL-6 reverso | 5'-CCCCAGGGAGAAGGCAA-3' | 66,4 |
| IL-8 directo | 5'-CTG GCC GTG GCT CTC TTG-3' | 67,4 |
| IL-8 reverso | 5'-CCTTGCCAAAAGTGCACCTT-3' | 66,2 |
| HMOX-1 directo | 5'-CTCAAACCTCCAAAAGCC -3' | 63 |
| HMOX-1 reverso | 5'-TCAAAAACCACCCCAACCC -3' | 63 |

Tabla 6: Componentes y volúmenes necesarios para la transcripción reversa de cada muestra.

| Componentes | Volumen | Concentración final |
|--------------------------------------|--------------------------|---------------------|
| dNTPs Mix (5 mM de cada dNTP) | 2 μ L | 0,5 mM de cada dNTP |
| 10x Tampón RT | 2 μ L | 1X |
| Cebadores (10 μ M) | 2 μ L | 1 μ M |
| Inhibidor de RNAsa (10 U/ μ L) | 1 μ L | 10 U |
| Transcriptasa reversa (4 U/ μ L) | 1 μ L | 4 U |
| Agua libre de RNAsa | Variable | |
| RNA molde | El mínimo para 2 μ g | |
| VOLUMEN FINAL | 20 μ L | |

c) Transcripción inversa

El siguiente paso a ejecutar es la realización de la transcripción reversa de las muestras de RNA. Para ello, se procede a preparar las muestras tal como se describe en la tabla 6 y luego se realiza la reacción mediante la incubación de estas muestras en el termociclador LightCycler@480 (Roche) durante 30 minutos a 37 °C.

Tabla 7: Componentes y volúmenes necesarios para la amplificación por PCR de cada muestra.

| Componentes | Volumen | Concentración final |
|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| dNTPs Mix (10 mM de cada dNTP) | 2 µL | 0,4 mM de cada dNTP |
| 10x tampón (25 mM MgCl ₂) | 5 µL | 1X |
| Cebadores (10 µM) | 2 µL | 0,4 µM |
| Polimerasa DNA DFS-Taq (50 U/µL) | 1 µL | 10 U |
| Agua libre de RNAsa | Variable | |
| cDNA | El mínimo para 200 ng | |
| VOLUMEN FINAL | 50 µL | |

Tabla 8: Características del programa utilizado para la realización de la RT-PCR.

| Programa | Tiempo | Temperatura |
|---------------------------|--------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 2 minutos | 94 °C |
| 45 ciclos | | |
| Desnaturalización | 30 segundos | 95 °C |
| Hibridación | 30 segundos | 61 °C |
| Extensión | 45 segundos | 72 °C |
| Extensión final | 1 minuto | 78 °C |

d) Amplificación por PCR

Una vez sintetizado el cDNA de las muestras, se procede a realizar la PCR para amplificar los cDNA correspondientes al RNA de los genes de interés (IL-1β, IL-6 y IL-8) en placas de 96 pocillos. Para ello se utiliza la DFS-Taq DNA Polymerase (Bioron). En la tabla 7 se muestran los componentes necesarios para llevar a cabo esta reacción, destacando que la cantidad de cDNA necesaria es de 200 ng. Después de mezclar estos componentes, hasta un

volumen final de 50 μL , se utiliza el termociclador LightCycler@480 (Roche) con el programa especificado en la tabla 8. Los resultados obtenidos se visualizan mediante el programa Light Cycler@480 software, versión 1.5.0.

3.6.5. Medición de ROS e internalización (FACS)

En el experimento crónico se realizó este ensayo para medir la generación de ROS y la internalización de nanomaterial con el ensayo de DCFH-DA (FACS). Para ello se siembran 50.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos realizándose por cada concentración un triplicado, e incubándose a 37 °C durante 24 horas. El día siguiente se realiza el tratamiento con las diferentes concentraciones de nanomaterial y se incuban durante 24 horas más.

- 1) Cuando ha pasado el tiempo de tratamiento se lavan los cultivos con PBS tres veces y a continuación se cambia el medio a DMEM sin suero. A partir de este momento es necesario trabajar en condiciones de oscuridad.
- 2) Se diluye el stock de DCFH-DA (Sigma) a 2,5 μM en medio DMEM sin suero y se añade 1 μL (concentración final en el medio de 5 μM) y se incuban los cultivos 30 minutos a 37 °C y se tratan los controles positivos durante 15 minutos con 500 μM de H_2O_2 .
- 3) Una vez pasados los 30 minutos se lavan los cultivos 2 veces con PBS y se recolectan añadiendo 500 μL de tripsina hasta que las células se separen. A continuación se recogen y se ponen los tubos FACS en hielo para inactivar la tripsina y se centrifugan a 120 G durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente se descarta el sobrenadante y se añaden 300 μL de PBS.
- 4) Los valores de fluorescencia de la DCF oxidada se miden mediante el filtro 530/30 nm. Los datos se analizan mediante el software Flowjo versión 7.6.5.

3.6.6. Ensayo del *soft-agar* (*soft-agar assay*)

Para llevar a cabo este ensayo, se preparan tres placas de 35 mm de agar para cada réplica de cada tratamiento. Primero es necesario añadir una capa de agar al 0,6% en DMEM en la base para cada una de las placas que se utilizarán. Para ello se prepara una solución stock de agar (Bacto-Agar, Difco) 1,2% añadiendo 2,4 gr en 200 mL de H_2O destilada y calentándola en el microondas hasta su disolución, para posteriormente, autoclavar la solución y guardarla a 4 °C. También es necesario preparar DMEM 2x, para ello se vierte

el contenido de un paquete DMEM/*High Glucose* (Gibco) en polvo a una botella estéril y se añade 3,7 gr de NaCO₃, luego se añaden 370 mL de H₂O destilada autoclavada. Se ajusta el pH a 7 usando una solución 1 N de HCl o NaOH. Finalmente se filtra el medio (Millipore de 0,22 µm) y se añaden los demás reactivos: 100 mL de FCS (20%; Gibco), 10 mL de 100x aminoácidos no esenciales (2%; Gibco), 10 mL de glutamax (2%, Gibco), 10 mL de penicilina-estreptomicina (2%, PAA).

- 1) Para iniciar la preparación de las capas basales de agar, se calienta el medio DMEM 2x preparado a 37 °C. La solución stock de agar 1,2% se calienta en el microondas hasta que se disuelva de nuevo y se mantiene en un baño a 40 °C. Cuando la solución de agar ha atemperado se mezclan en un tubo de 50 mL partes iguales de las dos soluciones preparadas. Se mezcla con cuidado con una pipeta y se añaden 1,5 mL de la mezcla a cada placa de 35 mm. Se dejan solidificar y se guardan a 4° C.
- 2) El paso siguiente consiste en preparar una capa de top agar (0,4% de agar en lugar del 0,6% de la capa base). Primero se calienta la solución stock de agar como se ha explicado anteriormente y también medio BEGM. A continuación se tripsinizan las células BEAS-2B como se ha explicado anteriormente y se cuenta el número total en cada réplica y tratamiento.
- 3) Luego de cada réplica se añade el volumen necesario para tener 17500 células en 1,75 mL de medio DMEM1x. Rápidamente se mezclan volúmenes iguales de solución stock de agar y medio BEGM, se cogen 5,25 mL de la mezcla y se añaden a un tubo con los 1,75 mL de DMEM 1x con las 17500 células.
- 4) El volumen final de 5,25 mL se mezcla bien y se añaden 1,5 mL encima de la capa base de agar de una placa de 35 mm preparada con anterioridad, tres placas por réplica de cultivo.
- 5) Una vez finalizadas todas las placas se dejan a temperatura ambiente durante 45 minutos y se ponen en placas de Petri de 15 cm con 7 mL de H₂O destilada autoclavada.
- 6) Dos semanas después se procede a la tinción de las colonias formadas con INT (2-p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio clórico (Sigma). Para prepararlo se disuelve el INT en H₂O destilada estéril a razón de 1 mg/mL y se autoclava. Luego se añade 1 mL por placa y se deja incubar entre 12 y

24 horas. A continuación se retira el líquido con el INT y se escanean las placas. Las imágenes obtenidas se analizan mediante el software NICE B2b, que permite el conteo de colonias en placas de agar.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los resultados se ha llevado a cabo en función del tipo de ensayo aplicado.

En el ensayo del cometa, el análisis estadístico se ha llevado a cabo utilizando las medianas de cada una de las réplicas de cada cultivo analizadas en los Gelbond. Luego se realiza una transformación logarítmica de los datos para asegurar su ajuste a una distribución normal y se aplica una ANOVA, usando el análisis post hoc de Tukey HSD (*honestly significant difference*).

En el ensayo de micronúcleos, el análisis de los datos se lleva a cabo comparando el número de células binucleadas, con y sin micronúcleos de los tratamientos, con las del control no tratado. Para ello se utiliza una tabla de contingencia 2x2 y aplicando un test de Fisher exacto de dos colas.

En el ensayo del *soft-agar assay*, el análisis se lleva a cabo aplicando una ANOVA por cada tipo de nanomaterial y para el análisis post hoc se utiliza también el análisis de Tukey HSD (*honestly significant difference*).

Para el análisis de los resultados obtenidos en la medición de ROS e internalización mediante DCFH-DA, se realizó una ANOVA para el porcentaje de ROS y el porcentaje de SCC, utilizando para el test de Games-Howell para análisis post hoc.

En el western blot se optó por analizar los datos obtenidos mediante una ANOVA (y el test Tukey HSD como análisis post hoc) para el porcentaje de expresión relativo de cada concentración utilizada.

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos de la expresión de mRNA mediante PCR, se analizan mediante una ANOVA, utilizando el test de Games-Howell para análisis post hoc.

4. RESULTADOS

4.1. DISPERSIÓN DE LOS NANOMATERIALES

La dispersión de los nanomateriales utilizados en este estudio se ha realizado tal y como se ha desarrollado en el WP4 del proyecto. En este caso han sido las propias instituciones participantes en este apartado del proyecto las que han realizado los experimentos pertinentes para comprobar la bondad del método de dispersión utilizado.

De todas maneras, para asegurarnos que en nuestras manos dichos protocolos funcionaran correctamente hemos llevado a cabo con algunos nanomateriales su visualización utilizando TEM. En todos los casos los niveles de dispersión observados fueron aceptables.

4.2. FASE DE *SCREENING*

Como se ha indicado en la sección anterior, en la fase de *screening* se han desarrollado los experimentos asignados para la primera fase del Proyecto Nanogenotox. En nuestro caso, los experimentos llevados a cabo con los nanotubos de carbono (NM400, NM401, NM402, NM403, NRCWE006 y NRCWE007) se hicieron utilizando las líneas celulares Caco-2 y BEAS-2B. Por lo que hace a los experimentos realizados con los compuestos SAS (NM200, NM201, NM202 y NM203), éstos se hicieron utilizando la línea celular 16HBE. En esta fase de *screening* se ha procedido a realizar un análisis de la citotoxicidad/ genotoxicidad de cada uno de los nanomateriales seleccionados, tras exposiciones de 3 y 24 horas para posteriormente realizar el ensayo del cometa, tanto en su versión estándar como con la utilización de la enzima FPG en estos mismos tiempos. Aunque existen varias alternativas para mostrar los resultados obtenidos, hemos optado por utilizar la línea celular como factor diferenciador.

En las tres líneas celulares se ha usado el medio de dispersión del nanomaterial como control negativo (C-; BSA 0,05% en agua MilliQ), mientras que para el control positivo se ha usado H₂O₂ (300 µM para el tratamiento de 3 horas y 500 µM para el tratamiento de 24 horas).

4.2.1. Resultados obtenidos en la línea celular Caco-2

A continuación se exponen los resultados obtenidos en la línea celular Caco-2 con los nanotubos de carbono (NM400, NM401, NM402, NM403, NRCWE006 y NRCWE007), dónde se muestran imágenes obtenidas en TEM para algunos de los nanomateriales utilizados, así como los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad obtenidos en esta línea con los tratamientos de los distintos nanotubos de carbono.

4.2.1.1. NM400

a) Visualización

Se han llevado a cabo diversas preparaciones de muestras del nanomaterial después de aplicar el protocolo de dispersión. Con estas muestras se ha llevado a cabo una observación de las mismas mediante TEM para determinar de manera cualitativa los niveles de dispersión/agregación. En la figura 12(A) se puede observar que los CNT parecen presentar un aspecto flexible, y que se han depositado en la rejilla formando una malla. En la imagen B, se pueden observar unas estructuras planas electrodensas asociadas a la maraña de CNTs.

b) Citotoxicidad

Los resultados obtenidos con el compuesto NM400 con la línea celular Caco-2 se presentan en la figura 13. Como se observa, este nanomaterial presenta una ligera citotoxicidad, que se traduce en una reducción del número de células viables. Esta toxicidad es más acusada tras 24 horas de tratamiento que en tratamientos más cortos (3 horas). Aunque no existen variaciones entre los valores de viabilidad obtenidos para algunas concentraciones, se observa un efecto dosis-dependiente de tipo indirecto, donde al aumentar la dosis, disminuye la viabilidad.

c) Genotoxicidad

Por lo que se refiere a la genotoxicidad del compuesto NM400, los resultados obtenidos se indican en la figura 14. Como se observa, no se han detectado efectos genotóxicos en ninguna de las concentraciones utilizadas, ni en ninguno de los dos tiempos de tratamiento.

Hay que recordar que en cada una de las figuras se presentan tanto los niveles de daño basal como los de daño oxidativo. Así pues claramente el NM400 no es capaz de inducir ninguno de los dos tipos de efecto sobre el material genético de la línea Caco-2. La falta de efecto genotóxico contrasta con lo observado en el control positivo, tanto en los niveles de daño basal como de daño oxidativo (observado cuando se utiliza la enzima FPG). Esta clara respuesta del control positivo indica el correcto desarrollo del ensayo y reafirma la falta de efecto genotóxico del NM400.

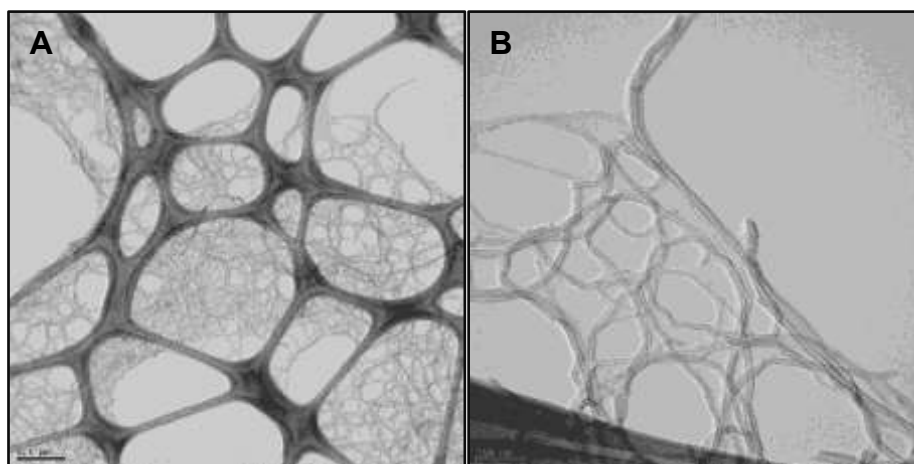


Figura 12: Imágenes obtenidas mediante TEM de la dispersión del NM400. **A)** corresponde a una imagen 20000X, con la barra de escala que corresponde a 500 nm mientras que **B)** corresponde a una imagen 80000X donde la barra de escala corresponde a 100 nm.

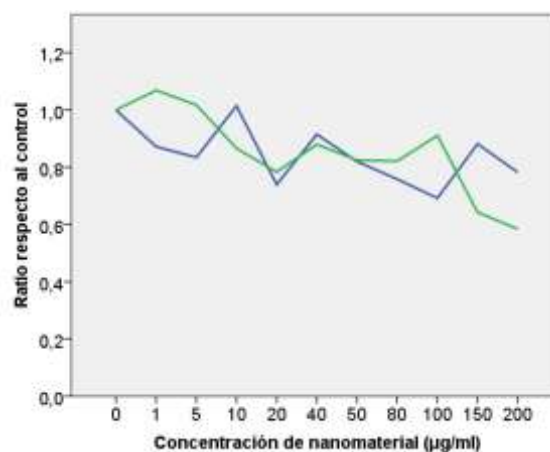


Figura 13: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea Caco-2 tras los tratamientos con NM400 durante 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

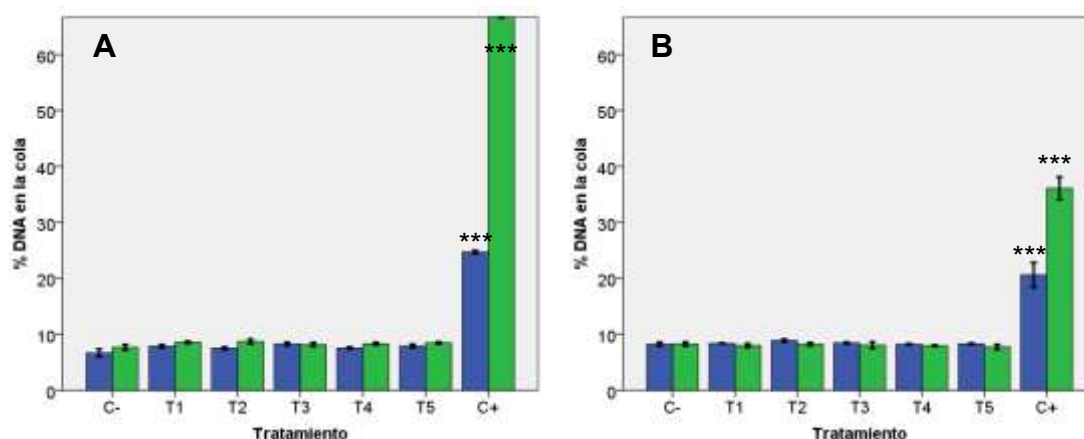


Figura 14: Resultados del ensayo del cometa en la línea Caco-2 tratada con el NM400 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

4.2.1.2. NM401

a) Visualización

Las imágenes obtenidas por TEM de la dispersión del compuesto NM401 (figura 15), después de su dispersión, muestran que estos nanotubos de carbono presentan una estructura rígida y un diámetro así como una longitud mucho mayores que el resto de los CNTs utilizados en este proyecto. Además, se pueden distinguir algunas partículas que parecen ser nanotubos no correctamente dispersados. En la imagen B se puede observar que existen zonas en los propios nanotubos más electrodensas que otras.

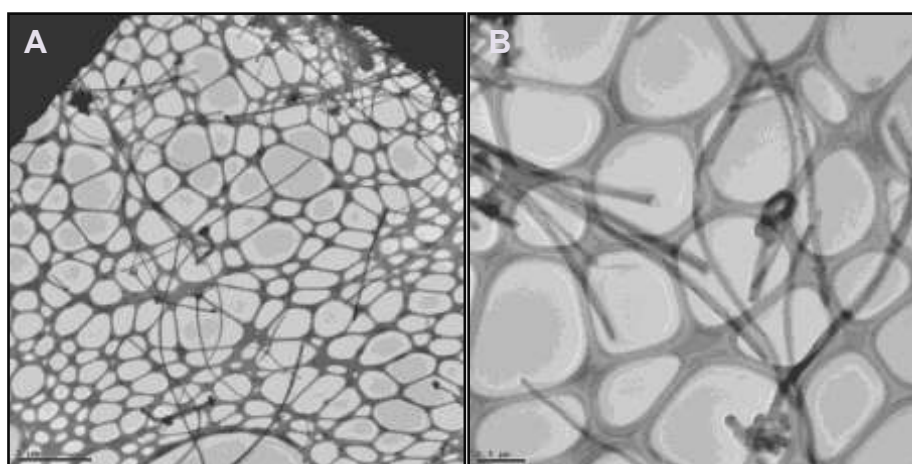


Figura 15: Imágenes obtenidas mediante TEM de la dispersión del NM401. A) corresponde a una imagen 5000X, la barra de escala corresponde a 5 μm ; B) corresponde a una imagen 20000X y la barra de escala corresponde a 500 nm.

b) Citotoxicidad

Como se indica en la figura 16, los efectos del compuesto NM401 sobre las células Caco-2 son muy distintos a los observados para el NM400. En este caso la toxicidad inducida es muy marcada y, a la concentración más elevada, se obtienen viabilidades de aproximadamente el 20%. Aunque en las concentraciones más bajas existen diferencias entre ambos tiempos de tratamiento, con menor efecto en el de 3 horas, a partir de la dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los efectos sobre la viabilidad celular son muy similares.

c) Genotoxicidad

Por lo que se refiere a la genotoxicidad del compuesto NM401 los resultados obtenidos se presentan en la figura 17. Se puede observar como no existen incrementos significativos del daño, con la excepción de un valor en la concentración más baja y tras el tratamiento de 3 horas, que se considera como un valor marginal. La falta de efecto en todas las restantes dosis, junto con la ausencia de una tendencia a incrementar los valores de daño con la dosis, indica claramente la falta de genotoxicidad de este compuesto. Como en el caso anterior los resultados obtenidos en los controles positivos son claros, confirmando la consideración de que el NM401 no es genotóxico sobre las células Caco-2.

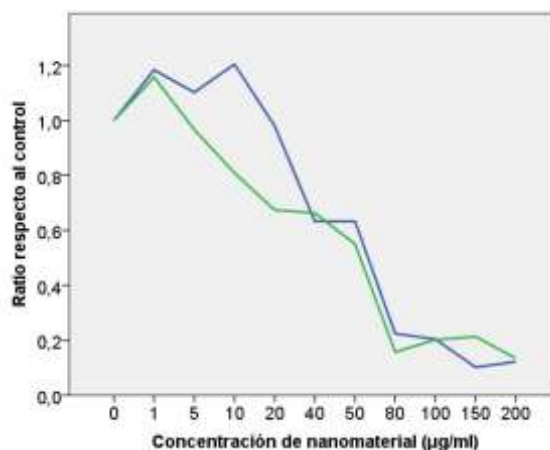


Figura 16: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea Caco-2 tras los tratamientos con NM401 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

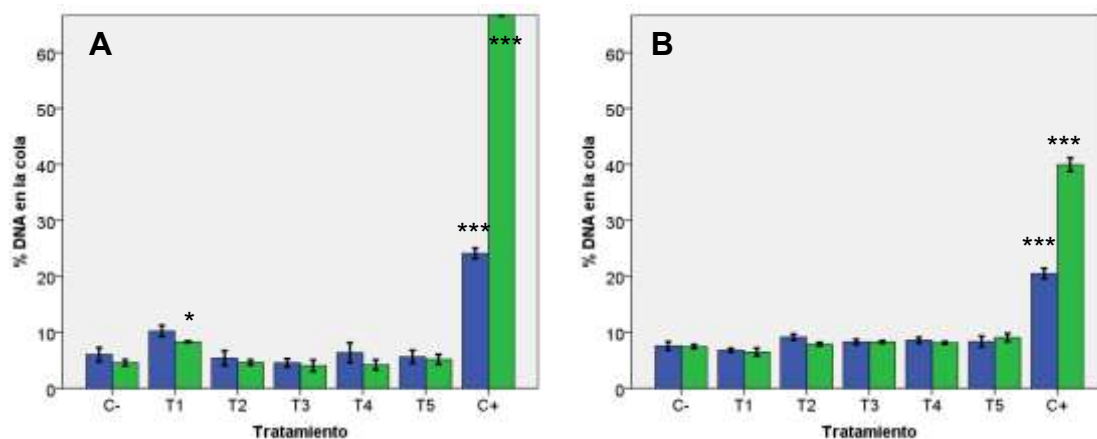


Figura 17: Resultados del ensayo del cometa en la línea Caco-2 tratada con el NM401 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

4.2.1.3. NM402

a) Visualización

La observación de las muestras del compuesto NM402 mediante TEM revela que estos nanotubos de carbono presentan una apariencia mucho más flexible que la observada en los otros MWCNT (figura 18). Esta mayor flexibilidad hace que se observe la existencia de aglomerados en forma de ovillo. En imágenes tomadas a más aumentos como en la imagen B, se puede observar que existe algún tipo de estructura electrodensa parecida a la observada con el compuesto NM400.

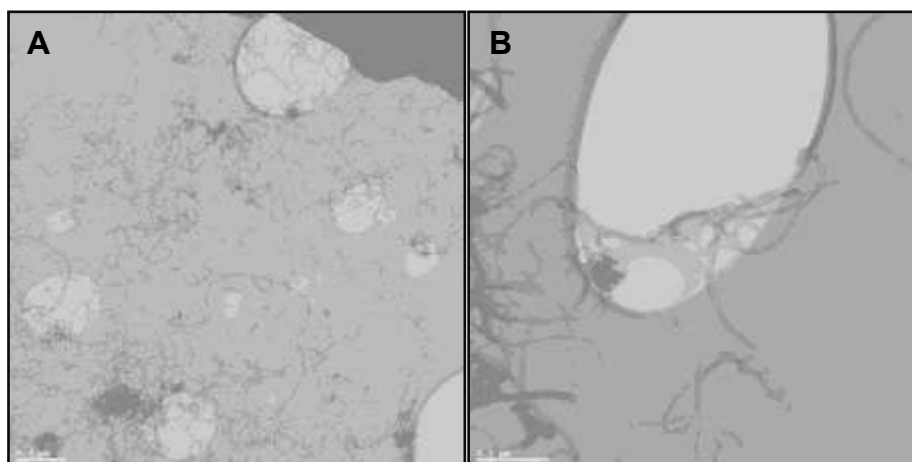


Figura 18: Imágenes obtenidas mediante TEM de la dispersión del NM402. A) corresponde a una imagen 20000X, la barra de escala corresponde a 500 nm; B) corresponde a una imagen 60000X y la barra de escala corresponde a 200 nm.

b) Citotoxicidad

Por lo que respecta a la toxicidad del compuesto NM402, observada en la figura 19, ésta es muy marcada, siguiendo una clara relación dosis-respuesta. Sorprendentemente, no existen marcadas diferencias entre los tratamientos de 3 y 24 horas y, a la dosis más elevada, la viabilidad celular se reduce aproximadamente a un 20% respecto a la observada en el control negativo. Así, se concluye que este compuesto presenta un claro efecto tóxico sobre la línea celular Caco-2.

c) Genotoxicidad

Los resultados obtenidos en el ensayo del cometa en el compuesto NM402 se encuentran indicados en la figura 20. Como se observa, ni en los tratamientos de 3 ni en los de 24 horas se pudieron inducir incrementos significativos de daño en el DNA. Además, no se observó en ningún caso una tendencia a que los efectos dependan de la dosis aplicada, por lo que se deduce la falta de genotoxicidad de este MWCNT. Como en los casos anteriores, los resultados obtenidos en el control positivo confirman que el experimento se llevó a cabo de manera correcta. En este experimento no fue posible contar el experimento del tratamiento de 24 horas modificado con la enzima FPG, debido a la ausencia de células en estos Gelbonds.

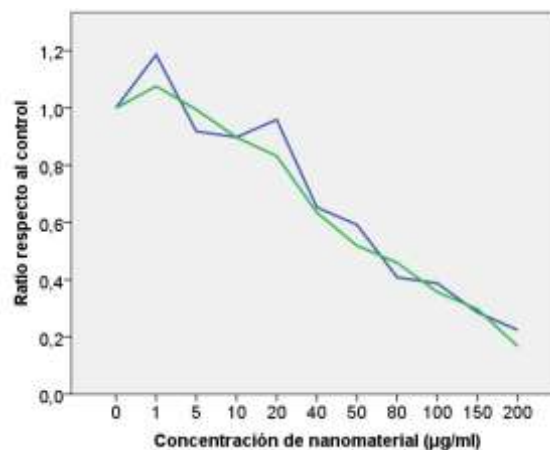


Figura 19: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea Caco-2 tras los tratamientos con NM402 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

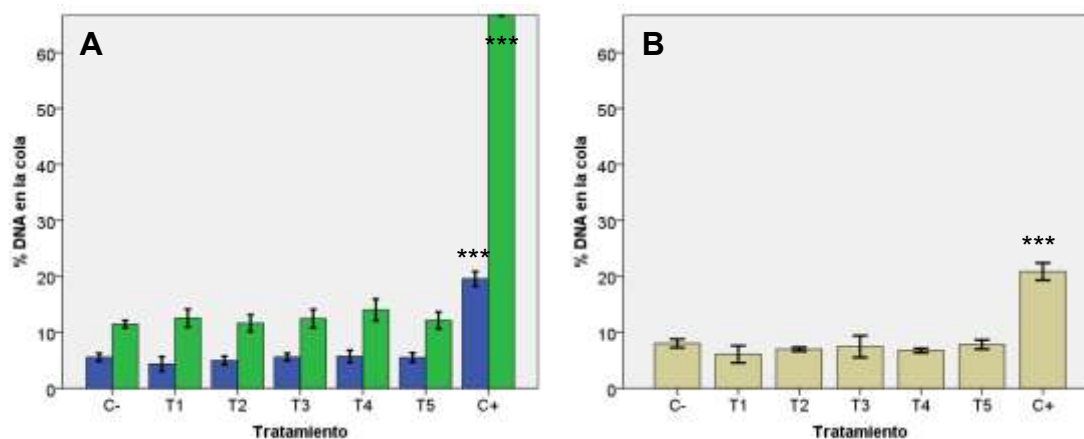


Figura 20: Resultados del ensayo del cometa en la línea Caco-2 tratada con NM402 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 80 y 100 µg/mL del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

4.2.1.4. NM403

a) Visualización

Las imágenes obtenidas por TEM del compuesto NM403 (figura 21) después de su dispersión, muestran la existencia de agregados parecidos a ovillos, tal como se ha encontrado con el NM402. La morfología muestra que también tienen un aspecto flexible como el NM400 y NM402 y, así como se ha observado en estos nanomateriales, parecen existir estructuras electrodenudas entre los nanotubos de carbono (imagen B).

b) Citotoxicidad

Los resultados de la citotoxicidad del compuesto NM403 se presentan en la figura 22. Como se observa, este compuesto no parece ejercer un efecto citotóxico importante sobre las células de la línea Caco-2. Este comportamiento se obtiene independientemente de la duración del tratamiento llevado a cabo (3 y 24 horas). Por lo tanto, la conclusión de este experimento es que el compuesto NM403 no parece ejercer importantes efectos citotóxicos en la línea Caco-2.

c) Genotoxicidad

Por lo que hace referencia a los resultados obtenidos sobre la genotoxicidad del compuesto NM403, éstos indican que este nanomaterial, de manera similar

a lo que sucede con los anteriores MWCNT, no es capaz de inducir incrementos en los niveles de daño en el DNA de la línea Caco-2. Esto sucede en todas las concentraciones utilizadas e independientemente de que los tratamientos hayan sido de 3 horas o de 24 horas (figura 23). Esta falta de efecto se observa tanto en la versión estándar del cometa como cuando se utiliza la enzima FPG, de lo que se deduce que el compuesto NM403 no es capaz de inducir alteraciones que generen daño en el DNA.

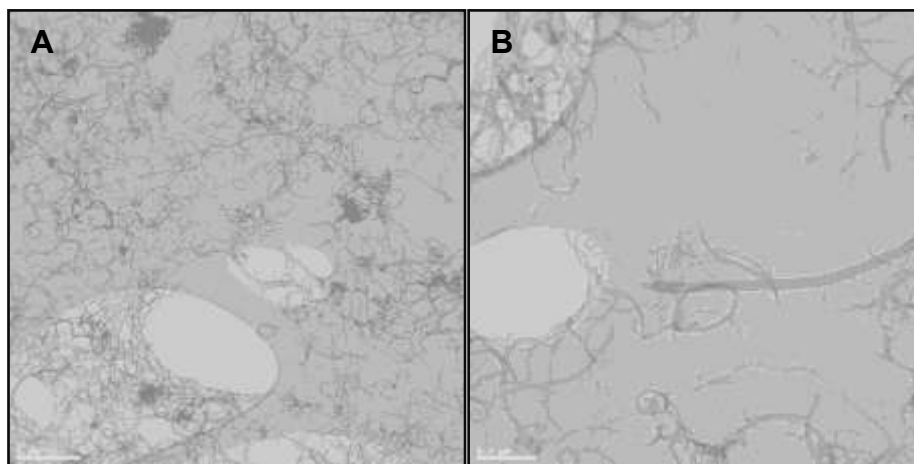


Figura 21: Imágenes obtenidas mediante TEM de la dispersión del NM403. **A)** corresponde a una imagen 15000X, la barra de escala corresponde a 500 nm; **B)** corresponde a una imagen 50000X y la barra de escala corresponde a 200 nm.

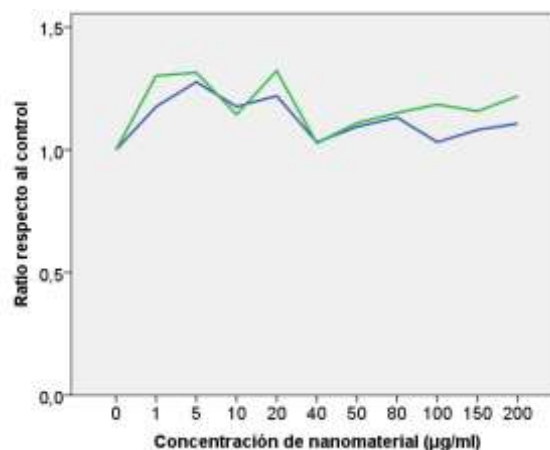


Figura 22: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea Caco-2 tras los tratamientos con NM403 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

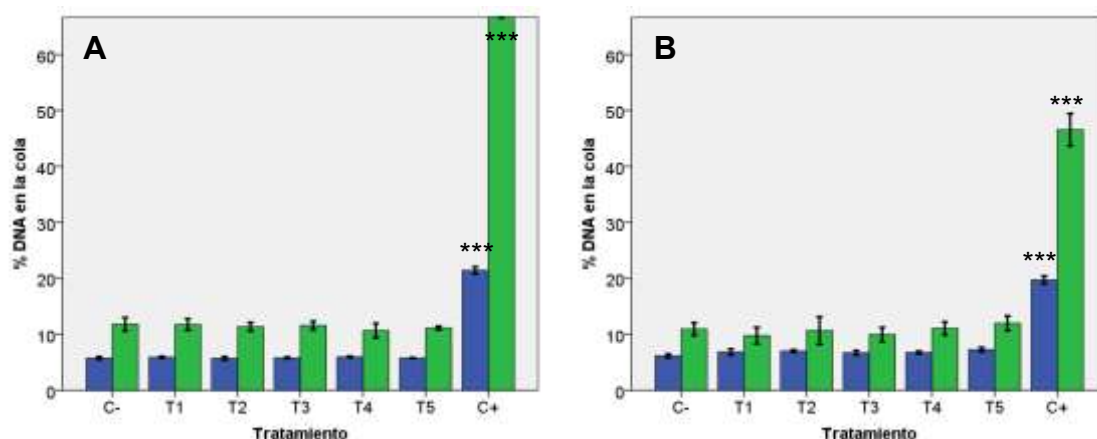


Figura 23: Resultados del ensayo del cometa en la línea Caco-2 tratada con NM403 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

4.2.1.5. NRCWE006

Con este compuesto, sintetizado en uno de los centros participantes en el proyecto, no se ha llevado a cabo ninguna caracterización mediante TEM, aunque ha sido objeto de un profundo estudio dentro del proyecto.

a) Citotoxicidad

Cuando se evalúa la actividad citotóxica del compuesto NRCWE006 se observa que presenta un leve efecto citotóxico en Caco-2 en ambos tiempos de tratamiento (figura 24), siendo ligeramente mayor su efecto sobre la viabilidad celular tras exposiciones de 24 horas. Sin embargo, a pesar de esta ligera tendencia, el compuesto debería clasificarse como no citotóxico sobre la línea Caco-2.

b) Genotoxicidad

Por lo que respecta a los resultados de genotoxicidad obtenidos con el compuesto NRCWE006, éstos se presentan en la figura 25. Como se observa, ninguna de las concentraciones ensayadas ha sido capaz de inducir incrementos sobre la frecuencia basal del daño en el DNA. Esto sucede tanto en los tratamientos de 3 horas como en el de 24 horas. Por lo que respecta a la habilidad del compuesto NRCWE006 de producir daño oxidativo, los resultados no indican la inducción de tal tipo de efecto. Como en casos anteriores, las

células Caco-2 responden de manera significativa a los tratamientos llevados a cabo con el control positivo, validando los resultados negativos obtenidos con este compuesto, bajo las condiciones experimentales ensayadas.

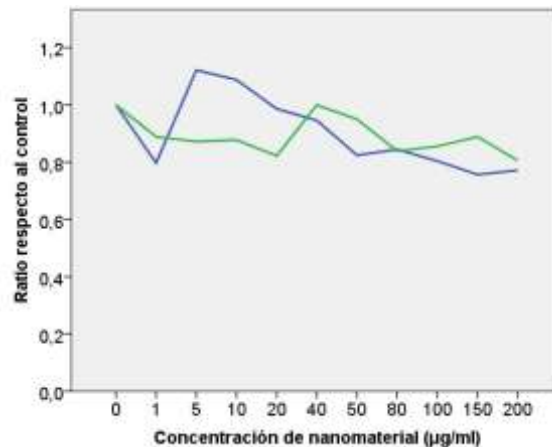


Figura 24: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea Caco-2 tras los tratamientos con NRCWE006 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

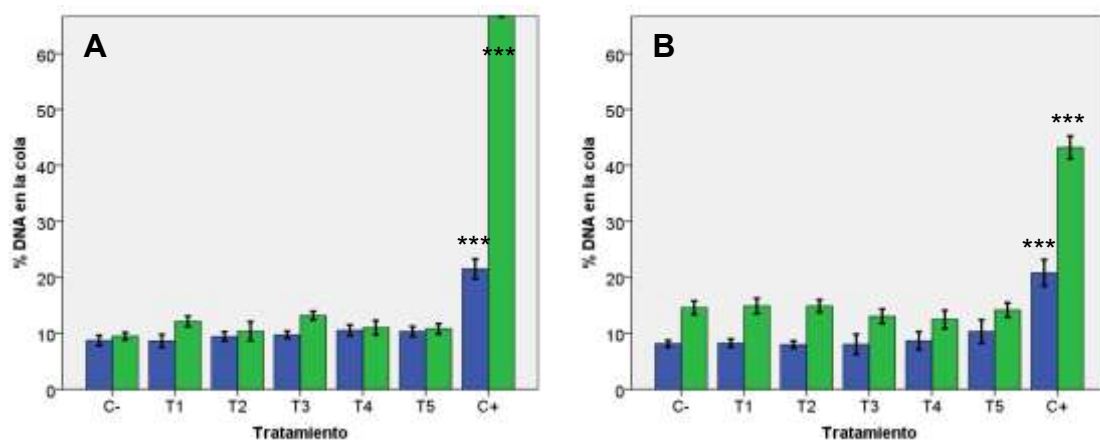


Figura 25: Resultados del ensayo del cometa en la línea Caco-2 tratada con NRCWE006 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 µg/mL del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

4.2.1.6. NRCWE007

a) Citotoxicidad

Los resultados obtenidos con el compuesto NRCWE007 indican que éste no presenta efectos citotóxicos en la línea celular Caco-2 (figura 26). Como se observa, aunque existe una variabilidad en los valores de viabilidad obtenidos

en las diferentes concentraciones, la tendencia no indica una clara relación dosis-efecto. Esto sucede tanto en el tratamiento de 3 horas como en el de 24 horas sin que se pueda concluir que existe una tendencia a producir mayores efectos tras los tratamientos de 3 horas, a pesar de que la línea de efecto a estas dosis siempre está por debajo de la de 24 horas.

b) Genotoxicidad

El ensayo del cometa, tal como se indica en la figura 27, tanto el realizado tras 3 horas de tratamiento como el realizado tras 24 horas, no detecta ningún incremento en el porcentaje del DNA en la cola. Esto sucede en todas las concentraciones utilizadas y tras los dos tiempos de tratamiento. Igual que sucede para el daño basal tampoco se observa ninguna significación tras la inclusión de la enzima FPG en el ensayo. Como en los casos anteriores el control positivo ha sido capaz de inducir incrementos significativos, tanto en los niveles de daño basal como oxidativo.

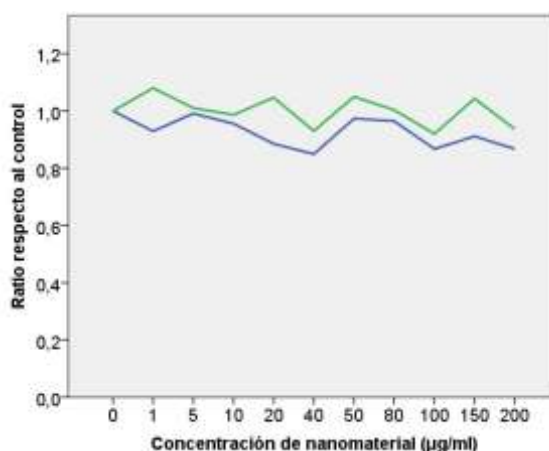


Figura 26: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea Caco-2 tras los tratamientos con NRCWE007 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

4.2.1.7. Consideraciones generales

Cuando observamos el conjunto de resultados obtenidos con los nanotubos de carbono y la línea celular Caco-2, se observan diferencias a nivel citotóxico entre los distintos nanomateriales. Por ejemplo, mientras los nanomateriales NM401 y NM402 son capaces de inducir citotoxicidad de manera clara, el NM400 y el NRCWE007 sólo inducen una muy ligera citotoxicidad.

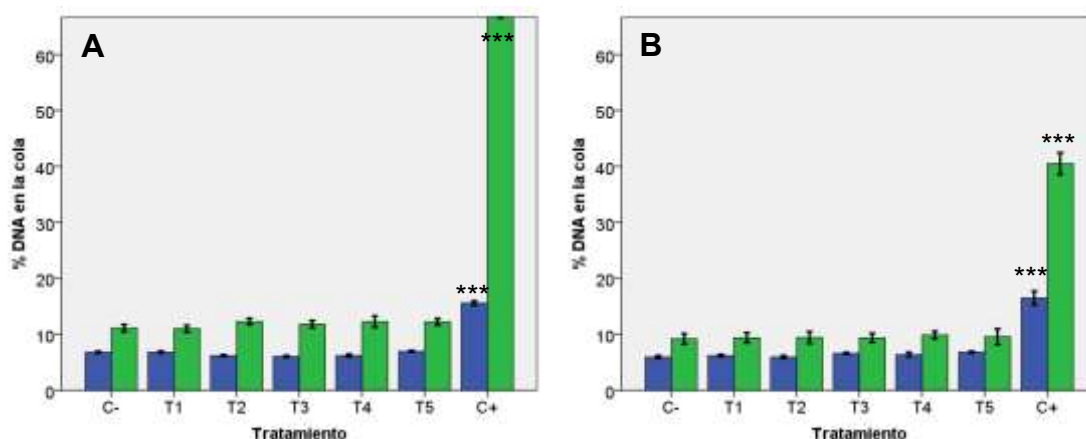


Figura 27: Resultados del ensayo del cometa en la línea Caco-2 tratada con NRCWE007 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

Por otra parte, los nanomateriales NM403 y NRCWE006 no son capaces de inducir ningún tipo de citotoxicidad detectable. Por lo que se refiere a la potencialidad de inducir daño en el DNA, determinado mediante el ensayo del cometa, sólo una de las concentraciones de uno de los nanomateriales, concretamente el NM401, fue capaz de generar una inducción significativa en los valores de daño en el DNA (en la versión modificada con la enzima). Sin embargo este efecto lo consideramos irrelevante desde el punto de vista biológico. Por lo tanto se concluye que los MWCNT son incapaces de inducir daño primario en el DNA de las células de la línea Caco-2. Esta falta de actividad genotóxica es extensible a la inducción de efecto oxidativo ya que en todos los experimentos realizados con la enzima FPG los resultados obtenidos han sido completamente negativos. Por lo tanto, se concluye que los MWCNT no generan ningún mecanismo capaz de inducir estrés oxidativo que suponga un ataque oxidante a las bases del DNA. También es destacable la velocidad a la que se agregan todos los compuestos utilizados en este medio, pudiéndose observar un alto nivel de agregación a los pocos minutos del tratamiento, siendo más acusado cuanto mayor es la concentración utilizada.

4.2.2 Resultados obtenidos en la línea celular BEAS-2B

A continuación se exponen los resultados obtenidos en los estudios de citotoxicidad y de genotoxicidad llevados a cabo con la línea celular BEAS-2B

con los mismos nanotubos de carbono utilizados con la línea Caco-2 (NM400, NM401, NM402, NM403, NRCWE006 y NRCWE007). Dado que son los mismos nanomateriales, no se indica nada sobre su estructura y caracterización por TEM.

4.2.2.1. NM400

a) Citotoxicidad

Los resultados del experimento de citotoxicidad con el compuesto NM400 en la línea celular BEAS-2B, se indican en la figura 28. Como se observa, este compuesto induce un efecto citotóxico significativo, evidente ya a partir de las concentraciones más bajas. Es interesante remarcar que no parecen existir diferencias importantes en la citotoxicidad en función del tiempo de tratamiento ya que en ambos tipos de exposición los resultados son muy similares. Es de destacar que la línea BEAS-2B muestra ser mucho más sensible que la Caco-2 a los efectos del NM400.

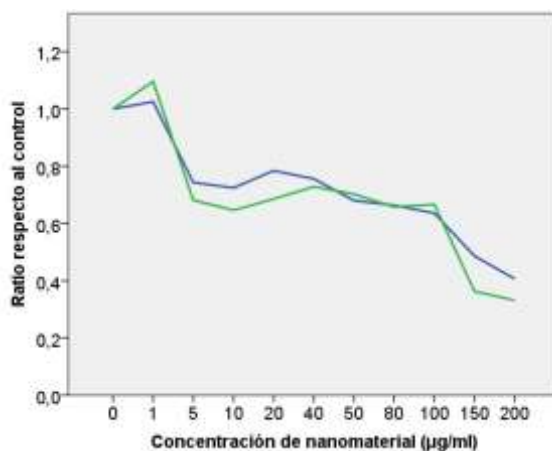


Figura 28: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea BEAS-2B tras los tratamientos con NM400 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

b) Genotoxicidad

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos en el ensayo del cometa, hay que indicar que ninguna de las concentraciones usadas ha inducido incrementos del daño significativo en ninguno de los tiempos de tratamiento (figura 29). Esto es válido tanto cuando se valoran los niveles de daño mesurable en el ensayo del cometa (generalmente roturas) como cuándo se

estiman los niveles de daño oxidativo inducido en las bases del DNA. En este caso, el control positivo del daño primario en el tratamiento de 24 horas no es estadísticamente significativo.

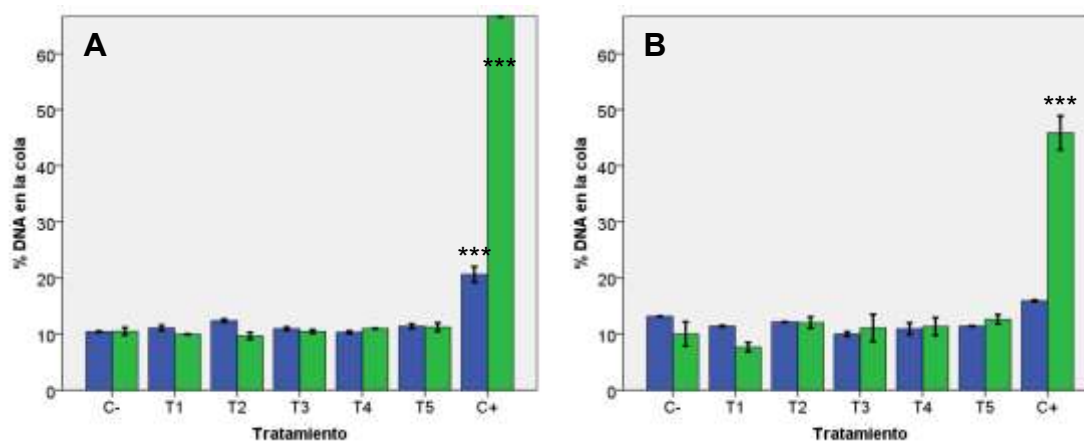


Figura 29: Resultados del ensayo del cometa en la línea BEAS-2B tratada con NM400 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

4.2.2.2. NM401

a) Citotoxicidad

Cuando se evalúa los efectos citotóxicos del compuesto NM401 en la línea celular BEAS-2B, indicados en la figura 30, se observa que éstos presentan un perfil distinto en función del tiempo de tratamiento. Mientras que en el tratamiento de 3 horas el compuesto NM401 no parece inducir un incremento de la toxicidad, tras el tratamiento de 24 horas se observa un ligero incremento de la citotoxicidad, llegando a un porcentaje de viabilidad del 80% respecto al control negativo, a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, no existe una relación dosis-efecto, ya que el porcentaje de células viables se mantiene sobre este valor tras los tratamientos con las dosis más elevadas. Por otra parte, tras el tratamiento de 3 horas, no existe un efecto citotóxico claro, pese a la variabilidad de los resultados obtenidos en función de la dosis utilizada. Cabe remarcar que, según estos datos, la línea Caco-2 es mucho más sensible a este compuesto que la línea BEAS-2B.

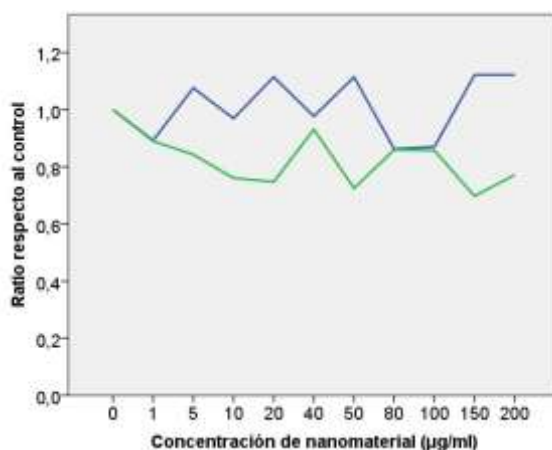


Figura 30: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea BEAS-2B tras los tratamientos con NM401 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

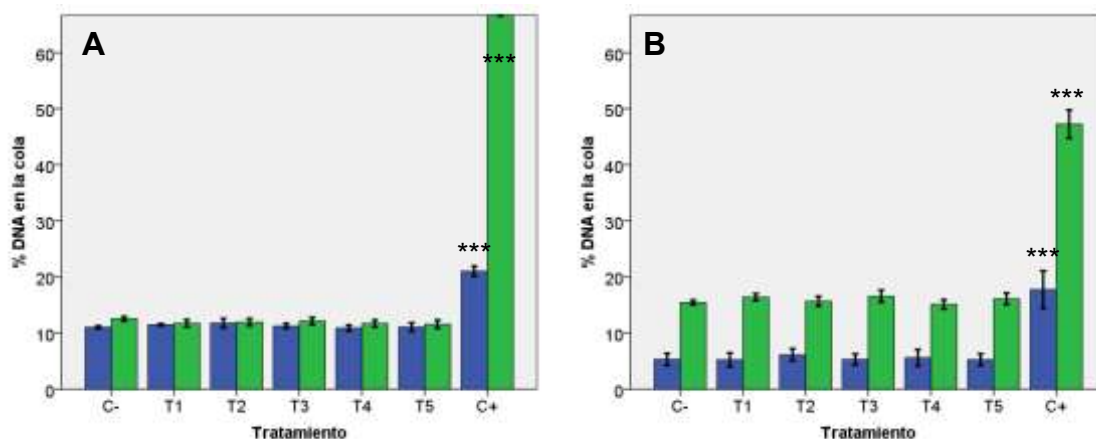


Figura 31: Resultados del ensayo del cometa en la línea BEAS-2B tratada con NM401 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 µg/mL del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** P<0,001.

b) Genotoxicidad

Por lo que hace referencia a los resultados obtenidos sobre la genotoxicidad del compuesto NM401 (figura 31), éstos indican que este nanomaterial no es capaz de inducir incrementos en los niveles de daño en el DNA de la línea BEAS-2B, de manera similar a lo que ocurre con otros MWCNT. Esto sucede independientemente del tiempo de tratamiento o de la versión del ensayo del cometa utilizada. Por lo tanto el compuesto NM401 no ha sido capaz de inducir roturas de cadena o daño oxidativo en el DNA, en la línea celular BEAS-2B. Como en el caso anterior, las células BEAS-2B responden de manera

significativa al tratamiento con el control positivo en ambas versiones del ensayo del cometa, tras los dos tiempos de tratamiento utilizados.

4.2.2.3. NM402

a) Citotoxicidad

Como se indica en la figura 32, el compuesto NM402 presenta un perfil citotóxico similar en ambos tiempos de tratamiento; aunque tras 24 horas de tratamiento la viabilidad siempre es menor que tras el tratamiento de 3 horas. Como puede apreciarse, ambos tiempos de tratamiento presentan una disminución significativa en la dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$, siendo mayor en el tratamiento de 24 horas, donde la viabilidad respecto al control en esta concentración es menor del 80%. Pese a ello, no hay una relación dosis-efecto ya que este hecho no se reproduce en las demás concentraciones más altas. Para este compuesto la línea Caco-2 también ha mostrado ser mucho más sensible a este compuesto que la línea BEAS-2B.

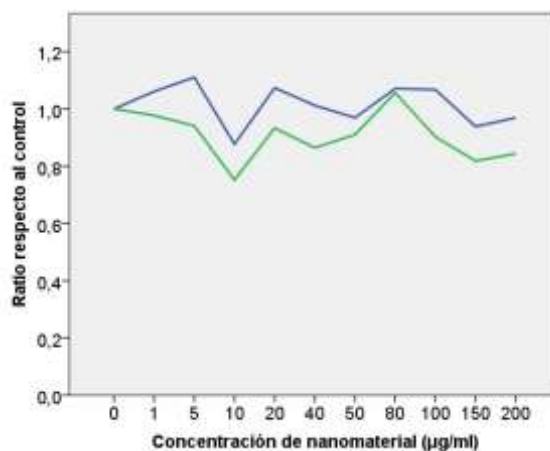


Figura 32: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea BEAS-2B tras los tratamientos con NM402 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

c) Genotoxicidad

Por lo que se refiere a la genotoxicidad del compuesto NM402 los resultados obtenidos se presentan en la figura 33. Se puede observar la ausencia de incrementos significativos de daño, tras los dos tiempos de tratamiento (3 y 24 horas). En ninguna de las versiones del ensayo del cometa ha habido incrementos, indicando que este compuesto no ha sido capaz de generar

roturas de cadena o de generar daño oxidativo en las bases del DNA de la línea celular BEAS-2B. Como en los casos anteriores los resultados obtenidos en los controles positivos son claros, confirmando la consideración de que el NM402 no es genotóxico sobre las células BEAS-2B.

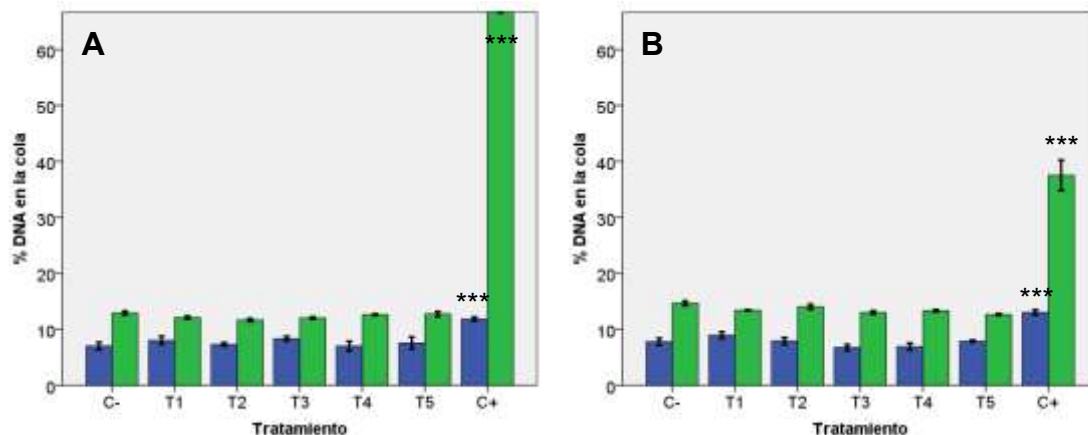


Figura 33: Resultados del ensayo del cometa en la línea BEAS-2B tratada con NM402 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

4.2.2.4. NM403

a) Citotoxicidad

Por lo que respecta a los resultados de toxicidad obtenidos con el compuesto NM403, éstos se presentan en la figura 34. Como se observa, este compuesto presenta un perfil citotóxico distinto en función del tiempo de tratamiento en la línea celular BEAS-2B. Tras el tratamiento de 3 horas entre las dosis de 1 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hay una disminución de la viabilidad importante, rondando el 65-70%. Sorprendentemente, en este tiempo de tratamiento, la disminución de la viabilidad no es tan significativa en las dosis más elevadas. Por otra parte, tras 24 horas de tratamiento no aparece un efecto citotóxico hasta la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, donde la viabilidad respecto al control es del 80%. En contraposición con los dos nanotubos anteriores, la línea BEAS-2B muestra ser más sensible a este compuesto que la línea Caco-2.

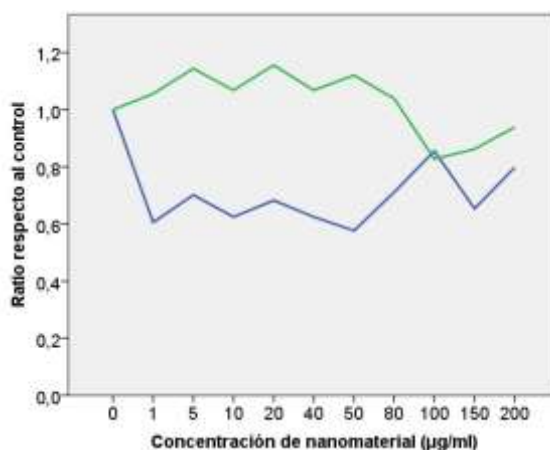


Figura 34: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea BEAS-2B tras los tratamientos con NM403 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

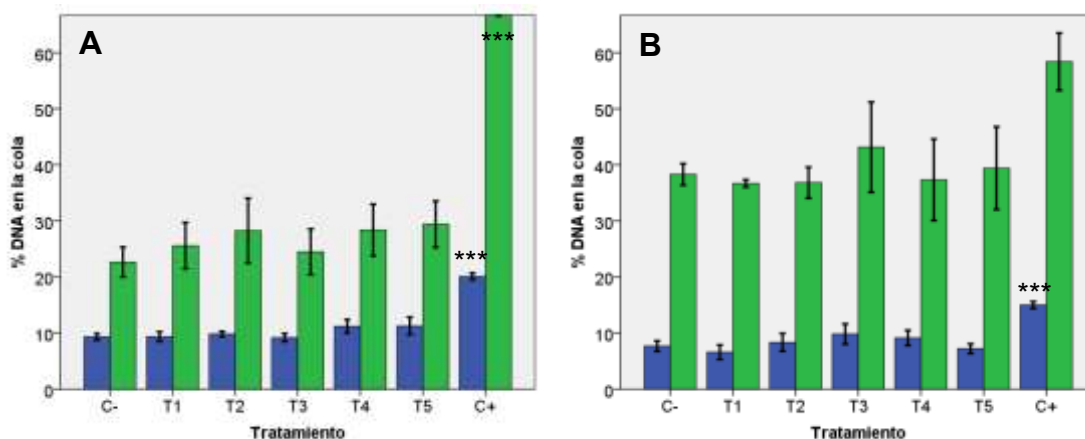


Figura 35: Resultados del ensayo del cometa en la línea BEAS-2B tratada con el NM403 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

b) Genotoxicidad

Ninguna de las concentraciones del compuesto NM403 ensayadas ha sido capaz de inducir incrementos sobre la frecuencia basal del daño en el DNA, tanto en los tratamientos de 3 horas como en los de 24 horas, tal como se observa en la figura 35. Por lo que respecta a la capacidad de este compuesto de producir daño oxidativo, los resultados no indican que haya una inducción de este tipo de efecto. Sin embargo, los valores obtenidos de porcentaje de DNA en la cola para esta versión del ensayo muestran que hay un nivel basal de daño oxidativo muy elevado en todas las muestras, lo que indica que debe

de haber existido algún problema en la manipulación de las células, ya sea durante el establecimiento de los cultivos y/o tratamiento, o durante el ensayo del cometa. Pese a ello, las células BEAS-2B siguen respondiendo de manera significativa a los tratamientos con el control positivo, validando los resultados negativos obtenidos, excepto en la versión del ensayo del cometa con la enzima FPG a las 24 horas de tratamiento, donde estos resultados no se pueden dar por válidos al no dar el tratamiento con el control positivo incrementos del daño oxidativo en el DNA estadísticamente significativos.

4.2.2.5. NRCWE006

a) Citotoxicidad

Los resultados obtenidos con el compuesto NRCWE006 presentan un efecto divergente en función del tiempo de tratamiento. En la figura 36 se puede observar que la viabilidad no se ve afectada en ninguna de las dosis tras el tratamiento de 3 horas. En cambio, existe una importante disminución de la viabilidad tras el tratamiento de 24 horas, ya que se aprecia una disminución significativa en la dosis de 5 µg/mL, donde el porcentaje de viabilidad respecto al control negativo es del 50%. Este efecto citotóxico se mantiene hasta los 40 µg/mL, y en las dosis sucesivas la viabilidad celular vuelve a ser similar a la del control negativo. Esta respuesta de la línea celular BEAS-2B tras el tratamiento de 24 horas difiere de la observada en la línea celular Caco-2 con este compuesto.

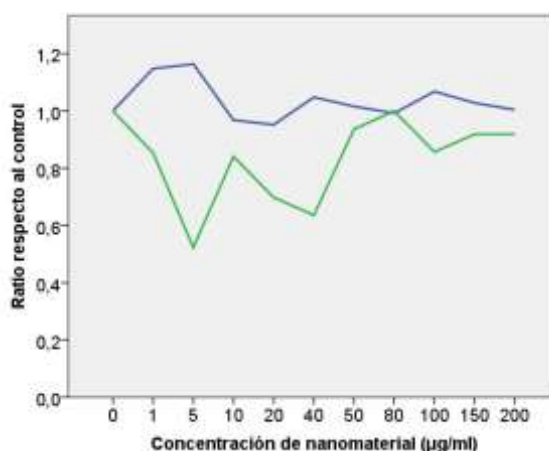


Figura 36: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea BEAS-2B tras los tratamientos con NRCWE006 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

b) Genotoxicidad

El ensayo del cometa, realizado para ambos tiempos de tratamiento (3 y 24 horas), no detecta ningún incremento del porcentaje del DNA en la cola, como se indica en la figura 37. Así, no se observan incrementos del daño basal ni del daño oxidativo, tras la inclusión de la enzima FPG en el ensayo. Tal como ha sucedido en los casos anteriores, el control positivo induce incrementos significativos tanto en los niveles de daño basal como oxidativo, por lo tanto, este compuesto no induce genotoxicidad en la línea celular BEAS-2B.

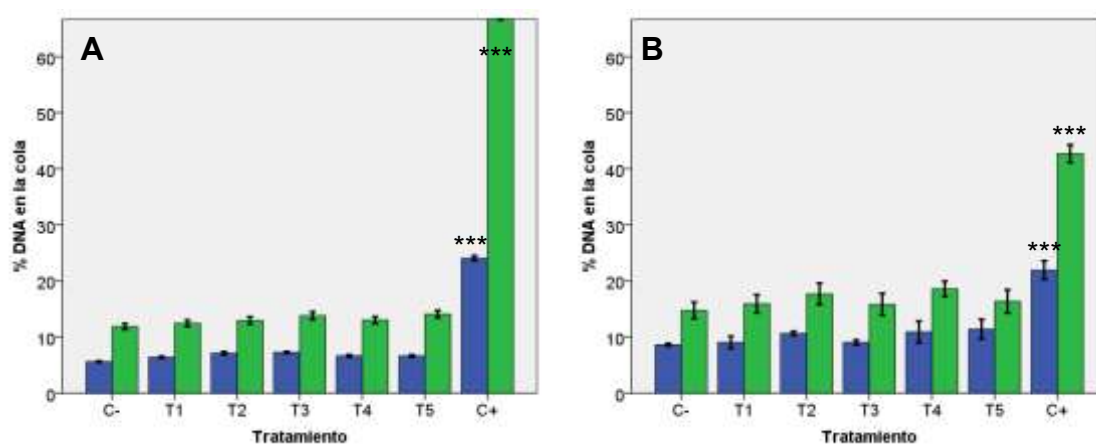


Figura 37: Resultados del ensayo del cometa en la línea BEAS-2B tratada con NRCWE006 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** $P < 0,001$.

4.2.2.6. NRCWE007

a) Citotoxicidad

Los resultados del experimento de citotoxicidad con el compuesto NRCWE007 en la línea celular BEAS-2B, se indican en la figura 38. Como se observa, el perfil citotóxico de este compuesto es distinto en función del tiempo de tratamiento. Sólo existe una disminución de la viabilidad respecto al control negativo tras el tratamiento de 24 horas, donde aparece un leve efecto citotóxico con una clara relación dosis-efecto. En cambio tras el tratamiento de 3 horas no se detecta citotoxicidad. Así pues, la línea celular BEAS-2B presenta una sensibilidad similar a la de la línea Caco-2 tras el tratamiento a 3 horas, mientras que es más sensible en el tratamiento de 24 horas.

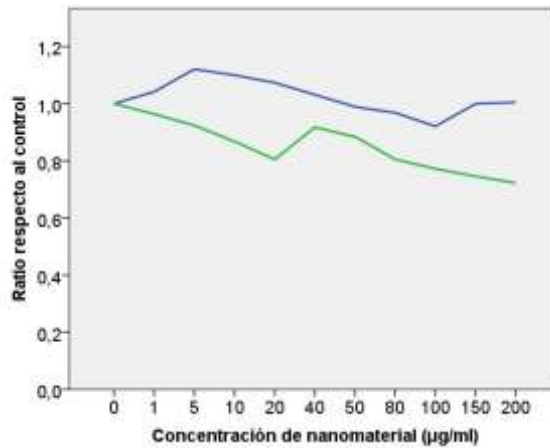


Figura 38: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea BEAS-2B tras los tratamientos con NRCWE007 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

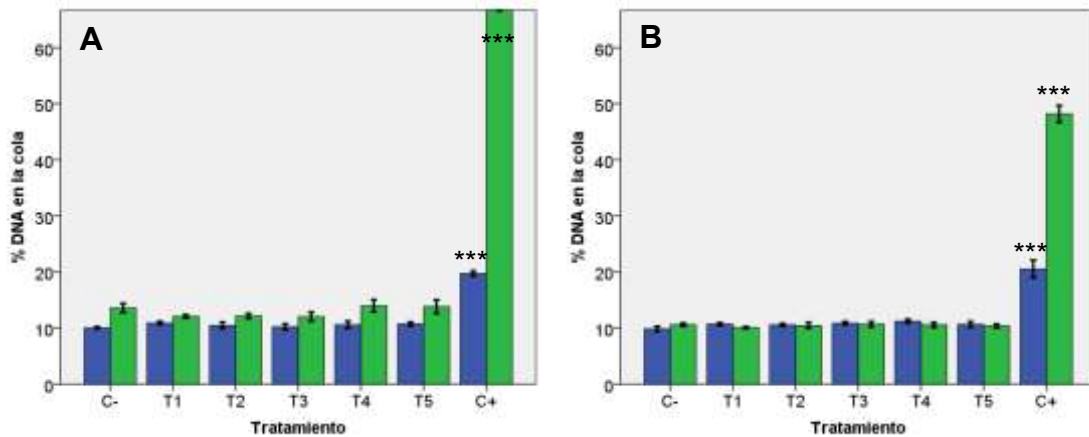


Figura 39: Resultados del ensayo del cometa en la línea BEAS-2B tratada con NRCWE007 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 50, 100 y 200 µg/mL del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** P<0,001.

b) Genotoxicidad

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos en el ensayo del cometa, hay que indicar que ninguna de las concentraciones usadas ha inducido incrementos significativos en los niveles de daño, en ninguno de los tiempos de tratamiento (figura 39), tanto en los niveles de daño mesurable en el ensayo del cometa (generalmente roturas), como en la estimación de los niveles de daño oxidativo inducido al introducir la enzima FPG en el ensayo. En este caso, y tal como sucede en los anteriores experimentos, la línea celular BEAS-2B responde de manera positiva a los tratamientos con el control positivo, con lo

cual se puede concluir que el NRCWE007 no induce genotoxicidad en BEAS-2B.

4.2.2.7. Consideraciones generales

Cuando observamos el conjunto de resultados obtenidos en los nanotubos de carbono y la línea BEAS-2B, se puede observar que existen diferencias a nivel citotóxico entre los distintos nanomateriales, tal como sucede con la línea celular Caco-2. En general en esta línea celular no hay nanomateriales que presentan una alta citotoxicidad. Solamente en el NM400 existe un efecto citotóxico importante que, sin embargo, se mantiene estable en un rango de dosis muy amplio (de 5 a 100 µg/mL). Por otra parte, varios de los compuestos analizados con esta línea presentan divergencias en el perfil citotóxico dependiendo del tiempo de tratamiento, siendo los casos más destacables los compuestos NM403, NRCWE006 y NRCWE007 donde, tras el tratamiento de 24 horas, se aprecia una mayor citotoxicidad excepto con el NM403, donde es tras el tratamiento de 3 horas cuando la citotoxicidad es mayor. Además, es remarcable que este efecto citotóxico suele aparecer en las concentraciones bajas, para mantenerse (NM400 y NM403 tras el tratamiento de 24 horas) o volver a niveles de viabilidad parecidos a los del control (NRCWE006).

Si se comparan los resultados obtenidos en la línea BEAS-2B con los obtenidos en la línea Caco-2, se observa que ninguno de los compuestos analizados es citotóxico para ambas líneas salvo el compuesto NM400. Mientras que no hay efectos citotóxicos relevantes con el NM401 y NM402 en la línea BEAS-2B, estos compuestos presentan una citotoxicidad importante en la línea Caco-2, sucediendo a la inversa con los compuestos NM403 (tras el tratamiento de 3 horas) y el NRCWE006 (tras el tratamiento de 24 horas).

Por lo que se refiere a los efectos genotóxicos de los nanotubos de carbono para la línea celular BEAS-2B, ninguno de éstos ha sido capaz de inducir un incremento del daño genotóxico detectado en ninguno de los tiempos de tratamiento, ni en ninguna de las versiones del ensayo del cometa. Por lo tanto, no tienen capacidad de inducir roturas o daño en el DNA de tipo oxidativo en la línea BEAS-2B. Tal como sucede con el medio de la línea Caco-2, la agregación de los nanomateriales en el medio es muy rápida, aunque los agregados y la interacción con las células tiene un aspecto distinto ya que a

bajas dosis la interacción parece mayor en las concentraciones más altas, algo que no ha sucedido con la línea Caco-2.

4.2.3. Resultados obtenidos en la línea celular 16HBE

A continuación se exponen los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad obtenidos con la línea celular 16HBE con los tratamientos de los distintos compuestos SAS (NM200, NM201, NM202 y NM203).

4.2.3.1. NM200

a) Citotoxicidad

Los resultados obtenidos con el compuesto NM200 con la línea celular 16HBE se muestran en la figura 40. Como se puede observar, este nanomaterial presenta una clara citotoxicidad, ya que existe una reducción de las células viables respecto al control negativo tras ambos tiempos de tratamiento (3 y 24 horas), presentando éstos un perfil muy similar. En ambos tiempos de tratamiento la primera dosis que presenta toxicidad es 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, donde el porcentaje de células viables es del 80%. En la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la más alta utilizada, el porcentaje de células viables baja al 45%. Para ambos tiempos de tratamiento se observa un efecto dosis-dependiente de tipo indirecto donde al aumentar la dosis, disminuye la viabilidad.

b) Genotoxicidad

Por lo que se refiere a la genotoxicidad del compuesto NM200, los resultados obtenidos se indican en la figura 41. Tras el tratamiento a 3 horas existe un incremento del daño basal en las dosis de 40, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque ninguna de éstas es estadísticamente significativa. Pese a la ausencia de significación estadística, se observa una relación dosis-respuesta hasta la dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde, a partir de ésta, el daño inducido se estabiliza. Este incremento detectado tras el tratamiento de 3 horas no se reproduce tras el tratamiento de 24 horas, donde no hay una inducción del daño basal u oxidativo, aunque en la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (la más elevada) en el ensayo modificado con la enzima FPG existe un incremento no significativo de la inducción de daño oxidativo en las bases del DNA de la línea 16HBE. Por otra parte, las células de la línea 16HBE responden de manera significativa al tratamiento con el control positivo.

Por lo tanto, pese a que hay una inducción no significativa del daño en el DNA tras el tratamiento a 3 horas, según los resultados obtenidos el NM200 no muestra actividad genotóxica en la línea 16HBE.

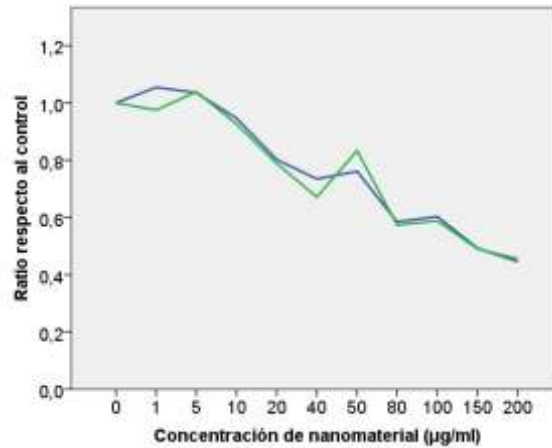


Figura 40: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea 16HBE tras los tratamientos con NM200 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

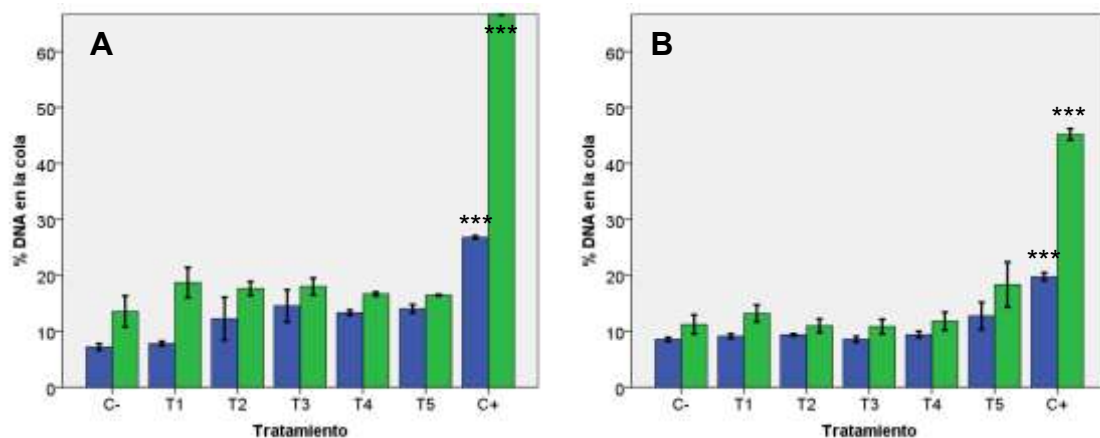


Figura 41: Resultados del ensayo del cometa en la línea 16HBE tratada con NM200 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 20, 40, 80 y 100 µg/mL del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** P<0,001.

4.2.3.2. NM201

a) Citotoxicidad

Como se puede observar en la figura 42, los efectos del compuesto NM201 sobre las células 16HBE son muy similares a los observados para el NM200. Este compuesto también presenta una alta citotoxicidad para ambos tiempos

de tratamiento, aunque en el caso de este compuesto, la disminución de la viabilidad es mayor en el tratamiento de 24 horas, especialmente en las concentraciones más bajas, igualándose este efecto con el tratamiento de 3 horas a partir de la dosis de 80 µg/mL. La capacidad citotóxica de este compuesto se refleja en la dosis más elevada, ya que tras ambos tiempos de tratamiento, el porcentaje de viabilidad disminuye hasta el 20%.

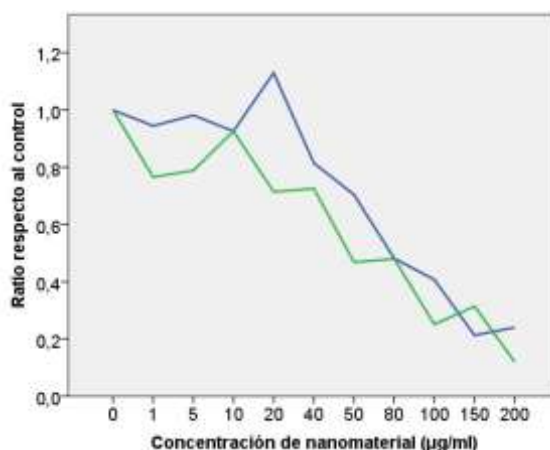


Figura 42: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea 16HBE tras los tratamientos con NRM201 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

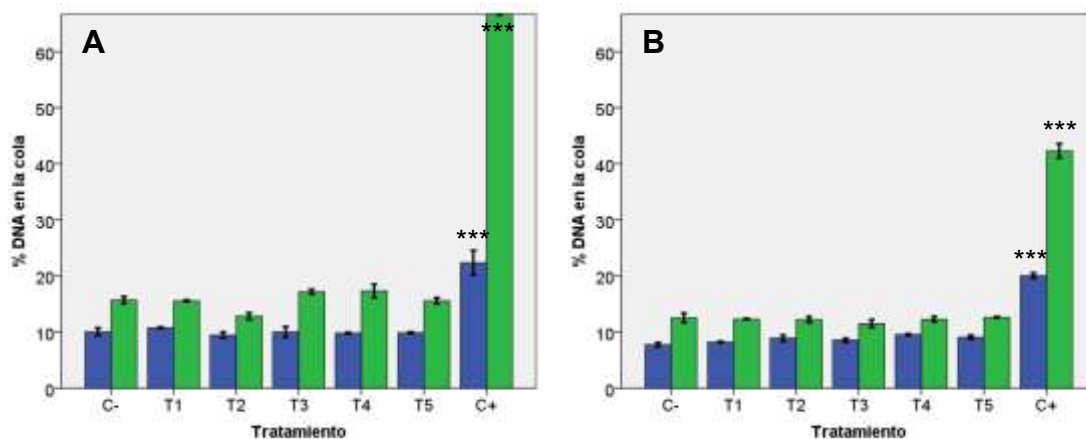


Figura 43: Resultados del ensayo del cometa en la línea 16HBE tratada con NM201 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 10, 20, 40 y 60 µg/mL del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** P<0,001.

b) Genotoxicidad

Por lo que se refiere a la genotoxicidad del compuesto NM201 los resultados obtenidos se presentan en la figura 43. Se puede observar que no existen

incrementos significativos del daño tras ninguno de los tiempos de tratamiento, ni en ninguna de las versiones del ensayo; por lo tanto, el compuesto NM201 no es capaz de inducir roturas o daño oxidativo en el DNA de la línea celular 16HBE. Esto se ve confirmado por el hecho de que el tratamiento con el control positivo induce un incremento significativo del daño en el DNA, indicando el correcto funcionamiento del ensayo.

4.2.3.3. NM202

a) Citotoxicidad

Por lo que respecta a la toxicidad del compuesto NM202, observada en la figura 44, ésta es muy marcada y sigue una clara relación dosis-respuesta. Por lo que se refiere al perfil citotóxico, no existen diferencias remarcables entre los tratamientos de 3 y 24 horas, en ambas se observa una disminución muy importante de la viabilidad celular respecto al control en la dosis de 40 µg/mL, estabilizándose a partir de entonces y llegando a un porcentaje del 30% en la concentración más alta. Así, se concluye que este compuesto, de igual manera a los anteriores SAS, presenta un claro efecto sobre la línea celular 16HBE.

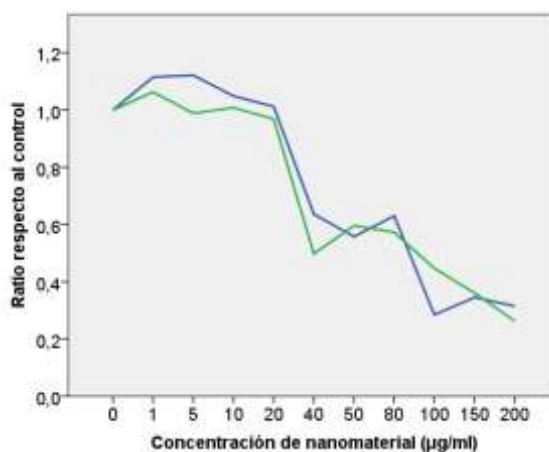


Figura 44: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea 16HBE tras los tratamientos con NM202 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

b) Genotoxicidad

Los resultados obtenidos en el ensayo del cometa con el compuesto NM202 se encuentran indicados en la figura 45. Como se observa, ni los tratamientos de 3 ni en los de 24 horas inducen incrementos significativos de daño en el DNA.

Además, no se observó en ningún caso una tendencia a que los efectos dependan de la dosis aplicada, por lo que se que este compuesto no induce genotoxicidad en la línea celular 16HBE. Los resultados obtenidos para el control positivo confirman que el experimento se llevó a cabo de manera correcta.

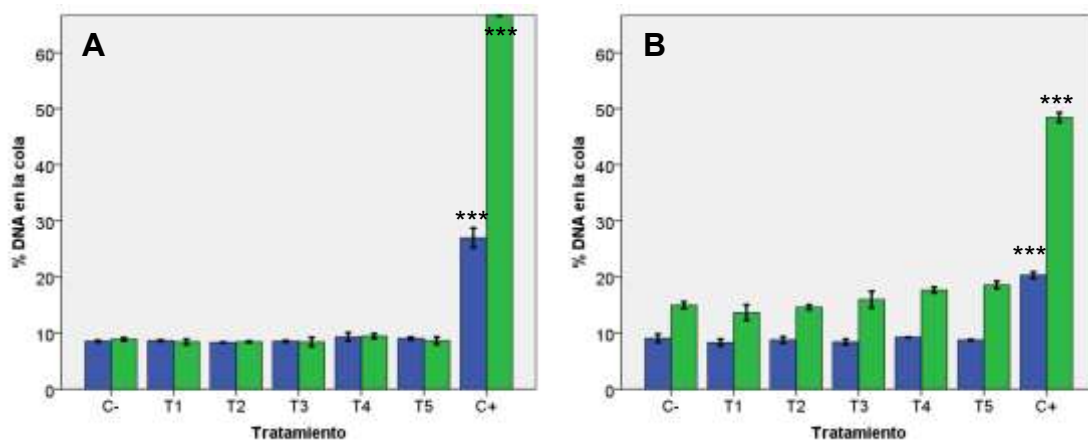


Figura 45: Resultados del ensayo del cometa en la línea 16HBE tratada con NM202 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** P<0,001.

4.2.3.4. NM203

a) Citotoxicidad

Los resultados de la citotoxicidad del compuesto NM203 se presentan en la figura 46. Como sucede con los otros compuestos SAS utilizados, el NM203 presenta un claro efecto citotóxico tras ambos tiempos de tratamiento. En este caso el perfil citotóxico vuelve a ser similar en ambos tiempos de tratamiento, tal y como sucede con el NM200 y el NM202. Además, existe también un claro efecto dosis-respuesta. Por lo tanto, podemos concluir que este compuesto es citotóxico en la línea celular 16HBE.

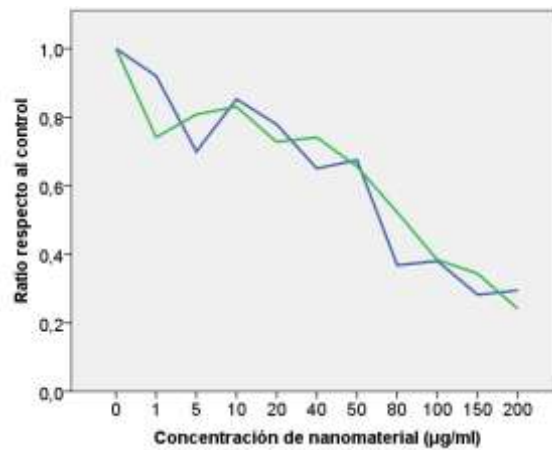


Figura 46: Resultados del ensayo de citotoxicidad en la línea 16HBE tras los tratamientos con NM203 por 3 y 24 horas (3 horas línea en azul, 24 horas línea en verde). Los valores de viabilidad se hacen relativos a los del control negativo.

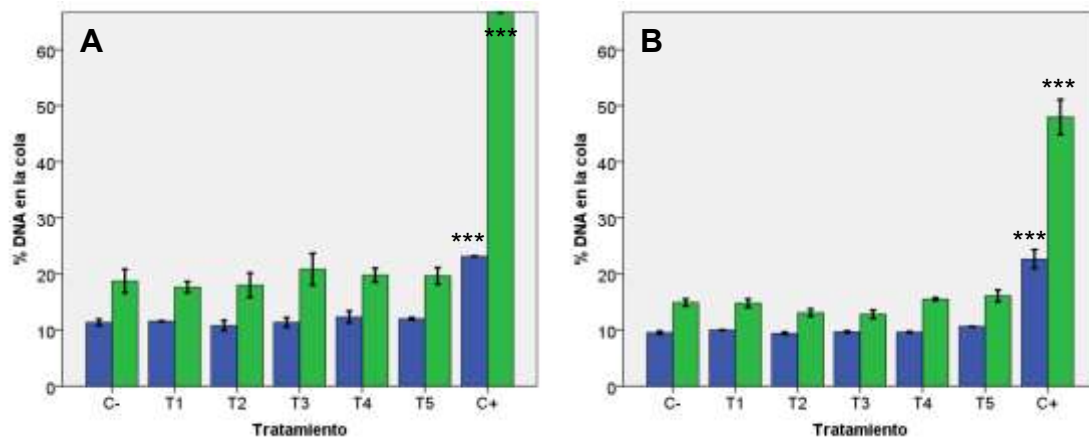


Figura 47: Resultados del ensayo del cometa en la línea 16HBE tratada con el NM203 durante 3 (A) y 24 horas (B). T1, T2, T3, T4 y T5 corresponden a los tratamientos con 5, 10, 20, 50 y 80 µg/mL del nanomaterial para ambos tiempos de tratamiento. Las barras azules corresponden al daño basal y las barras verdes al daño oxidativo. *** P<0,001.

b) Genotoxicidad

Por lo que hace referencia a los resultados obtenidos sobre la genotoxicidad del compuesto NM203, éstas indican que este nanomaterial, tal como sucede con los otros SAS, no es capaz de inducir incrementos en los niveles de daño en el DNA de la línea 16HBE. Esto sucede en ambos tiempos de tratamiento y en todas las dosis utilizadas en este experimento (figura 47). La ausencia de efecto se observa tanto en la versión estándar del cometa como en la versión modificada con la enzima FPG. La inducción de daño en el control positivo indica que el ensayo se ha realizado correctamente y, en consecuencia, el

compuesto NM203 no ha sido capaz de inducir alteraciones que generen daño en el DNA.

4.2.3.5. Consideraciones generales

Cuando observamos el conjunto de resultados obtenidos con los compuestos SAS y la línea celular 16HBE se puede observar que los efectos citotóxicos, en contraposición a lo observado con los nanotubos de carbono para las dos líneas utilizadas, son bastante parecidos para los 4 nanomateriales ensayados (NM200, NM201, NM202 y NM203), con incrementos de la citotoxicidad que muestran una clara relación dosis-respuesta.

Por lo que se refiere a los efectos genotóxicos, tan sólo con el NM200, en el tratamiento de 3 horas, parece existir una tendencia a incrementar los niveles de daño genotóxico aunque en ninguna de las concentraciones este incremento llegó a ser estadísticamente significativo, efecto no observable tras el tratamiento de 24 horas. Con los otros SAS no se ha detectado ningún incremento en ningún tiempo de tratamiento o versión del ensayo. Por lo tanto, según los resultados obtenidos en nuestros experimentos, los compuestos SAS no presentan efectos genotóxicos detectables mediante el ensayo del cometa en la línea celular 16HBE. En este caso, hay que señalar que los agregados de SAS precipitan en el medio y sedimentan a las pocas horas del tratamiento, siendo posible observar este fenómeno ya tras tres horas de tratamiento.

4.3. ROUND ROBIN TEST

Como ya se ha comentado, en el estudio de intercalibración se decidió elegir un nanomaterial de cada uno de los tipos investigados (TiO_2 , NM102; SAS, NM203; nanotubos de carbono, NM403), que fueron aquellos que presentaron mejores indicios de poseer cierto riesgo genotóxico en el estudio preliminar. Aunque es un tema bajo discusión el tipo de control positivo que debe utilizarse cuando se trabaja con nanomateriales, se decidió estudiar el óxido de zinc (ZnO, NM110) como potencial control positivo, ya que algunos grupos habían desarrollado investigaciones que apuntaban a un posible efecto genotóxico de este compuesto.

La línea celular asignada a nuestro grupo fue la BEAS-2B. Por lo que se refiere a las dosis usadas, se decidió utilizar 64, 128 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para NM102 y

NM403, mientras que para NM203 se usaron dosis algo más bajas (8, 32 y 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) debido a la toxicidad observada en los estudios anteriores. Para NM110 se usaron dosis de 2,5 de 4,5 y de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya que éste presenta una alta citotoxicidad en la línea BEAS-2B. Tal como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos, los controles utilizados han sido comunes para todos los nanomateriales.

4.3.1. Resultados obtenidos con el compuesto de dióxido de titanio (NM102)

Los resultados obtenidos al medir la capacidad del nanomaterial de TiO_2 (NM102) de producir daño primario en el DNA se puede observar en la figura 48A. Como se indica, se han evaluado los porcentajes de DNA en la cola después de tratar las células durante 24 horas con tres concentraciones distintas. Los resultados indican que, aunque se observan algunos incrementos significativos éstos no siguen una clara relación dosis-efecto, que es un claro indicador de efecto genotóxico, aunque hay que tener en cuenta que al utilizar sólo tres concentraciones del nanomaterial siendo la más baja la de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, puede haberse pasado por alto una relación dosis-efecto en concentraciones más bajas. Sorprendentemente, la concentración de 0,5 mM de EMS que se convino utilizar como control positivo, no produjo claros incrementos en los niveles de daño genético, a diferencia de lo que sucedía en el ensayo preliminar, donde utilizamos el peróxido de hidrógeno.

Por lo que se refiere al estudio de la capacidad de NM102 de producir daño cromosómico, los resultados se indican en la figura 48B. En el ensayo de micronúcleos solamente se pudieron analizar dos concentraciones, debido a que la más elevada presentaba una gran internalización del NM102, impidiendo la correcta discriminación de los micronúcleos respecto al nanomaterial, ya que éste presenta también emisión de fluorescencia. Este es un problema específico al que nos encontramos cuando trabajamos con nanomateriales, aspecto que no sucede nunca con los compuestos que se usan como diluciones. Así, no tan sólo la toxicidad celular es un factor limitante si no que el exceso de nanomaterial intracelular o extracelular (si éste se encuentra firmemente adherido a la superficie de las células), puede hacer poco eficiente el recuento, dada la interferencia con la visualización de las masas de

cromatina de los micronúcleos. Los resultados obtenidos con las dosis más bajas (64 y 128 $\mu\text{g/mL}$) no muestran indicios de producir incrementos en la frecuencia basal de micronúcleos. En este caso, el control positivo utilizado (150 ng/mL de mitomicina-C) ha mostrado inducir una elevada frecuencia de micronúcleos, llegando a obtenerse una frecuencia de 227 células con micronúcleos por cada 1000 células binucleadas.

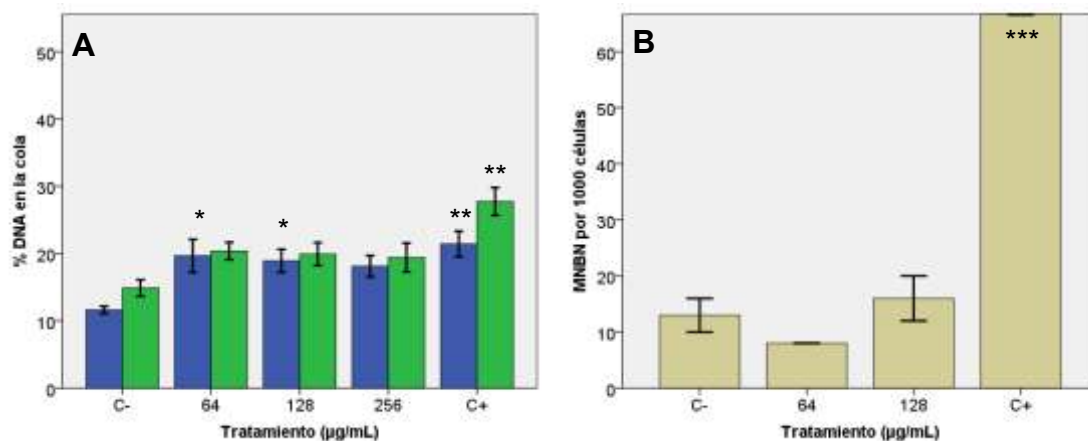


Figura 48: Resultados del ensayo del cometa (A) y del ensayo de micronúcleos (B) en la línea BEAS-2B tratada con el NM102 (TiO_2). C- corresponde al tratamiento con el vehículo y C+ corresponde al control positivo (0,5 mM EMS para el ensayo del cometa y 150 ng/mL de mitomicina-C para el ensayo de micronúcleos). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

En resumen, de los resultados obtenidos se concluye que el NM102 es un nanomaterial que no induce roturas cromosómicas, aunque existen sospechas fundadas sobre su potencial de generar daño primario en el DNA en la línea celular BEAS-2B, en las condiciones experimentales de este estudio.

4.3.2. Resultados obtenidos con el compuesto de sílice (NM203)

Cuando se ha valorado la capacidad del SiO_2 (NM203) de producir daño primario en el DNA, se han obtenido los resultados indicados en la figura 49A. Como se observa, aunque parece existir una relación dosis-efecto en los resultados obtenidos en el ensayo del cometa, ya que se observa una inducción de daño en el DNA en la concentración más alta, ésta no llega a ser estadísticamente significativa, aunque está cerca del borde de la significación, tanto para el daño basal como para el daño oxidativo inducido. Debido a la utilización de un control positivo común para todo el experimento, existe la

misma situación que con el nanomaterial anterior, donde el control positivo indujo sólo un ligero incremento del daño oxidativo.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos en el ensayo de micronúcleos, indicados en la figura 49B, se observa que la concentración intermedia induce un incremento significativo de la frecuencia de micronúcleos, aunque hay que remarcar que el error estándar es muy grande.

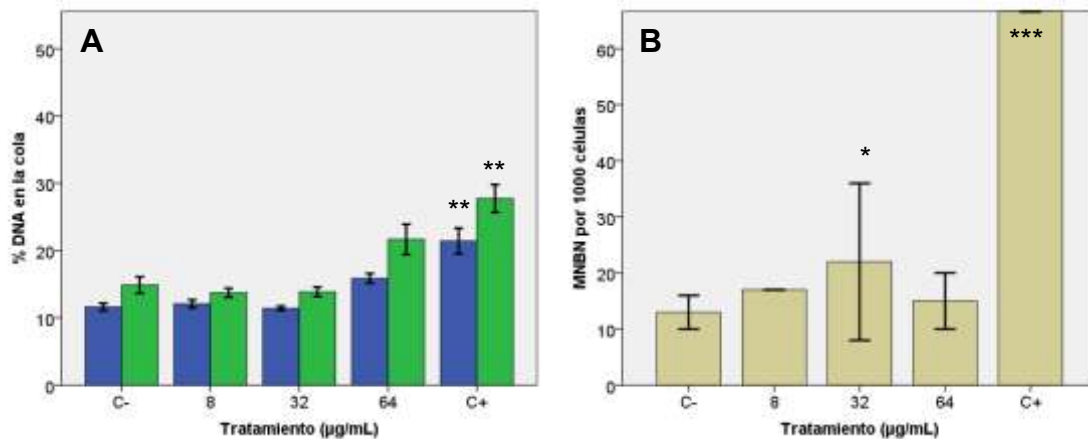


Figura 49: Resultados del ensayo del cometa (A) y del ensayo de micronúcleos (B) en la línea BEAS-2B tratada con el NM203 (SAS). C- corresponde al tratamiento con el vehículo y C+ corresponde al control positivo (0,5 mM EMS para el ensayo del cometa y 150 ng/mL de mitomicina-C para el ensayo de micronúcleos). * P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001.

Esto es debido a que el test estadístico usado (F de Fisher en una tabla de contingencia 2x2) no tiene en cuenta la variabilidad entre las réplicas, ya que en este test se unen y se analizan las réplicas como un total. En este caso en una de las réplicas la inducción de micronúcleos fue muy elevada mientras que en la otra no se observó dicha inducción. Además, no existe una respuesta dosis-efecto ya que la concentración más elevada no induce incrementos en la frecuencia de micronúcleos. Debido a estos dos factores, y pese a que el resultado es estadísticamente significativo por un estrecho margen, se ha considerado como un resultado ambiguo debido a la ausencia de relevancia biológica del mismo.

En conclusión, basándonos en los resultados obtenidos, podríamos decir que el compuesto de SAS NM203 no induce daño en el DNA ni induce roturas cromosómicas en las condiciones experimentales de este estudio, aunque muestra una cierta tendencia a incrementar los niveles basales.

4.3.3. Resultados obtenidos con los nanotubos de carbono (NM403)

Cuando se evalúa el potencial del nanotubo de carbono (NM403) de inducir daño en el DNA figura (50A), se puede observar que ninguna de las tres concentraciones utilizadas ha sido capaz de producir daño primario o daño oxidativo en el DNA de las células de la línea celular BEAS-2B. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en el nuestro laboratorio en la fase preliminar, donde también se realizó el ensayo del cometa para este compuesto y ninguna de las concentraciones utilizadas incrementó el daño en el DNA respecto al control negativo. Al ser el control positivo común para todo el experimento, la inducción de daño oxidativo de éste en nuestro experimento es débil.

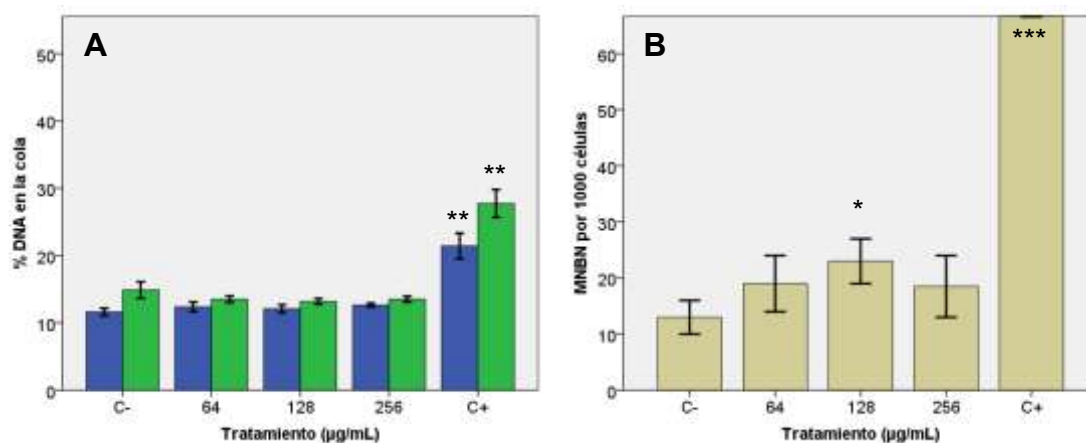


Figura 50: Resultados del ensayo del cometa (A) y del ensayo de micronúcleos (B) en la línea BEAS-2B tratada con el NM403 (CNT). C- corresponde al tratamiento con el vehículo y C+ corresponde al control positivo (0,5 mM EMS para el ensayo del cometa y 150 ng/mL de mitomicina-C para el ensayo de micronúcleos). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Como se puede observar en la figura 50B, el compuesto NM403 ha sido capaz de inducir un incremento estadísticamente significativo de la frecuencia de micronúcleos en la concentración intermedia (128 µg/mL). Como sucedía con el compuesto anterior (NM203), sólo una concentración induce un incremento significativo aunque en este caso hay concordancia entre las dos réplicas analizadas. Así, no observamos una relación dosis-respuesta en el efecto del compuesto analizado en su capacidad de la inducir micronúcleos.

En resumen, de los resultados obtenidos se concluye que el compuesto NM403 es un nanomaterial que carece de potencial genotóxico sobre la línea celular BEAS-2B en las condiciones de nuestro estudio.

4.3.4. Resultados obtenidos con el compuesto de óxido de zinc (NM110)

Los resultados del experimento del cometa con el compuesto NM110 en la línea celular BEAS-2B, se indican en la figura 51A. Como se observa, ninguna de las concentraciones utilizadas ha sido capaz de inducir incrementos significativos del daño en el DNA, ya sea daño primario o daño oxidativo. Como en los casos anteriores, el control positivo únicamente ha sido capaz de inducir incrementos débiles en los niveles de daño oxidativo.

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos en el ensayo de micronúcleos indicados en la figura 51B, se observan incrementos significativos en las dos concentraciones más altas utilizadas, induciendo en ambas una frecuencia de micronúcleos similar. En este caso, existe una relación dosis-respuesta que podría estar basada en un efecto umbral.

En conclusión, aunque el compuesto NM110 no es capaz de inducir daño primario en el DNA de las células BEAS-2B, sí que es capaz de generar alteraciones cromosómicas en las condiciones experimentales de nuestro ensayo.

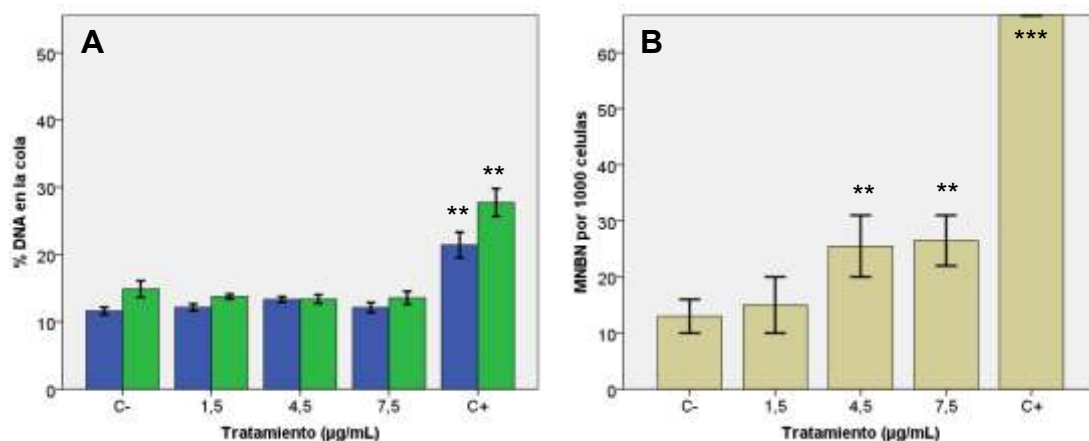


Figura 51: Resultados del ensayo del cometa (A) y del ensayo de micronúcleos (B) en la línea celular BEAS-2B tratada con el NM110 (ZnO). C- corresponde al tratamiento con el vehículo y C+ corresponde al control positivo (0,5 mM EMS para el ensayo del cometa y 150 ng/mL de mitomicina-C para el ensayo de micronúcleos). ** P<0,01; ***P<0,001.

4.3.5. Resultado global del *Round Robin test*

Los resultados globales obtenidos por todos los grupos participantes en el proyecto Nanogenotox obtenidos en el *Round Robin test* (tabla 9) muestran que en muchos de los ensayos no existe una tendencia clara en los resultados obtenidos para un ensayo y una línea celular determinada. Sólo se encuentra una total coincidencia en los resultados obtenidos para el NM110 en el ensayo de micronúcleos en la línea celular Caco-2. Otros resultados también muestran una alta coincidencia entre los distintos laboratorios, como por ejemplo los resultados positivos obtenidos con el NM102 en el ensayo del cometa en la línea celular BEAS-2B (5 de 6) y los resultados negativos obtenidos con el NM403 en el ensayo del cometa en la línea celular Caco-2. Los demás resultados no muestran una tendencia clara, no obteniendo en el cómputo global una mayoría de resultados positivos sobre los resultados negativos o viceversa. La falta de concordancia en muchos casos podría deberse a una baja potencialidad genotóxica. Cuando la inducción está cerca del umbral de la significación es fácil obtener resultados positivos o negativos, tan solo por azar.

Tabla 9: Resumen de los resultados obtenidos por los distintos laboratorios (A-L) en el *Round Robin test*. +: positivo; (+): ambiguo; -: negativo; gris: no realizado; ANP: el análisis no se ha podido realizar.

| Laboratorio | NM102 (TiO ₂) | | NM203 (SAS) | | NM403 (CNT) | | NM110 (ZnO) | |
|------------------------------|---------------------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|
| | Cometa | CBMN | Cometa | CBMN | Cometa | CBMN | Cometa | CBMN |
| Línea celular Caco-2 | | | | | | | | |
| A | - | - | - | + | - | + | - | + |
| B | + | ANP | + | + | + | + | + | + |
| C | - | + | - | - | - | + | - | + |
| D | - | - | + | - | - | - | - | + |
| E | | ANP | | - | | - | | + |
| F | + | ANP | - | + | - | (+) | + | + |
| Línea celular BEAS-2B | | | | | | | | |
| G | + | + | - | + | + | + | + | + |
| H | - | - | + | - | - | - | + | + |
| I | + | (+) | + | + | + | - | + | - |
| J | + | - | - | (+) | - | + | - | + |
| K | + | - | - | + | - | + | - | - |
| L | + | - | - | - | + | - | + | - |

4.4. EXPERIMENTOS CON TRATAMIENTOS CRÓNICOS

En términos de riesgo, se deben buscar aquellas situaciones de exposición que se asemejan a las “~~at~~urales”; es decir a aquellas a las que la población en general está expuesta. En este contexto, consideramos que exposiciones prolongadas, con dosis algo más bajas, es una situación más realista que la que sucede en los estudios con exposiciones agudas. Así, como complemento de la actividad desarrollada en el proyecto Nanogenotox, hemos llevado a cabo estudios crónicos (3 semanas, más 1 semana extra para el *soft-agar test*) con dos nanomateriales (NM102 y NM403 utilizando la línea celular BEAS-2B.

Las concentraciones utilizadas para cada uno de ellos han sido las de 1, 10 y 20 µg/mL. Los efectos inducidos se han medido a lo largo del tiempo. En particular hemos evaluado los efectos al inicio del experimento (T0), a la semana del inicio (T1) y a las tres semanas de tratamiento (T2). Los resultados obtenidos los presentamos en función del nanomaterial utilizado.

4.4.1. Resultados con el dióxido de titanio (NM102)

4.4.1.1. Estudios de internalización con NM102 mediante TEM

Lo primero que se ha hecho ha sido visualizar la interacción del material utilizado (NM102) con las células BEAS-2B para determinar su posible internalización y ver si ésta variaba a lo largo del periodo de exposición crónica. La observación directa de la interacción entre los nanomateriales con las células se ha llevado a cabo mediante TEM. Así, ha sido posible realizar una valoración cualitativa de las capacidades de este material para ser internalizado, o para interactuar con la membrana celular. Hay que señalar que algunas de las muestras presentan aspecto deteriorado debido a la naturaleza misma de los nanomateriales, ya que su dureza, así como su tendencia a formar agregados dificulta lograr cortes en buen estado. Además, pueden llegar a dañar la cuchilla que se usa para realizar los cortes ultrafinos de la resina.

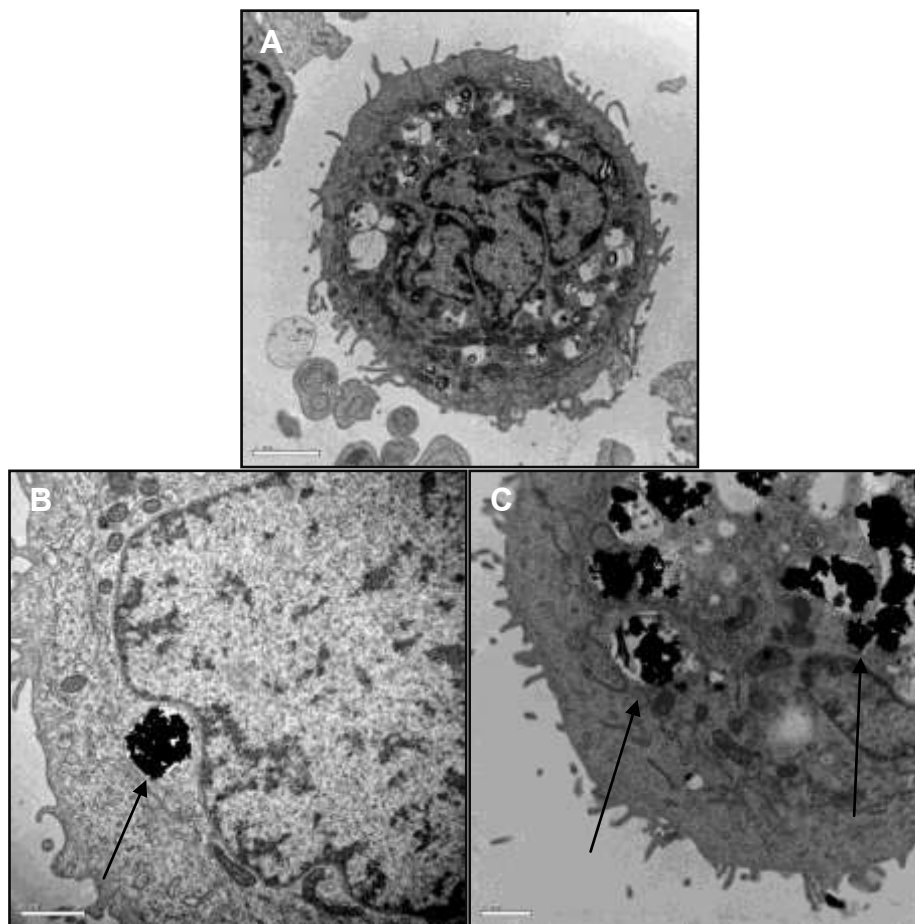


Figura 52: Imágenes obtenidas mediante TEM del tratamiento crónico con el compuesto NM102 en el inicio del mismo. La imagen A corresponde al control negativo (8000x, y barra de escala 2 μm) mientras que la imagen B corresponde al tratamiento de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (15000x, barra de escala de 1 μm) y de la imagen C corresponde al tratamiento de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (12000x, y barra de escala 2 μm).

Los resultados obtenidos al principio del experimento están reflejados en la figura 52. Como se observa, el nanomaterial es fácilmente identificable debido a que en las imágenes observadas éstos están en forma de agregados y, además, el aspecto de éstos es muy oscuro debido a que son muy electrodensos. Hay que indicar que a la concentración más baja (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) prácticamente no se han encontrado agregados internalizados o interaccionando con la membrana; en cambio, sí que se ha podido observar que la cantidad de agregados internalizados a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es significativamente mayor.

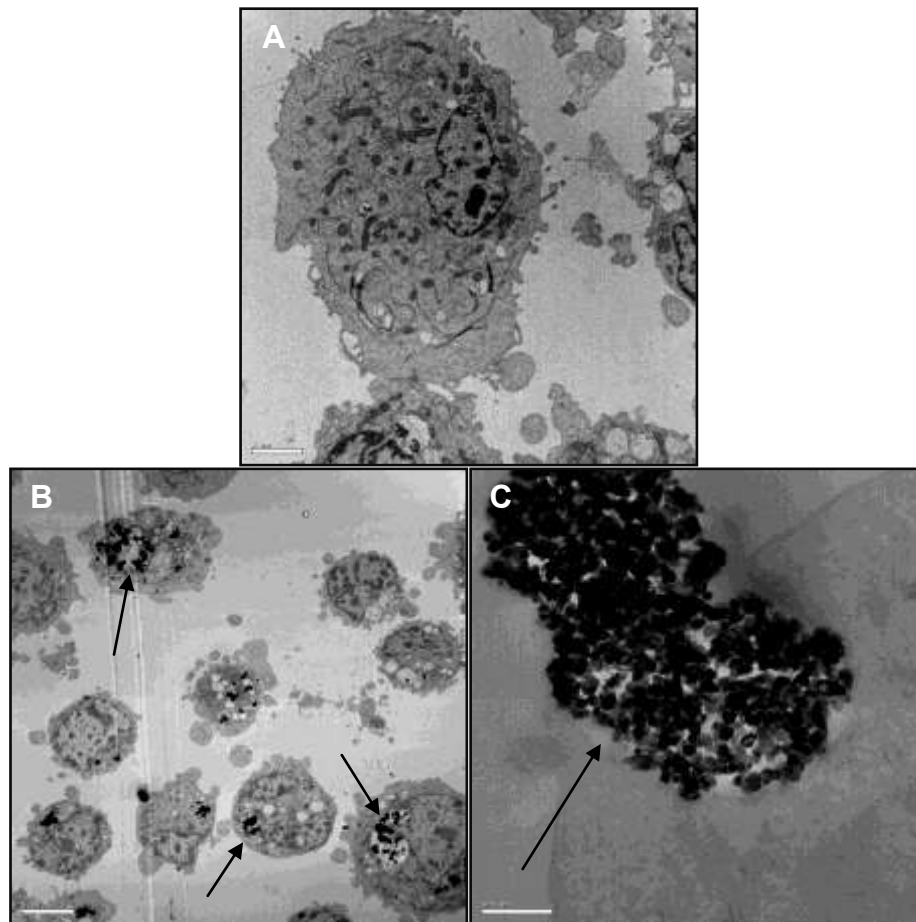


Figura 53: Imágenes obtenidas mediante TEM del tratamiento crónico con NM102 después de la primera semana. La imagen A, aumentada 6000x, cuya barra de escala mide 2 μm , corresponde al control negativo. Las imágenes B (2500x y barra de escala de 5 μm) y C (80000x y barra de escala de 200 nm) corresponden al tratamiento con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NM102.

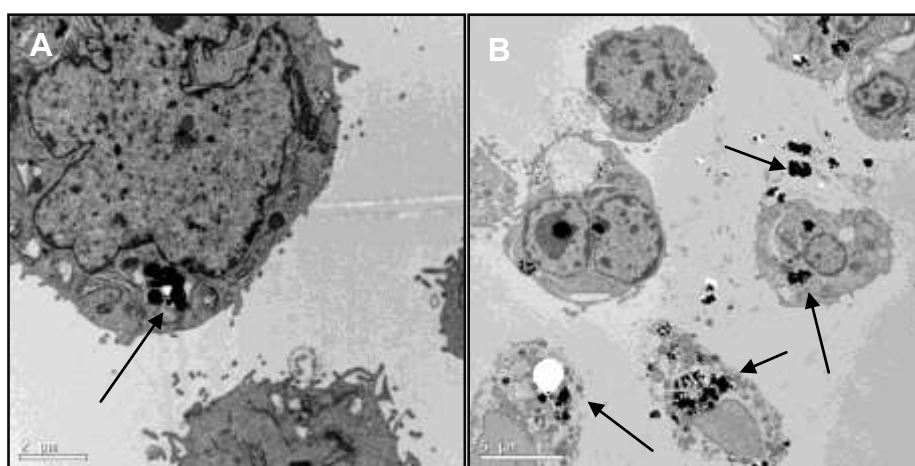


Figura 54: Imágenes obtenidas mediante TEM del tratamiento crónico con NM102 después de 3 semanas de tratamiento. La imagen A corresponde al tratamiento de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del tratamiento con NM102 (8000x y barra de escala de 2 μm). La imagen B corresponde al tratamiento de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del NM102 (4000x y barra de escala de 5 μm).

Se han hecho mediciones a lo largo de tiempo para valorar si la internalización varía con éste. Así, en la figura 53 se observan células tras una semana de tratamiento (T1) se puede observar en la imagen B un plano con varias células tratadas con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NM102 donde se visualiza una gran cantidad de nanomaterial internalizado. En la imagen C se puede observar una célula en pleno proceso de endocitosis de uno de estos agregados del NM102 y se pueden diferenciar sin problemas las partículas primarias que forman parte de este agregado.

Por último, en las células tratadas a lo largo de tres semanas (T2, figura 54), se ha podido observar que hay un incremento de la frecuencia de interacciones de NM102 con las células. Esto se observa en las imágenes A y B, donde se refleja la internalización del NM102. Respecto a las células muestreadas al inicio del tratamiento y tras una semana, en la semana tres se observa que en la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya existe una bioacumulación de agregados en los endosomas, estructuras que se encuentran con mayor abundancia. A partir de lo anterior, a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no parecen apreciarse incrementos mayores que los observados en otros tiempos.

4.4.1.2. Medición de la internalización mediante FACS

Además de utilizar TEM para visualizar la internalización de los nanomateriales, también se puede usar la citometría de flujo para medir la “complejidad” celular, fenómeno que se asocia con los procesos de internalización. En este caso se realizó este análisis en dos tiempos de tratamiento, a las 24 horas (T0) y a la semana de tratamiento (T1). Así, en imágenes como las indicadas en la figura 55A, se indica que las señales fluorescentes situadas sobre el eje horizontal indican los niveles de complejidad celular, como medida de internalización. Así en la figura 55B se puede observar que la concentración más elevada de NM102 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) genera elevados niveles de internalización, ya tras 24 horas de exposición, lo que estaría de acuerdo con lo observado utilizando TEM. Lo que sucede en las células tratadas durante una semana se puede observar en la figura 55C, donde se ve que el comportamiento del NM102 sigue siendo similar. La cuantificación de la internalización se observa en la figura 56, donde se observa que la inducción significativa depende tanto de la dosis aplicada como del tiempo de exposición.

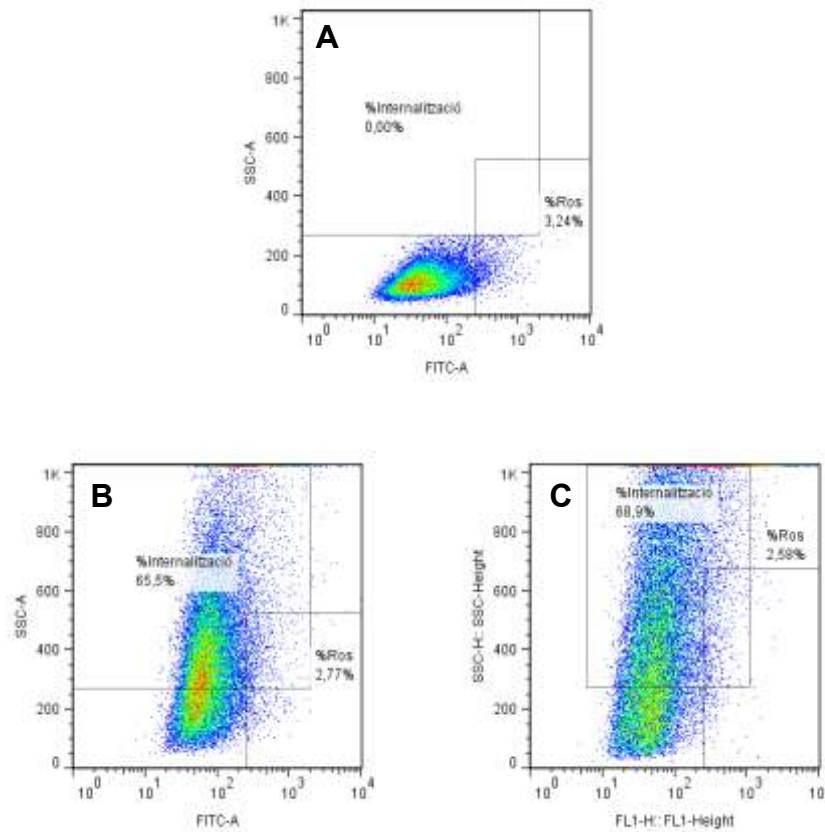


Figura 55: Figuras del FACS correspondientes a células BEAS-2B no expuestas (A), o después de 24 horas de tratamiento (B) o tras una semana de tratamiento (C) con 20 µg/mL de NM102.

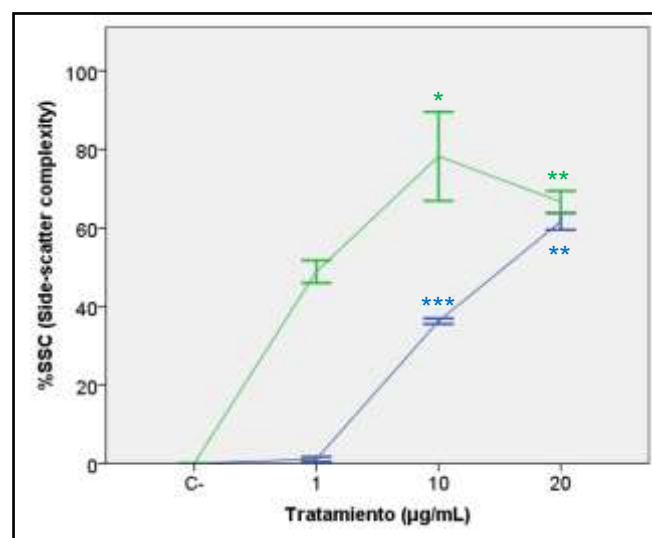


Figura 56: Incremento del porcentaje de internalización. En azul, resultados para T0. En verde, resultados para T1. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

4.4.1.3. Determinación de la producción de ROS endógenas

El citómetro de flujo es también una buena herramienta para determinar si el nanomaterial, de manera directa o indirecta, es capaz de generar estrés oxidativo endógeno. Esto se valora fácilmente utilizando el DCFH-DA, que cuando se oxida emite fluorescencia. La visualización de esta respuesta se observa en la figura 57 donde se indican las señales emitidas por cada célula sin tratar (A) y tratada con 1 mM de H₂O₂ durante 15 minutos. El eje X del gráfico indica la cantidad de DCFH-DA oxidado a DCF en el interior de cada célula; por lo tanto, una mayor intensidad de fluorescencia en éstas se mide como una invasión (hacia la derecha del eje vertical), existiendo una relación directa entre el porcentaje de señal en este sector y la inducción endógena de ROS. En nuestro caso se observa cómo, tras el tratamiento con H₂O₂, las células presentan una mayor proporción de fluorescencia emitida por el DCF, indicando la presencia de ROS intracelular.

Por lo que respecta a la capacidad del compuesto NM102 de inducir ROS, los resultados obtenidos se indican en la figura 56. Como se observa, el NM102 en su forma nanoparticulada no induce niveles elevados de ROS a pesar del alto nivel de internalización observado.

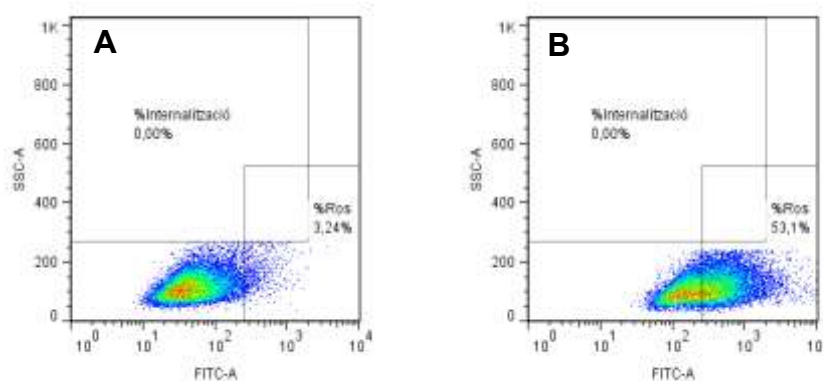


Figura 57: Figura del FACS correspondientes a células BEAS-2B no expuestas (A), o después de 15 minutos de tratamiento con 1 mM H₂O₂.

4.4.1.4. Resultados con el ensayo del cometa

El compuesto NM102 se ha evaluado al inicio del estudio (T0, 24 horas de tratamiento), así como a la semana (T1) y a las tres semanas de tratamiento

crónico (T2). Los resultados obtenidos se indican en la figura 58. Como se ve, al inicio del experimento (A) no se observa que ninguna de las concentraciones utilizadas (1, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sea capaz de inducir incrementos en el porcentaje del DNA en la cola. Además, el mantenimiento de las células expuestas durante una semana (B) o tres semanas (C) no parece generar incrementos significativos de daño basal en el DNA. Hay que remarcar que a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tras las tres semanas de tratamiento, no se pudo realizar el conteo debido a la ausencia de muestra durante el proceso del ensayo del cometa.

Cuando el ensayo del cometa se complementa con el uso de la enzima FPG, tampoco se pudieron observar incrementos en los niveles de daño oxidativo, aunque en los tiempos T1 y T2 se observan incrementos que no llegan a ser estadísticamente significativos. Esta falta de efecto de alguna manera estaría de acuerdo con la respuesta negativa encontrada en los tratamientos agudos. Los controles positivos (0,5 mM EMS) muestran efectos, tanto a nivel basal como de daño oxidativo, confirmando los valores negativos observados tras los tratamientos crónicos con NM102.

4.4.1.5. Resultados con el ensayo de micronúcleos

La capacidad de producir alteraciones cromosómicas, ya sean del tipo estructural o numérico, por la exposición prolongada a NM102 se ha evaluado utilizando el ensayo de micronúcleos con el uso de citocalasina-B. Con las células iniciales se trataron los cultivos durante 48 horas añadiendo citocalasina a las 6 horas. Con las células expuestas durante una o tres semanas, se cultivaron 5×10^5 células durante 24 horas en placas de 6 pocillos y después se replicó el tratamiento al que estaban sometidas durante 48 horas, añadiendo citocalasina-B a las 6 horas.

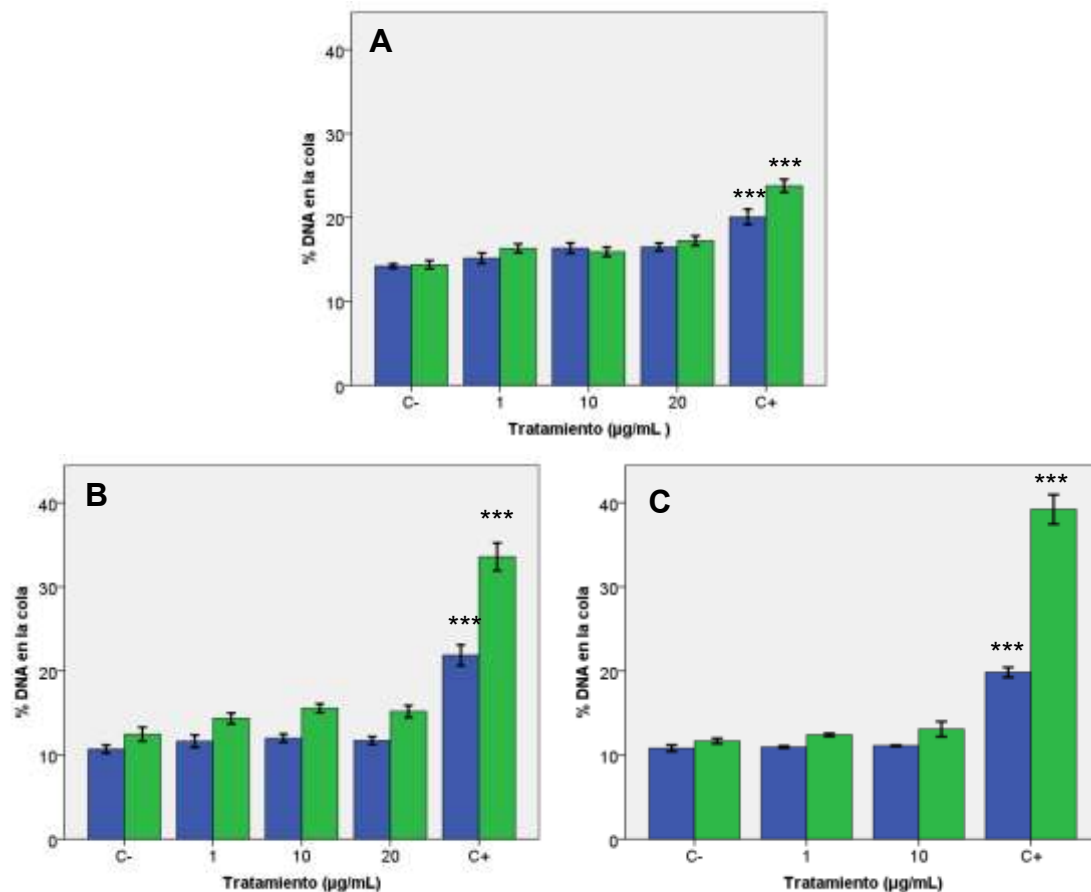


Figura 58: Resultados obtenidos en el ensayo del cometa a las 24 horas (A), tras una semana (B) y tres semanas (C) de tratamiento con concentraciones de 1, 10 y 20 µg/mL de NM102. Las barras azules corresponden al ensayo estándar del cometa y las barras verdes al ensayo modificado con la enzima FPG. *** P<0,001.

Los resultados obtenidos se indican en la figura 59, donde se presentan las frecuencias de micronúcleos tras los distintos tiempos de exposición. Como se puede observar, en ninguno de los casos se han podido inducir incrementos significativos en la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos, que ha sido el parámetro utilizado para medir los efectos clastogénicos/aneugénicos de NM102. A pesar de los resultados negativos, los efectos inducidos por el control positivo (150 ng/mL de mitomicina-C) son claramente positivos, ratificando que, bajo las condiciones de exposición utilizadas, el compuesto NM102 no induce efectos en el ensayo de micronúcleos.

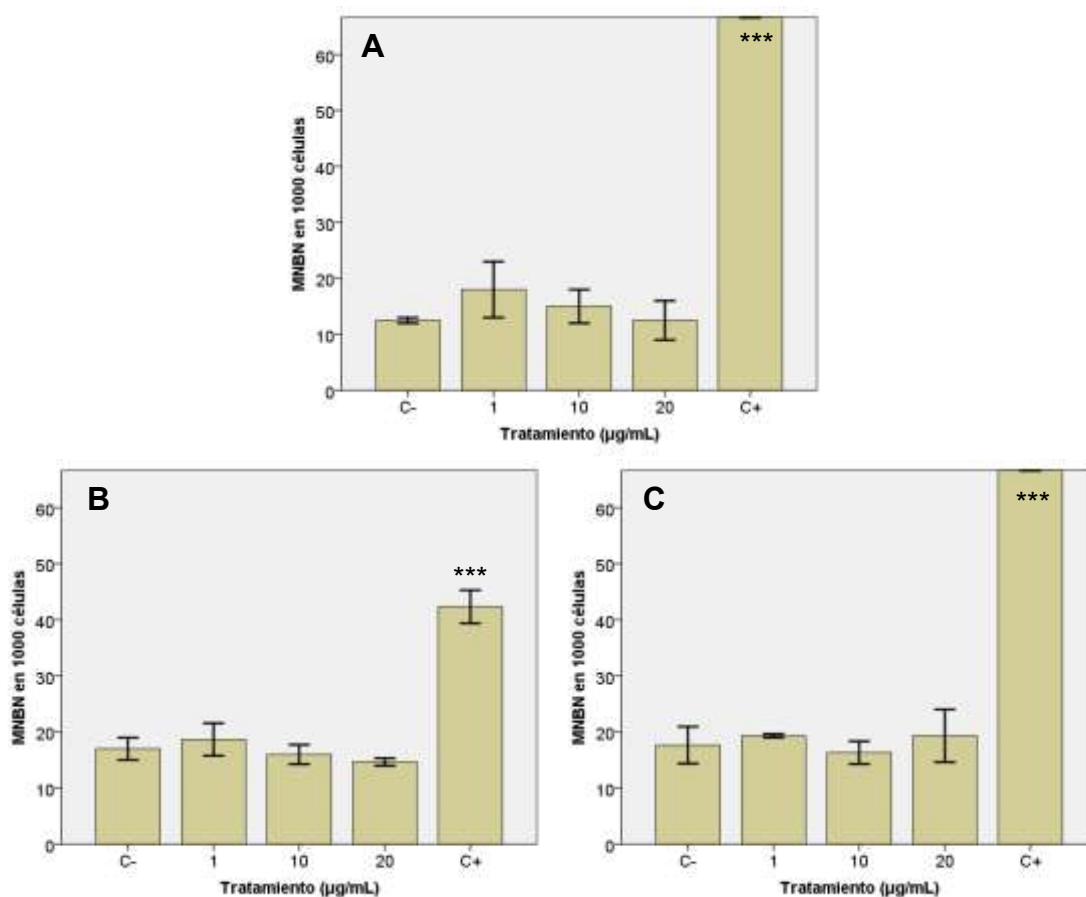


Figura 59: Resultados obtenidos en el ensayo de micronúcleos a las 48 horas (A), y tras una semana (B) y tres semanas (C) de tratamiento con las concentraciones de 1, 10 y 20 µg/mL de NM102. El control positivo corresponde a una concentración de 150 ng/mL de mitomicina-C. *** P<0,001.

4.4.1.6. Expresión de la hemooxigenasa-1 mediante Western blot

La detección de los niveles de proteína expresados por las células BEAS-2B se midieron mediante Western blot. El nivel de expresión de la proteína hemooxigenasa-1 se midió a las 3 semanas (T2) de tratamiento con el objetivo de medir la respuesta frente al estrés, principalmente estrés oxidativo. Los cambios en el nivel de expresión se indican en la figura 60. Por lo que se refiere a la capacidad del compuesto NM102 para inducir un incremento de la expresión de la hemooxigenasa-1 ésta cuantificación se indica en la figura 61. Como se observa, ninguna de las concentraciones utilizadas (1, 10 y 20 µg/mL) ha sido capaz de inducir incrementos de la expresión de esta proteína. Este hecho concuerda con la ausencia de daño oxidativo en el DNA, medido mediante el ensayo del cometa tras tres semanas de tratamiento con este

compuesto, ya que esta proteína aumenta su expresión frente al estrés oxidativo.

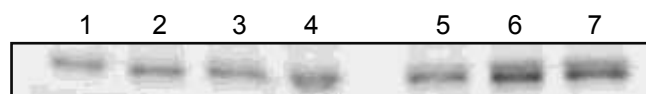


Figura 60: Expresión de hemoxygenasa-1. La banda (de 34 kilobases) corresponde específicamente a la hemoxygenasa-1. Carril 1- Control negativo; carril 2- NM102 1 $\mu\text{g/mL}$; carril 3 NM102 10 $\mu\text{g/mL}$; carril 4- NM102 20 $\mu\text{g/mL}$; carril 5- NM403 1 $\mu\text{g/mL}$; carril 6- NM403 10 $\mu\text{g/mL}$; carril 7- NM403 20 $\mu\text{g/mL}$.

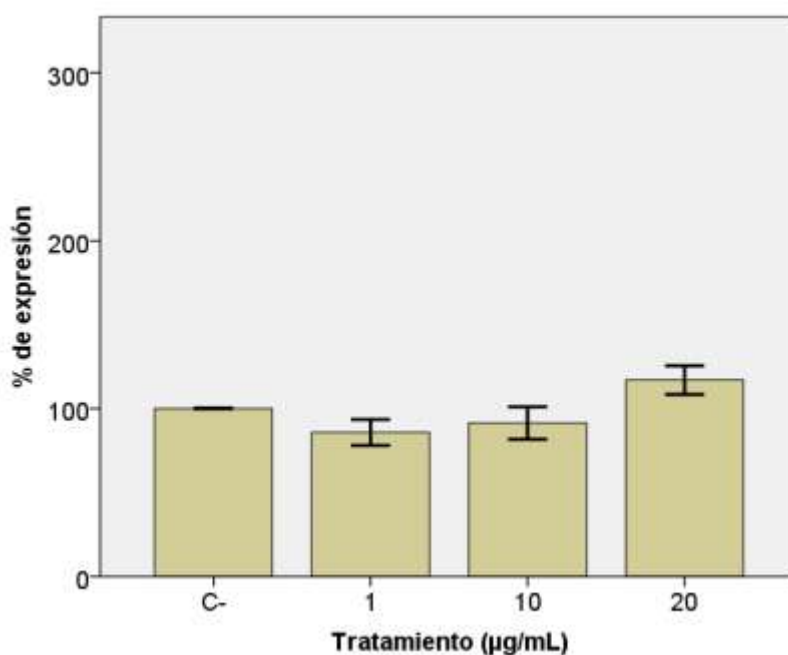


Figura 61: Expresión proteica relativa respecto el control de la hemoxygenasa-1 en las distintas concentraciones de NM102.

4.4.1.7. Expresión de factores proinflamatorios y de la hemoxygenasa-1 mediante RT-PCR

Los procesos crónicos de inflamación pueden estar ligados al incremento de daño genotóxico (de manera secundaria) así como un incremento del riesgo de procesos tumorales. Para relacionar la asociación entre exposición a NM102 y procesos inflamatorios, tras tres semanas de tratamiento con 1, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de NM102 se midió el nivel de expresión de mRNA de distintas interleucinas, ligadas a procesos de inflamación, así como de la hemoxygenasa-1.

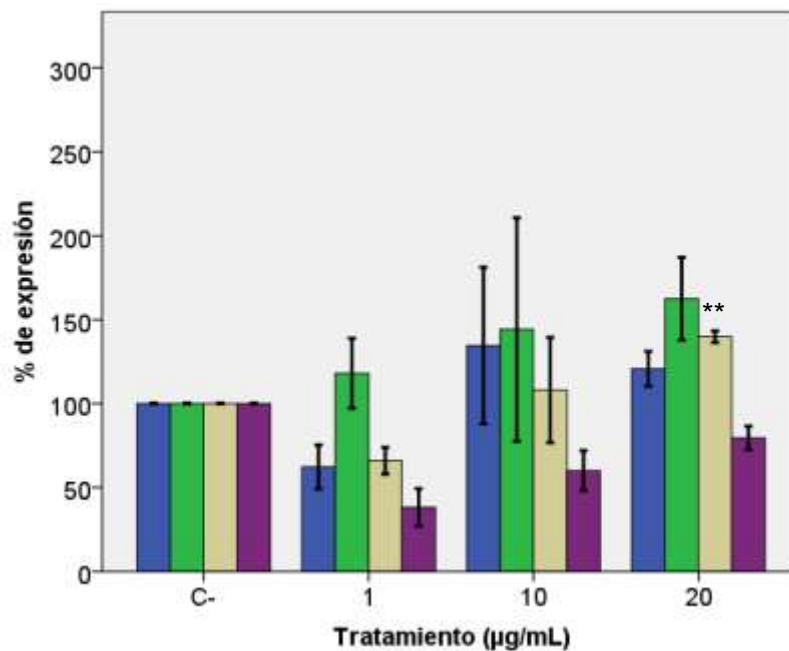


Figura 62: Cambios en la expresión a nivel de mRNA de IL-1 β , IL-6, IL-8 y hemoxygenasa-1 tras 3 semanas de tratamiento con distintas concentraciones de NM102. La barra azul corresponde a los niveles de expresión de IL-1 β . La barra verde corresponde a los niveles de expresión de IL-6. La barra marrón corresponde a los niveles de expresión de IL-8. La barra morada corresponde a los niveles de expresión de hemoxygenasa-1. ** P<0,01.

Los resultados obtenidos para el compuesto NM102 (figura 62) muestran una gran variabilidad en la expresión de los factores estudiados. En el caso de la IL-1 β los resultados indican que no hay cambios significativos en su nivel de expresión respecto al control, igual que sucede con la IL-6. En cambio, cuando observamos los resultados obtenidos con la IL-8, se observa un incremento significativo de su expresión, que es sobre el 150% respecto al control. Por lo que se refiere a la hemoxygenasa-1, el nivel de expresión es más bajo que en el control en todas las concentraciones, aunque en ninguna de manera significativa. En conclusión, los niveles de expresión detectados en los factores estudiados no se ven afectados, excepto un incremento de la expresión de la IL-8 en la concentración de 20 µg/mL.

4.4.1.8. Resultados obtenidos en el *soft-agar* assay con NM102

La finalidad de este ensayo es determinar si la exposición prolongada al compuesto de dióxido de titanio (NM102) es capaz de generar procesos de crecimiento, sin necesidad de estar asociado a una superficie. Por tanto, la capacidad de crecer en suspensión en un medio semilíquido de agar, es una

clara indicación de que nuestra línea celular está sufriendo un proceso de desdiferenciación y transformación, tendiendo a adoptar comportamientos equivalentes a los que presentan las células tumorales.

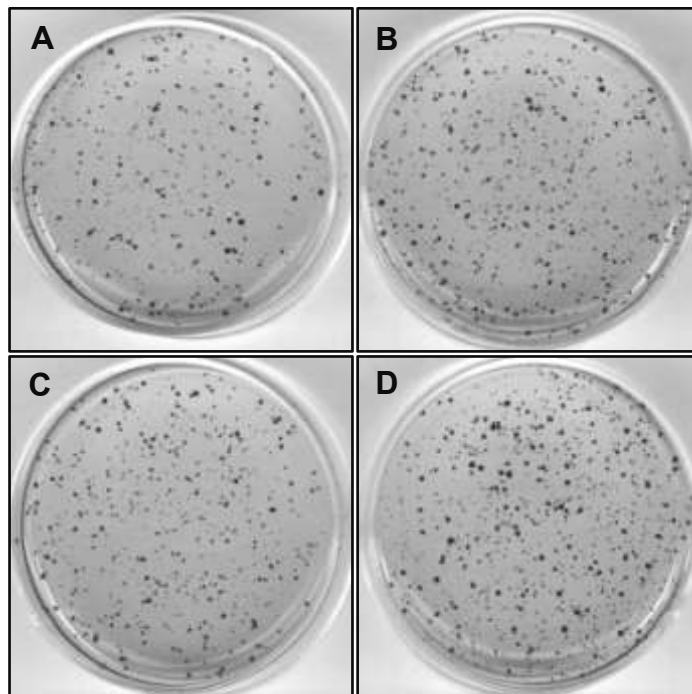


Figura 63: Fotografías de placas de 35 mm usadas en el *soft-agar assay* para los tratamientos con el NM102 (TiO₂). A, C- ; B 1 µg/mL; C, 10 µg/mL; D, 20 µg/mL.

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo del *soft-agar* se indican en la figura 63. Estos resultados son los obtenidos con células tratadas durante 4 semanas con las concentraciones de 1, 10 y 20 µg/mL. La primera cosa a destacar de estos resultados es la elevada frecuencia de colonias en el control negativo donde se han observado alrededor de 600 colonias en promedio de un total de 5000 células sembradas. Este alto nivel basal puede dificultar el correcto discernimiento del incremento del número de colonias en caso de que ésta sea leve. La cuantificación de los resultados observados se expresa en la figura 64, donde se observa que el incremento de colonias crece directamente con la dosis. Los valores observados en el control nos dan idea de la capacidad espontánea de la línea BEAS-2B de crecer en suspensión, esta capacidad varía mucho entre las distintas líneas celulares que suelen utilizarse en los estudios *in vitro*.

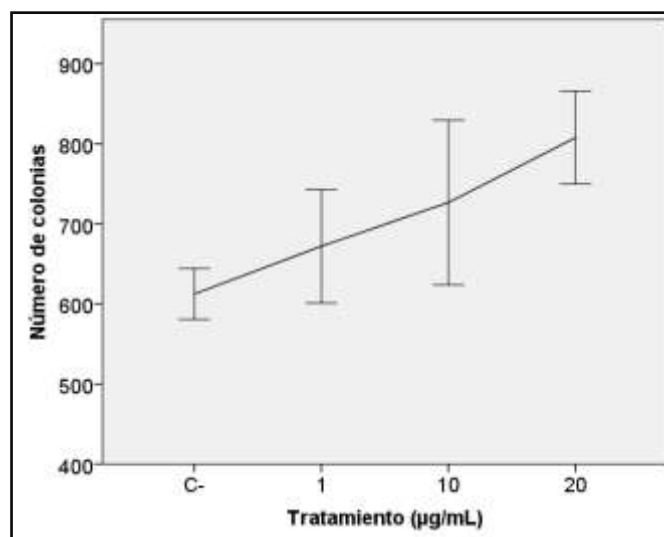


Figura 64: Colonias formadas en el ensayo del *soft-agar* después de 4 semanas de tratamiento para las distintas concentraciones de NM102.

4.4.1.9. Consideraciones generales

Los estudios realizados con el compuesto NM102 indican que, pese a ser internalizado por la célula, tal y como se observa mediante TEM y FACS, no es capaz de inducir ningún tipo de efecto genotóxico en la línea celular BEAS-2B, especialmente daño oxidativo, ya que los resultados obtenidos en el ensayo del cometa se ven sustentados por la ausencia de detección de ROS intracelular mediante FACS y por los niveles de expresión similar al control de la hemoxygenasa-1, tanto en su forma proteica (Western) como de mRNA (RT-PCR). Además, los resultados obtenidos por RT-PCR indican que este compuesto no induce cambios en los patrones de expresión de diferentes interleucinas, sugiriendo que la exposición al compuesto NM102 no está ligada a la inducción de procesos inflamatorios. Además, pese a que después de 4 semanas de tratamiento con este compuesto hay un incremento lineal del número de colonias que crecen en el *soft-agar*, éstos no son significativos, y aunque la concentración más alta (20 µg/mL) está cerca de serlo, este incremento no se ve acompañado por ningún otro efecto que pueda explicar este incremento. En resumen, este compuesto presenta ausencia de efecto en los experimentos llevados a cabo tras tratamientos crónicos aunque el nivel de internalización por parte de la línea celular BEAS-2B es significativo.

4.4.2. Resultados con nanotubos de carbono (NM403)

4.4.2.1. Estudios de internalización con NM403 mediante TEM

Tal y como se ha realizado para el NM102, lo primero que se ha hecho ha sido visualizar la interacción de NM403 con las células BEAS-2B para determinar si este tipo celular tiene el potencial de internalizar este compuesto; y, en caso afirmativo, ver si éste variaba a lo largo del periodo de exposición crónica.

Para ello se han analizado muestras de tres tiempos distintos (a las 24 horas, a la semana y a las tres semanas de exposición) mediante TEM, de cara a hacer una valoración cualitativa de la capacidad de este nanomaterial de interaccionar con las células. En este tipo de nanomaterial, los cortes de la resina pueden tener un aspecto peor que los obtenidos con el NM102 ya que el NM403 presenta una dureza mayor y, por lo tanto, dificulta más la obtención de los cortes y su calidad.

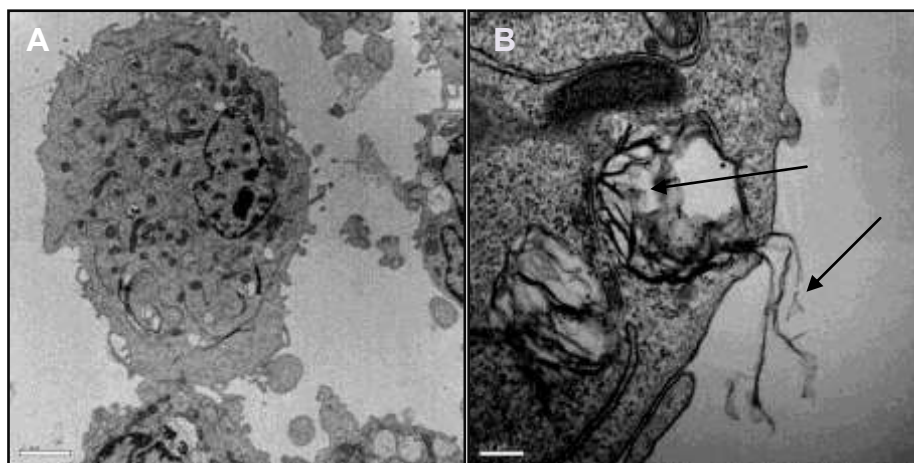


Figura 65: Imágenes obtenidas mediante TEM del T1 del tratamiento crónico con NM403. La imagen A, aumentada 6000x, cuya barra de escala mide 2 μm , corresponde al control negativo. La imagen B (50000x y barra de escala de 200 nm) corresponde al tratamiento con 20 $\mu\text{g/mL}$ de NM403.

En los resultados obtenidos en el tratamiento de 24 horas, no se pudo observar ninguna imagen en la que aparecieran estructuras similares a los nanotubos de carbono, pese a que su aspecto ya es conocido debido a su visualización previa en la fase de *screening*. Hay que tener en cuenta que las bajas dosis usadas (1, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$), y el hecho de que se toman imágenes de un plano concreto de las células, pueden ser factores que dificulten la observación de estos compuestos. Las imágenes obtenidas se indican en la figuras 65 y 66.

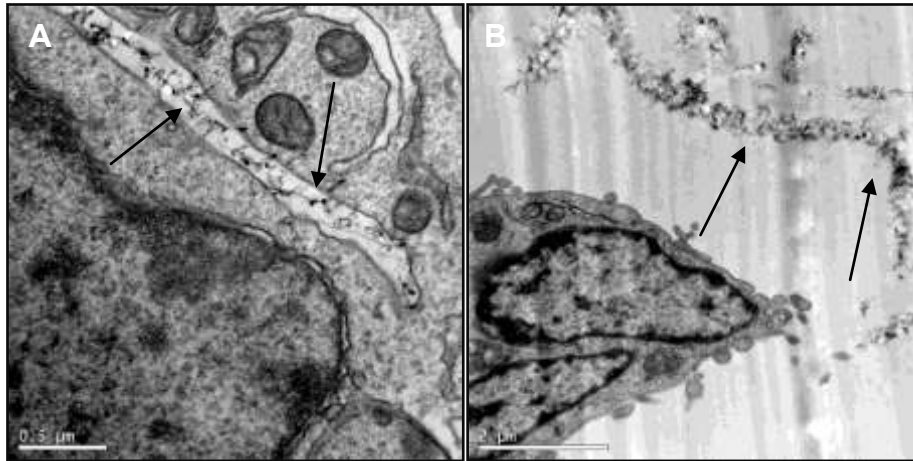


Figura 66: Imágenes obtenidas mediante TEM del T2 del tratamiento crónico. La imagen A, corresponde al tratamiento con 1 µg/mL del NM403 (40000x y barra de escala 500 nm) mientras que la imagen B corresponde al tratamiento con 20 µg/mL del mismo nanomaterial (15000x y barra de escala de 2 µm).

En cambio, tras una semana de tratamiento, se pueden visualizar estructuras que se asemejan a las observadas en la figura 21. En este caso, en la figura 65B, señalado por las flecha, se ven estructuras similares a nanotubos de carbono parcialmente internalizados. La parte externa parece haber sufrido algún efecto en su integridad estructural que bien podría ser causada por un proceso de sonicación como el que se aplica en el protocolo de dispersión utilizado. Aparte de esta imagen, no se observaron más estructuras parecidas a nanotubos de carbono interaccionando con las células BEAS-2B. A las tres semanas de tratamiento es posible observar una mayor interacción de NM403 con las células. En la imagen A de la figura 66 se observan unas estructuras alargadas electrodensas dentro de un endosoma que tienen el mismo aspecto que los elementos extracelulares observados en la imagen B de la misma figura, que corresponden a agregados de NM403. Así, podemos concluir que existe una internalización modesta de los nanotubos de carbono que aumenta con el tiempo de exposición.

4.4.2.2. Medición de la internalización mediante FACS

Para corroborar los resultados obtenidos mediante TEM, también se ha utilizado la citometría de flujo. Esto se basa en que la medición de la —complejidad— celular es un buen indicador de la internalización de material, ya

que a más material internalizado, más difracción del laser producirá. Como con NM102, se ha realizado este ensayo en dos tiempos de exposición, a las 24 horas (T0) y a la semana de tratamiento (T1) con NM403.

Los resultados obtenidos mediante FACS se indican en la figura 67 observándose que en ninguno de los tiempos de tratamiento las concentraciones de NM403 son internalizadas por las células de la línea BEAS-2B. Estos resultados entran en contradicción con los obtenidos mediante TEM, donde se ha observado internalización de este compuesto, aunque principalmente a las tres semanas de tratamiento. Esto sugiere que quizás se podrían empezar a internalizar más allá de la primera semana de exposición, aunque biológicamente no parece existir una razón que lo justifique. Otra explicación podría ser la baja cantidad internalizada así como la baja densidad de nanomaterial existente en los endosomas, lo que dificultaría que el láser sufriera refracción.

4.4.2.3. Determinación de la producción de ROS endógenas

Como ya se ha comentado, el citómetro también es una herramienta que nos permite determinar la cantidad de ROS generadas intracelularmente mediante la adición de DCFH-DA en el procesamiento de las muestras. En el caso del compuesto NM403 se puede observar en la figura 67 que es capaz de inducir una gran cantidad de ROS intracelulares ya a las 24 horas de tratamiento, incluso mayor que el observado con H₂O₂ (figura 57). A la semana de exposición los niveles no aumentan mucho ya que el nivel de daño generado ya casi satura la capacidad de detección del ensayo.

Cuando se cuantifica el porcentaje de ROS generado respecto al control (figura 68), se observa que en ambos tiempos de exposición las dos concentraciones más elevadas inducen incrementos significativos, aunque estos niveles son mayores tras una semana de exposición. Estos resultados entran en contradicción con los datos obtenidos en el cometa, donde no hay inducción de daño oxidativo. Además, la viabilidad celular tampoco se ve afectada a las 24 horas en la fase de *screening*, pese a que el nivel de oxidación intracelular es muy alto. Además este efecto observado a las 24 horas de exposición no concuerda con los datos obtenidos de internalización, donde no se detecta mediante FACS y no es observable a las 24 horas de tratamiento. Esto deja

como posibles explicaciones que, o bien el NM403 es capaz de inducir daño oxidativo intracelular mediante interacción con la membrana o bien es capaz de interactuar con el ensayo.

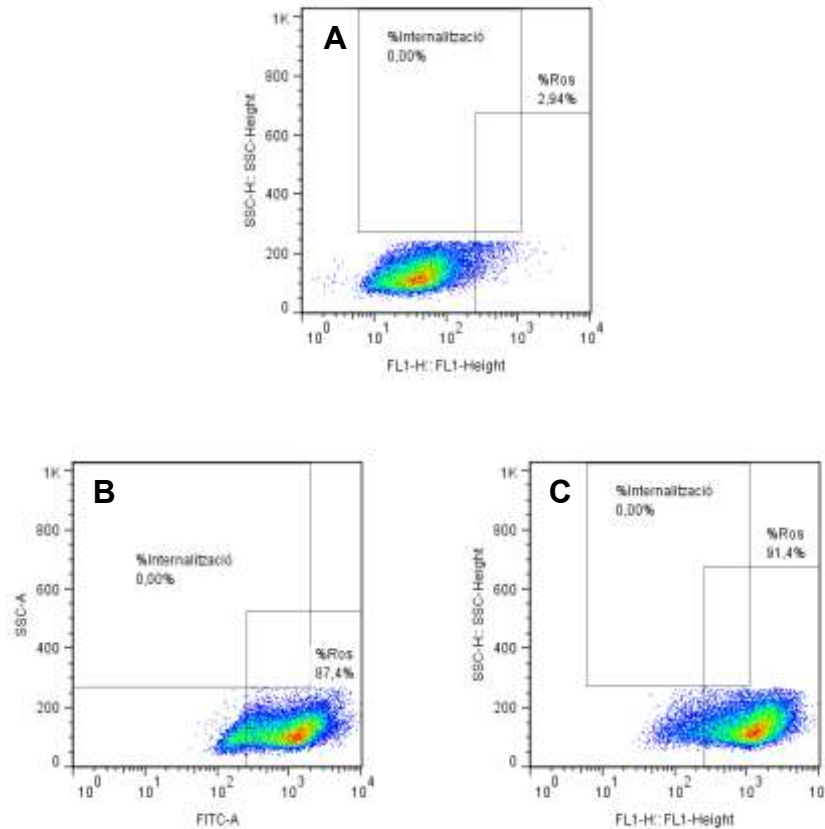


Figura 67: Figuras del FACS correspondientes a células BEAS-2B no expuestas (A), o después de 24 horas de tratamiento (B) o una semana de tratamiento (C) con 20 $\mu\text{g/mL}$ de NM403.

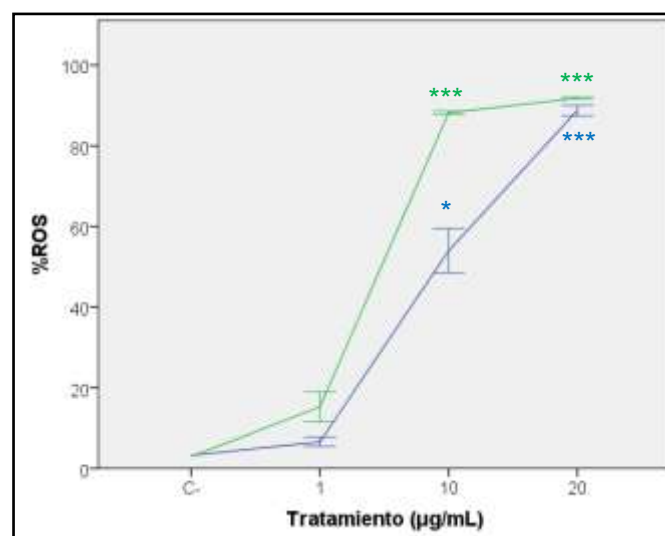


Figura 68: Incremento del porcentaje de ROS. En azul, resultados para el T0. En verde, resultados para el T1. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

4.4.2.4. Resultados con el ensayo del cometa

El compuesto NM403 se ha evaluado en los mismos tiempos de exposición (T0, 24 horas; T1, una semana; T2, tres semanas) con las mismas concentraciones que el NM102 (1, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$).

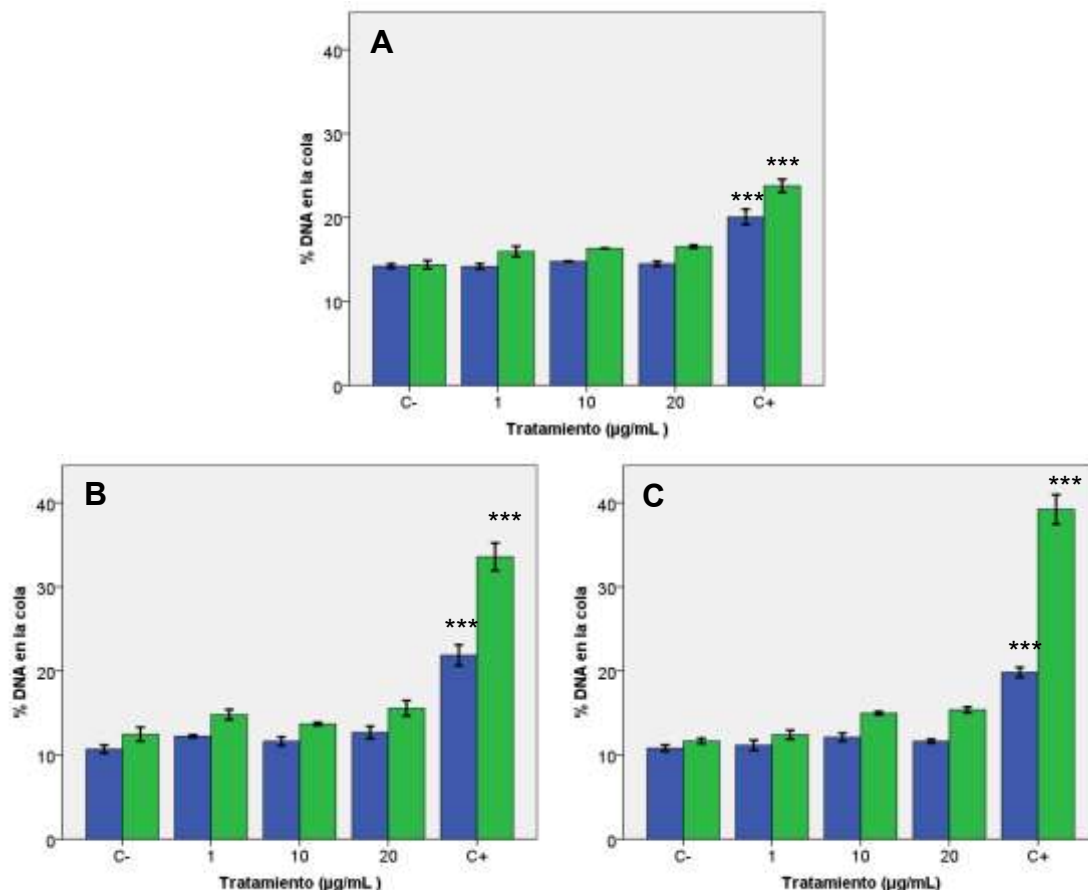


Figura 69: Resultados obtenidos en el ensayo del cometa a las 24 horas (A), una semana (B) y tres semanas (C) de tratamiento con concentraciones de 1, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de NM403. Las barras azules corresponden al ensayo estándar del cometa y las barras verdes al ensayo modificado con la enzima FPG. *** $P < 0,001$.

Tal como sucedía con éste, el NM403 no es capaz de inducir incrementos significativos del daño primario u oxidativo en el DNA (figura 69) en ninguna de las concentraciones utilizadas en el inicio del experimento (A). Al mantener la exposición durante una (B) y tres semanas (C) tampoco existe un incremento del daño en el DNA, aunque se observa que el daño basal en el DNA no se incrementa con el paso de tiempo mientras que el daño oxidativo si que aumenta, aunque no de manera significativa en ninguno de los dos tiempos de exposición posteriores.

En resumen, el NM403 no es capaz de generar incrementos del daño basal u oxidativo en el DNA con el tratamiento de las concentraciones utilizadas en exposiciones de hasta tres semanas en la línea celular BEAS-2B.

4.4.2.5. Resultados con el ensayo de micronúcleos

La capacidad de NM403 de generar alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas en una exposición prolongada se ha evaluado mediante el ensayo de micronúcleos con el uso de citocalasina-B. En el caso de este nanomaterial se ha seguido el mismo procedimiento que en el compuesto anterior. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 70, donde se presentan las frecuencias de micronúcleos tras los distintos tiempos de tratamiento. En el caso de este nanomaterial, existen incrementos significativos de la frecuencia de micronúcleos en todos los tiempos de tratamiento, aunque existen diferencias entre ellos.

En el T0, la concentración que produce efectos estadísticamente significativos es la de 10 $\mu\text{g/mL}$, pese a la existencia de ésta, no existe una relación dosis-efecto clara. La ausencia de esta relación no nos permite afirmar que el compuesto sea genotóxico en este tiempo de tratamiento. En cambio, a la semana de exposición, la concentración con efectos estadísticamente significativos es la de 20 $\mu\text{g/mL}$ y en este caso sí que existe una leve relación dosis-efecto, aunque la concentración intermedia no concuerde con esta tendencia. Tras tres semanas de tratamiento, la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ también induce incrementos significativos de la frecuencia de micronúcleos, en concordancia con los resultados obtenidos a la semana de tratamiento. En este caso la relación dosis-efecto es muy clara. Los resultados obtenidos indican que el NM403 induce alteraciones cromosómicas en la línea celular BEAS-2B en este experimento de exposición crónica a bajas dosis. Los resultados se ven confirmados por los efectos inducidos por el control positivo (150 ng/mL de mitomicina-C) que son claramente positivos (aunque remarcablemente más bajos que en el ensayo realizado tras una semana de tratamiento) ratificando que, bajo las condiciones de exposición utilizadas, el compuesto NM403 induce efectos genotóxicos en el ensayo de micronúcleos.

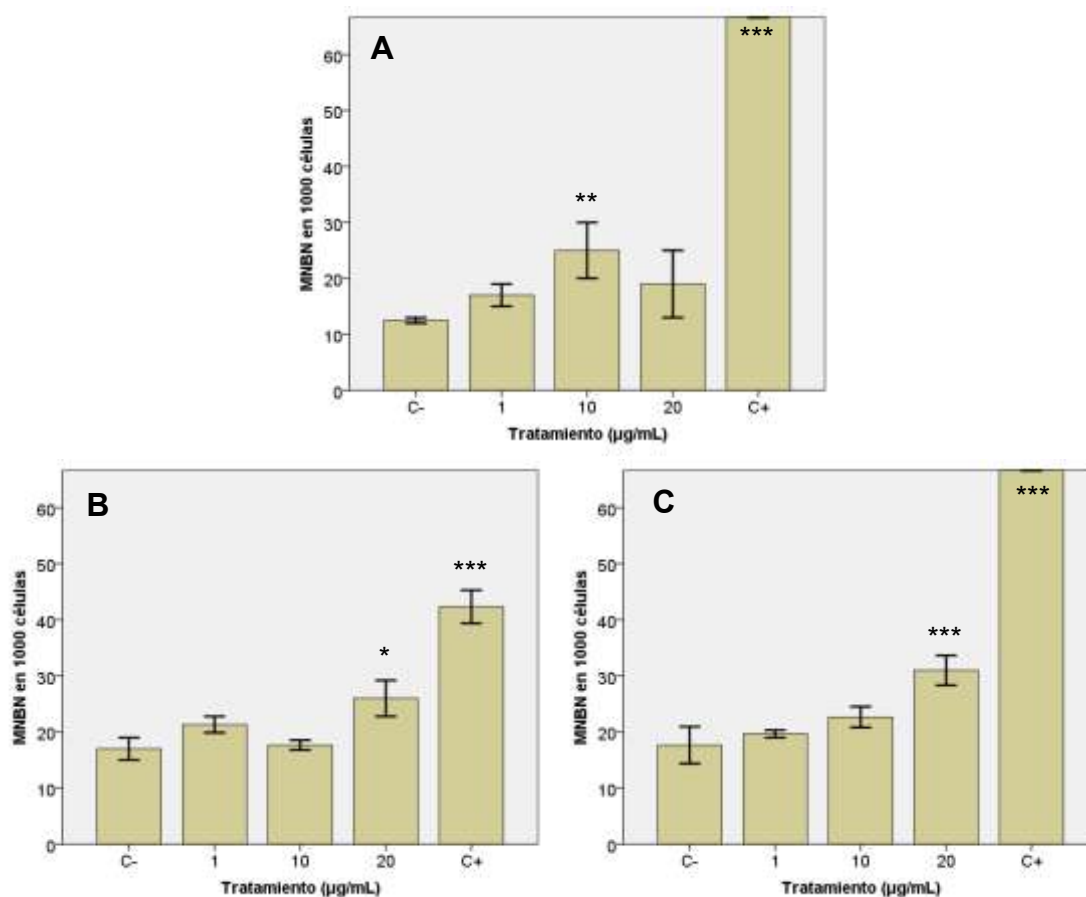


Figura 70: Resultados obtenidos en el ensayo de micronúcleos a las 48 horas (A), una semana (B) y tres semanas (C) de tratamiento con concentraciones de 1, 10 y 20 µg/mL de NM403. El control positivo corresponde a una concentración de 150 ng/mL de mitomicina-C. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

4.4.2.6. Expresión de la hemooxigenasa-1 mediante Western blot

El incremento de la expresión proteica de hemooxigenasa-1 está ligada a la respuesta frente a una exposición a estrés oxidativo. En el caso de la exposición durante tres semanas de células BEAS-2B al compuesto NM403, se puede observar en la figura 71 un claro incremento estadísticamente significativo de la misma en las concentraciones de 10 y 20 µg/mL.

Esto nos indica que la exposición al compuesto NM403 induce incrementos de la expresión de la hemooxigenasa-1, acorde al incremento de ROS intracelular detectado por FACS. En cambio, esto parece entrar en contradicción con los datos obtenidos en el ensayo del cometa, donde no se detectan incrementos del daño oxidativo.

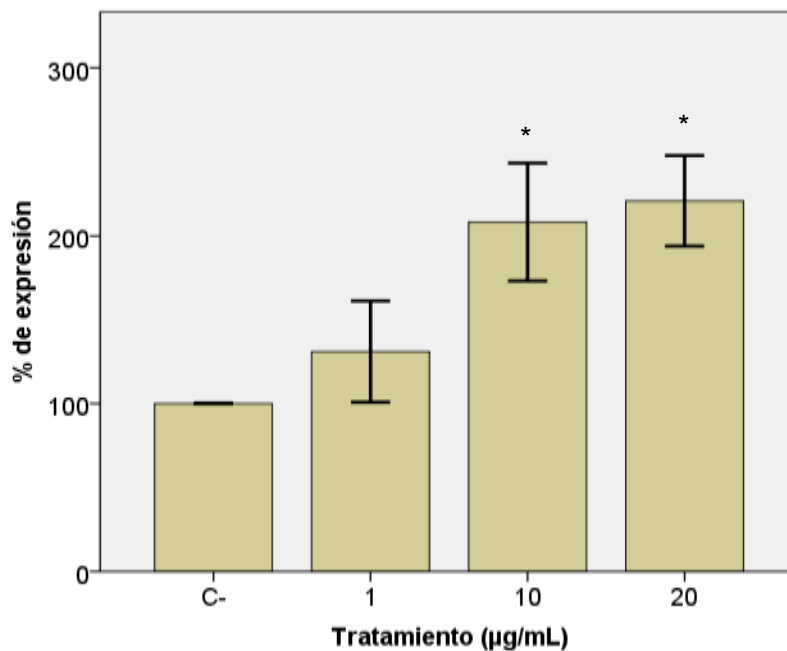


Figura 71: Expresión proteica relativa respecto el control de hemoxygenasa-1 en las distintas concentraciones de NM403. * $P < 0,05$.

4.4.2.7. Expresión de factores proinflamatorios y de la hemoxygenasa-1 mediante RT-PCR

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de mRNA, éstos se indican en la figura 72. Como se observa, tras tres semanas de exposición al compuesto NM403, los niveles de expresión de todas las interleucinas han disminuido de manera muy significativa.

Es de destacar el caso de la IL-1 β donde se observa una disminución de la expresión muy significativa en las tres concentraciones utilizadas, respecto al control negativo donde, además, la expresión prácticamente desaparece en las dos concentraciones más altas. El caso de la IL-6 es similar aunque con la diferencia de que los niveles de expresión respecto al control son más altos que los de IL-1 β , aunque en las concentraciones de 10 y 20 µg/mL los niveles ya son estadísticamente muy significativos. Por lo que se refiere a la IL-8, en todas las concentraciones los niveles de expresión son menores que los observados en el control negativo, aunque ninguna de manera significativa. Es de destacar que los niveles de expresión de IL-8 aumentan ligeramente en las concentraciones más altas en contraposición a las dos leucinas anteriores.

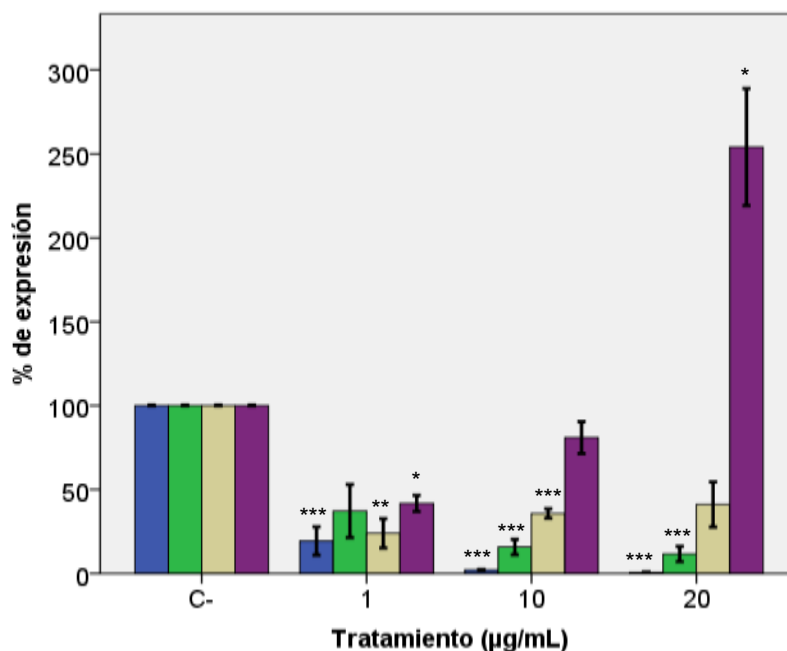


Figura 72: Cambios en la expresión a nivel de mRNA de IL-1 β , IL-6, IL-8 y hemoxygenasa-1 tras 3 semanas de tratamiento con distintas concentraciones de NM403. La barra azul corresponde a los niveles de expresión de IL-1 β . La barra verde corresponde a los niveles de expresión de IL-6. La barra marrón corresponde a los niveles de expresión de IL-8. La barra morada corresponde a los niveles de expresión de hemoxygenasa-1. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Por otra parte, los niveles de expresión del mRNA de la hemoxygenasa-1 muestran una clara relación dosis-efecto, aunque en la concentración más baja los niveles de expresión son significativamente más bajos que los detectados en el control negativo, en la concentración de 20 µg/mL los niveles de expresión también son estadísticamente significativos, siendo un 250% mayores que los del control. En resumen, las interleucinas estudiadas presentan una disminución de su expresión en las células BEAS-2B con las tres concentraciones analizadas tras el tratamiento de tres semanas con el compuesto NM403. Además, existe un incremento significativo de la expresión de hemoxygenasa-1 en la concentración más alta utilizada.

4.4.2.8. Resultados obtenidos en el ensayo del *soft-agar* con NM403

En la figura 73 se indican los resultados obtenidos al realizar el ensayo del *soft-agar* en los tratamientos con NM403. Estos resultados se han obtenido con células tratadas durante 4 semanas en las concentraciones de 1, 10 y 20

$\mu\text{g/mL}$. Como ya se ha comentado, se observa que existe un nivel basal elevado de células con capacidad de crecer no adheridas a superficie en la línea BEAS-2B. Así, pese a la cantidad de colonias formadas, es posible observar cualitativamente que los tratamientos con NM403 inducen un mayor número de colonias en este ensayo, indicando que hay un mayor número de células capaces de crecer en esta matriz de agar. Cuando se cuantifica el número de colonias (figura 74), se observa que hay un incremento significativo del número de éstas en las concentraciones de 1 y 20 $\mu\text{g/mL}$. Pese a que no existe un incremento significativo en la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ ya que el número de colonias es menor que en las otras dos concentraciones, esto puede ser debido a que durante el contaje de colonias realizado por el software éste pudiera no considerar como colonias puntos en la imagen que en realidad sí que existen. Por lo tanto se puede considerar que, pese a la existencia de este valor, existe una relación dosis-efecto para este compuesto y, en conclusión, que el N403 es capaz de inducir un desdiferenciación celular en la línea BEAS-2B en las condiciones experimentales que hemos utilizado.

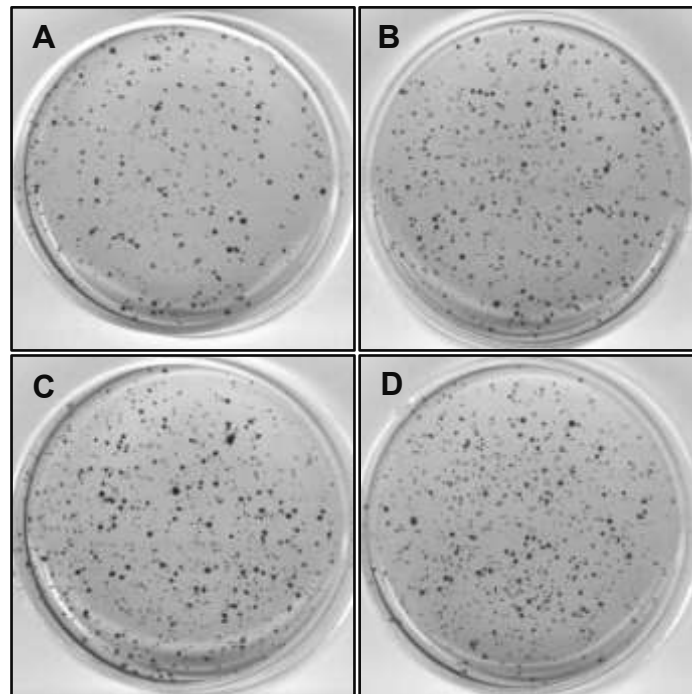


Figura 73: Fotografías de placas de 35 mm usadas en el ensayo del *soft-agar*. A, C-; B, NM403 1 $\mu\text{g/mL}$; C, NM403 10 $\mu\text{g/mL}$; D, NM403 20 $\mu\text{g/mL}$.

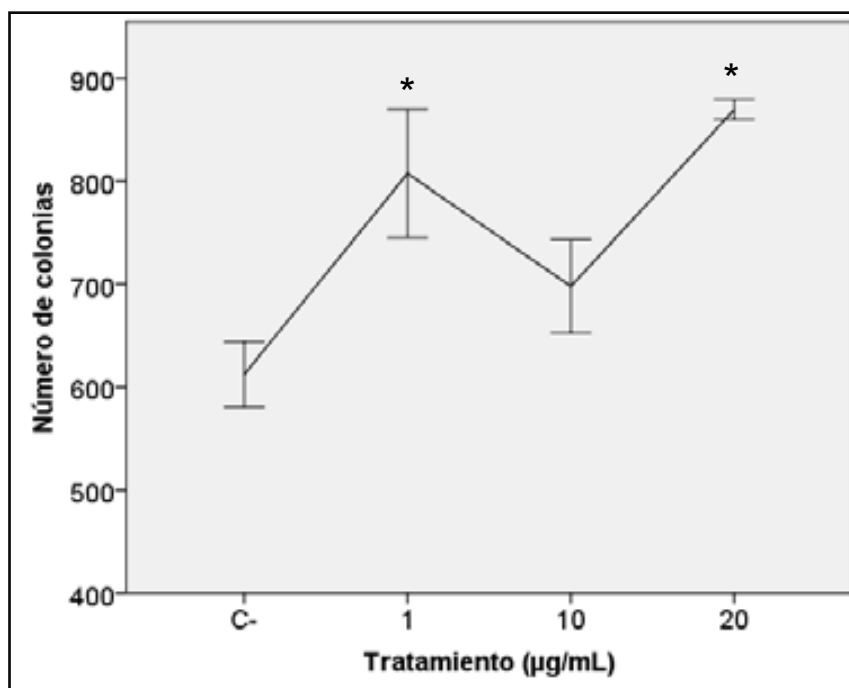


Figura 74: Colonias formadas en el *soft-agar assay* después de 4 semanas de tratamiento para las distintas concentraciones de NM403. * $P < 0,05$.

4.4.2.9. Consideraciones generales

En el estudio, realizado sobre la exposición crónica de la línea BEAS-2B con el compuesto NM403, existen datos contradictorios por lo que se refiere a la internalización. Aunque se han observado estructuras que encajan con las características de los nanotubos de carbono, esto no se ha visto refrendado por los resultados obtenidos de su internalización mediante FACS, donde los resultados han sido negativos.

Pese a este hecho, se ha detectado que este compuesto es capaz de inducir alteraciones cromosómicas en alguna concentración en todos los tiempos de tratamiento, aunque a la semana 1 y a las tres semanas de tratamiento este efecto se observa en la concentración de 20 µg/mL. En cambio no se han detectado incrementos del daño primario o daño oxidativo en el DNA. La ausencia de daño oxidativo observada entra en conflicto con el incremento de ROS intracelular observado, así como el incremento de la expresión proteica de hemoxygenasa-1 en las concentraciones de 10 y 20 µg/mL mediante Western blot y el incremento de la expresión de mRNA en la concentración de 20 µg/mL detectada mediante RT-PCR. Es interesante observar que hubo una disminución muy significativa de los niveles de mRNA de las interleucinas

estudiadas, sugiriendo que no existe una inducción de inflamación en las condiciones del experimento utilizadas. Por lo que se refiere a la capacidad de crecer en el medio de *soft-agar*, es sorprendente que las concentraciones de 1 y 20 $\mu\text{g/mL}$ sea capaces de inducir un incremento significativo del número de colonias después de tan sólo 4 semanas de tratamiento, sugiriendo que la exposición a este compuesto puede inducir procesos de iniciación tumoral en las condiciones experimentales utilizadas.

5. DISCUSIÓN

Dada la naturaleza de los nanomateriales, y debido a sus múltiples propiedades, existe una preocupación creciente sobre los efectos que puedan tener los nanomateriales tanto sobre la salud humana como sobre el medio ambiente. Como consecuencia de su gran potencial para obtener mejoras y nuevas soluciones a múltiples tecnologías, se está produciendo un gran incremento en la producción de este tipo de materiales y, consecuentemente, en la probable exposición a éstos por parte de las personas y de otros organismos vivos. Esto supone un importante impacto en términos de salud humana e impacto ambiental. Además, debido a que esta tecnología está en pleno auge, es de suponer que el incremento de este tipo de exposición aumentará de manera sostenida en las próximas décadas. Ante este escenario se requieren estudios que determinen, de la mejor manera posible, el riesgo que puede suponer para la salud humana la exposición a los nanomateriales. En particular, hay que incrementar nuestro conocimiento acerca del riesgo que pueda suponer ante posibles daños en el material genético de los organismos expuestos. De hecho ya se propone el nacimiento de un nuevo campo, la nanogenotoxicología, debido a los potenciales riesgos genotóxicos de los nanomateriales y sus posibles mecanismos de acción (Singh et al., 2009).

En este contexto, nuestro estudio se engloba dentro de los esfuerzos por obtener más información sobre el potencial tóxico y genotóxico de estos compuestos, mediante la adecuación y desarrollo de las metodologías existentes para obtener resultados veraces sobre este riesgo potencial, mediante el cribado de distintos nanomateriales y la realización de un estudio de intercalibración junto con otros laboratorios. Así mismo, nuestro estudio explora otros tipos de condiciones del tratamiento *in vitro* que simulan situaciones más relevantes en términos de exposición. Estos experimentos nos han permitido obtener información sobre el potencial genotóxico de algunos nanomateriales, así como la identificación de algunos de los puntos flacos y dificultades que habrá que solventar en el futuro de cara a conseguir que las evaluaciones del potencial tóxico se adecuen a situaciones de exposición equivalentes a las que se dan en la realidad.

5.1. CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS NANOMATERIALES EN LOS EXPERIMENTOS CON TRATAMIENTOS AGUDOS

Como se ha podido observar a lo largo de nuestro trabajo, la capacidad de los distintos nanomateriales para afectar a la viabilidad celular es muy variable. Esto es cierto no tan sólo entre nanomateriales de distintos materiales, sino incluso entre distintos nanomateriales de la misma composición obtenidos utilizando distintos procesos. Esto ha sido especialmente relevante cuando hemos evaluado los distintos nanotubos de carbono donde hemos observado que la citotoxicidad puede variar de manera muy acusada entre ellos, siendo algunos claramente citotóxicos y otros no. También hemos observado, por lo que respecta a los nanotubos de carbono, que los perfiles toxicológicos de los mismos son distintos en función del tipo celular, lo que evidencia distintas propiedades toxicológicas. Así, mientras que en la línea Caco-2 los nanomateriales NM400 y NM402 inducen un claro efecto citotóxico, esto no sucede en la línea BEAS-2B. En cambio, en la línea BEAS-2B el compuesto NM401 induce un marcado efecto citotóxico que no se observa en la línea Caco-2. Por otra parte, cuando se ensayaron los distintos compuestos de SAS, todos los nanomateriales de este grupo han sido capaces de inducir citotoxicidad, con unas curvas de disminución de la viabilidad bastante parecidas en la línea 16HBE, que ha sido la línea celular usada en la evaluación de este nanomaterial. A pesar de esta respuesta, más o menos uniforme, vemos que el compuesto NM200 ha sido el que ha presentado un menor potencial citotóxico,

Por lo que se refiere a la genotoxicidad de los nanomateriales utilizados en la primera fase, mediante el ensayo del cometa, se pudo observar que existe ausencia de la misma con la excepción de algunos casos muy concretos, como en el caso del NM401 en la línea Caco-2, donde hay un incremento significativo del daño en la concentración más baja del tratamiento de 3 horas. Sin embargo, evaluados de manera global, no se puede decir que ninguno de los nanomateriales ensayados posea potencialidad genotóxica, al menos al ser determinada mediante el ensayo del cometa.

La ausencia general de genotoxicidad observada en el ensayo del cometa tanto la obtenida por nosotros como por los otros grupos participantes en el proyecto, contrasta con los resultados obtenidos en otros estudios citados en la

literatura. Sin embargo, una rigurosa evaluación bibliográfica muestra importantes disparidades entre los resultados publicados, observándose que nanomateriales del mismo tipo muestran citotoxicidades y genotoxicidades muy variables en función del ensayo, línea celular o grupo que lleva a cabo el estudio.

Si tomamos por ejemplo el caso de los nanotubos de carbono se observa que se ha realizado un número importante de estudios, obteniéndose en los ensayos *in vitro* distintos perfiles toxicológicos. Así, en el caso del estudio de Lindberg et al. (2009), donde se exploran las capacidades tóxicas de nanotubos de carbono y de nanofibras de grafito en la línea BEAS-2B, se detecta daño en el DNA en la versión estándar del ensayo del cometa en los tres tiempos de tratamiento utilizados: 24, 48 y 72 horas. En cambio, los resultados obtenidos por este mismo grupo en el ensayo de los micronúcleos no muestran incremento de los mismos respecto a los valores del control. Sin embargo, otro estudio más reciente realizado por los mismos autores (Lindberg et al., 2012) con dos tipos de nanotubos de carbono (SWCNT y MWCNT) de longitud corta, utilizando dos tipos celulares distintos como son BEAS-2B y Met-5A (línea mesotelial de origen humano), observan que en el ensayo del cometa se obtienen efectos distintos en función de la línea, observando claros incrementos del daño en el DNA con ambos tipos de nanotubos en la línea Met-5A, mientras que en la línea BEAS tan sólo se observa un pequeño incremento del daño en los tratamientos con el SWCNT, mientras que éste es inexistente con el MWCNT. Hay que señalar que en este caso el medio de cultivo de la línea Met-5A está enriquecido con un 10% de FBS, mientras que el de la línea BEAS-2B no, lo que podría influir en la respuesta observada. Hay que remarcar el hecho sorprendente de que, mediante TEM, observaron que los nanomateriales parecen interactuar de manera más clara con la línea BEAS-2B, pese a que ésta muestra una nula o baja inducción de daño genotóxico. Este mismo grupo ha analizado el potencial genotóxico de estos SWCNT y MWCNT cortos en cultivos de linfocitos humanos (Catalán et al., 2011) utilizando distintos tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 horas) observando que es en el de 48 horas donde hay una inducción de aberraciones cromosómicas más elevada. Una posible explicación de estos resultados podría ser la necesidad de que pasen al menos dos ciclos celulares

para que los nanotubos puedan interactuar con el DNA (una vez se ha disgregado la membrana nuclear). Sin embargo, los autores también postulan que estos resultados podrían deberse a un efecto genotóxico secundario asociado al proceso inflamatorio resultado de la interacción con los nanotubos de carbono.

El papel del posible daño oxidativo causado por la exposición a nanotubos de carbono es objeto de gran debate. Así, algunos estudios han observado que los MWCNT generan citotoxicidad y daño en el DNA, pero no del tipo oxidativo. En el estudio de Cavallo et al. (2012), estos autores observaron que el tipo de MWCNT utilizado era capaz de inducir genotoxicidad en los tres tiempos de tratamiento (2, 4 y 24 horas) en la línea celular de origen pulmonar A549, y que estos nanotubos presentaban efectos citotóxicos mediante la afectación de la integridad de la membrana, evaluados mediante la liberación de LDH (lactato deshidrogenasa). Otro estudio del mismo grupo (Ursini et al., 2012) analizó el efecto de MWCNT-OH (con la superficie modificada). En este caso también se observó un incremento del daño no oxidativo en el DNA, así como un efecto citotóxico similar, aunque sin liberación de LDH, sugiriendo que los mecanismos citotóxicos involucrados pueden ser distintos. En ambos estudios se observó que los MWCNT penetran en las células, pero la ausencia de efectos sobre la integridad de la membrana tras los tratamientos con el MWCNT-OH sugiere que esta modificación en la superficie de los nanotubos de carbono juega un papel importante en la interacción de los mismos con las células.

Experimentos como los de Di Giorgio et al. (2011) en la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7 tratadas con SWCNT y MWCNT, también muestran un incremento del daño en el DNA medido por el ensayo estándar del cometa, así como un incremento de las aberraciones cromosómicas y de la liberación de ROS, aunque no generaron una respuesta inflamatoria. Los macrófagos son un tipo especial de línea celular en el sentido de que una de sus funciones principales consiste en fagocitar partículas extrañas. Así, este tipo celular se puede considerar un tipo celular no representativo de los órganos más expuestos, excepto si tenemos en cuenta las vías respiratorias donde éstos podrían jugar un papel importante en los procesos inflamatorios generados durante la fagocitación frustrada de nanotubos de carbono largos y rígidos, que

conducen a un incremento de la expresión de factores como TNF- α y ROS, lo que puede que no suceda frente a nanotubos de carbono más flexibles y enredados (Brown et al., 2007).

En el trabajo de Ema et al. (2012a), donde se llevó a cabo una amplia batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar el potencial tóxico de dos MWCNT, se observó que ninguno de ellos inducía resultados positivos en un test bacteriano de reversión mutagénica, ni eran capaces de inducir aberraciones cromosómicas cuando eran activados metabólicamente. En cambio, cuando no eran activados metabólicamente los dos nanotubos de carbono inducían aberraciones cromosómicas, uno de manera débil y el otro de manera más clara. Sin embargo, al realizar el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de ratón tras tratamientos *in vivo*, ninguno de los dos compuestos fue capaz de inducir incrementos de la frecuencia de micronúcleos. Otro estudio del mismo grupo (Ema et al., 2012b) utilizando ratones tratados de manera aguda (una única dosis por instilación) a 3 y 24 horas, o tratados con dosis repetidas una vez por semana durante 5 semanas, mostró que no hay incrementos en los niveles de daño en el DNA, cuando se utiliza el ensayo del cometa en las células de pulmón, bajo distintas condiciones experimentales. En otro trabajo del mismo grupo se observan resultados parecidos (Naya et al., 2012) tras tratamientos en ratas, observándose la ausencia de inducción de daño genotóxico en las células de los pulmones, mediante el ensayo del cometa; sin embargo, sí que fueron capaces de observar una reacción inflamatoria potente, tanto en los tratamientos agudos como en los repetidos.

Así, aunque la exposición a nanotubos de carbono presenta resultados contradictorios en los diferentes estudios, existe una preocupación creciente por su capacidad para iniciar o promover procesos cancerígenos. Ante este tipo de procesos, el estudio de Takagi et al. (2008) muestra que una inyección intraperitoneal de MWCNT en ratones p53^{+/-}, induce un incremento del desarrollo de mesoteliomas, tal como lo hace el control positivo (amianto), sugiriendo que los mecanismos por los cuales se desarrollan los tumores son equivalentes. Por lo que se refiere a estos procesos tumorales, los resultados de un estudio (Murphy et al., 2011) en el que se realizaron inyecciones intrapleurales de CNTs cortos o largos, sugiere que la longitud de éstos es un factor crítico, ya que los cortos pudieron ser eliminados por el organismo

mientras que los largos no, induciendo inflamación aguda y llevando a una fibrosis progresiva en la pleura parietal. Además, existen algunas hipótesis de que los nanotubos podrían tener un efecto disruptor durante la mitosis debido a su similitud estructural con los microtúbulos y que, por lo tanto, podrían interactuar con los cinetocoros (Sargent et al., 2012); sin embargo, los resultados en el ensayo de micronúcleos, que permite detectar actividad aneugénica, no son concluyentes respecto a la bondad de esta hipótesis.

Por lo que se refiere a las potencialidades genotóxicas de las SAS, también existen discrepancias entre los distintos estudios. En el estudio de Mu et al. (2012) estos autores observaron una gran toxicidad a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SAS de 14 nm de tamaño (aunque los aglomerados en el medio son de 500 nm). En este estudio la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya genera un daño en el DNA muy claro (medido mediante el ensayo del cometa) en las tres líneas celulares utilizadas (A549; HT29, de origen intestinal y HaCat, queratinocitos humanos). También en la línea HUVEC (células endoteliales primarias de cordón umbilical) se observa un incremento del daño en el DNA y en la citotoxicidad, observándose la liberación de ROS (Duan et al., 2013). Otro estudio reciente (Guidi et al., 2013), llevado a cabo en las líneas A549 y RAW264.7 muestra que dos tipos distintos de SAS (densa o mesopórica) son capaces de inducir daño en el DNA (aunque de manera más marcada en las RAW264.7) utilizando el ensayo del cometa, así como el ensayo de micronúcleos, aunque en este ensayo tan sólo se obtuvieron resultados positivos en la línea RAW264.7.

En cambio, otros estudios no han sido capaces de detectar inducción de daño en el DNA mediante el ensayo del cometa. Por ejemplo, en fibroblastos 3T3-L1 no se detectó ningún tipo de efecto en los dos laboratorios que participaron en este estudio, ni en ninguno de los tiempos de tratamiento (3, 6 y 24 horas), ni con ninguna de las dos concentraciones utilizadas, 4 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Barnes et al., 2008).

En otro estudio (Sargent et al., 2012), aunque se observa una pequeña inducción de la citotoxicidad y del daño en el DNA, cuando se utiliza la línea HT29 en tratamientos de 24 horas con SAS de 25 o 100 nm, la relación dosis-respuesta observada es negativa, siendo las concentraciones más altas las que menos efectos citotóxicos y genotóxicos inducen, cuando se utiliza el ensayo

del cometa. La existencia de estas marcadas diferencias entre estudios indica las dificultades para comprender el potencial real que pueden tener este tipo de compuestos sobre la salud humana.

En los estudios indicados en el trabajo de Gehrke et al. (2013), se observa que la citotoxicidad de tres tipos de SAS de 12, 40 y 200 nm varía en función del tamaño y de la cantidad de FBS presente en el medio, siendo esta citotoxicidad mucho más elevada cuando hay un 1% de FBS en el medio de cultivo, respecto a cuándo hay un 10% en la línea HT29. También se detectó un ligero incremento en los niveles de daño en el DNA en el ensayo del cometa, valores que no se obtuvieron cuando el ensayo del cometa se complementó con FPG. Los autores sugieren que esta diferencia de los efectos citotóxicos probablemente esté ligada al hecho de que una mayor proporción de FBS en el medio puede recubrir de manera más eficiente la superficie de las nanopartículas, modificando su interacción con las células y disminuyendo en consecuencia su citotoxicidad.

Por lo que se refiere a los ensayos llevados a cabo *in vivo*, estudios sobre el efecto de partículas de sílice en su forma nanométrica o micrométrica, llevados a cabo en ratones tratados por ingestión durante 10 semanas, se observó un ligero incremento en la expresión de la enzima alanina aminotransferasa así como sobre la toxicidad en el hígado, aunque los valores observados son similares entre los ratones tratados con nano o micropartículas y, a nivel global, no se encuentran diferencias significativas en el estado de salud general de los animales expuestos a estos dos grupos de SAS (So et al., 2008).

Por otro lado, cuando las nanopartículas de SAS se administran por inyección intravenosa en ratones, se ha detectado que éstas pueden causar complicaciones durante el embarazo (Yamashita et al., 2011). Así, los ratones hembras tratados con estos nanomateriales presentaron úteros y fetos más pequeños que las no tratadas. Además, se localizaron nanopartículas tanto en la placenta como en el cerebro e hígado de los fetos. Los autores postulan que este efecto probablemente sea debido a la interacción de las nanopartículas con la estructura y la función de la placenta siendo ésta particularmente sensible a dichos nanomateriales. Curiosamente, estos efectos desaparecieron cuando se repitieron estos experimentos con nanopartículas modificadas en su

superficie con grupos amino o carboxilo, lo que indica la importancia de la superficie en su capacidad de atravesar la membrana placentaria.

En otro estudio con tratamientos con SAS (Liu et al., 2011) donde nanopartículas mesopóricas de 110 nm se inyectaron a ratones en una sola dosis, o de manera repetida durante 2 semanas, no se obtuvieron signos de toxicidad bajo ninguna de las condiciones de exposición. Cuando se analizó la distribución de estas nanopartículas, se observó que éstas se encontraron principalmente en las células fagocíticas en hígado y bazo. Un resultado interesante es el observado en el estudio de Huang et al. (2010) en el que se observó que en ratones xenotransplantados con melanoma de origen humano (A375), existía un incremento del tamaño de los mismos cuando los animales eran expuestos a nanopartículas de SiO₂ mesopóricas por inyección intravenosa. Los autores concluyen que la promoción tumoral observada era debida a una sobreexpresión del gen Bcl-2 y a una inhibición de la activación del factor NF-κB.

En el caso de las nanopartículas de TiO₂ también se han llevado a cabo distintos estudios para determinar su potencial toxicidad y, como en los casos anteriores, los resultados obtenidos son muy variables, y a menudo contradictorios entre sí. En el caso del estudio de Petkovic et al. (2010) investigan el potencial tóxico y genotóxico de nanopartículas de TiO₂ con diferentes estructuras cristalinas (rutilo y anatasa) en la línea celular HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano), aunque presentan distintos tamaños (de 100 y 25 nm concretamente) y observaron que los agregados se encontraban en el rango nanométrico. Pese a ello, las nanopartículas con la estructura cristalina anatasa eran capaces de inducir un incremento del daño primario en el DNA, medido mediante el ensayo del cometa, así como generar daño oxidativo, detectado con la incorporación de la enzima FPG al ensayo. Mientras que las nanopartículas con estructura cristalina rutilo no indujeron daño en el DNA, evidenciando un posible efecto de la estructura cristalina en el efecto genotóxico de estos compuestos.

Otro estudio también explora el distinto potencial en función de la estructura cristalina (Falck et al., 2009). En este caso se compararon los efectos de tres tipos de TiO₂ en la línea celular BEAS-2B, TiO₂ nanométrico (rutilo y anatasa) y TiO₂ rutilo micrométrico. Sorprendentemente, se observó que el rutilo

micrométrico presentaba citotoxicidad a concentraciones menores que el TiO₂ nanométrico anatasa, siendo el rutilo nanométrico el menos citotóxico. Por otra parte, tan sólo el TiO₂ rutilo micrométrico y el TiO₂ anatasa indujeron incrementos del daño primario en el DNA y sólo éste último indujo un incremento significativo de la inducción de micronúcleos.

El estudio de Catalán et al. (2011), que ya se ha comentado anteriormente, explora el potencial de incrementar la inducción de aberraciones cromosómicas con el mismo compuesto de TiO₂ anatasa utilizado en el estudio anterior (aunque en este caso en linfocitos humanos), encontrando un incremento de estas aberraciones a las 48 horas de tratamiento, siendo estos resultados concordantes con la inducción de micronúcleos observada en el estudio anterior.

Landsiedel et al. (2010) comparan el potencial genotóxico *in vitro* e *in vivo*, utilizando el test de Ames en *Salmonella* y el ensayo de micronúcleos en la línea celular V79 (células de pulmón de hámster chino), y el ensayo del cometa en médula ósea y pulmón en ratas expuestas a TiO₂ por inhalación. En este caso los resultados obtenidos *in vitro* no muestran un incremento del número de colonias o de micronúcleos en los ensayos utilizados. Tampoco la exposición *in vivo* induce incrementos del daño primario en el DNA.

Por otro lado, el estudio de Husain et al., (2013) indica que la exposición a bajas dosis puede inducir procesos inflamatorios en ratones C57BL/6 expuestas a 18, 54, y 162 µg/ratón de TiO₂ rutilo mediante instilación traqueal. Esto se valoró mediante la expresión de varios mediadores inflamatorios, aunque no se detectó una mayor presencia de neutrófilos en la dosis más baja (sí en las altas). Estos autores también remarcan la retención del nanomaterial que se observa en los pulmones, ya que aún se detectan a los 28 días de la exposición. Por lo que se refiere a la inducción de procesos inflamatorios, en este caso *in vitro*, el estudio de Ekstrand-Hammarström et al. (2011) compara los efectos de 5 tipos de nanopartículas de TiO₂ en tres tipos de líneas celulares de pulmón, NHBE (cultivo primario de células broncoepiteliales de pulmón), A549 y BEAS-2B. En este estudio se observa que estos tipos celulares responden sólo de manera uniforme a nanopartículas de TiO₂ que tienen las dos estructuras cristalinas, expresando las tres líneas la proteína IL-8 (como sucede tras tres semanas de tratamiento en el experimento crónico con

el NM102), mostrando diferentes perfiles de expresión de éste y otros factores cuando la estructura cristalina de las nanopartículas es pura. Estos autores concluyen que el efecto depende de las características fisicoquímicas de la nanopartícula, aunque hay que destacar que en el caso de BEAS-2B éstas se cultivan sin suero en el medio, pudiendo ello afectar al comportamiento de las nanopartículas.

La revisión de la bibliografía existente por parte de Shi et al. (2013) revela que la mayoría de efectos encontrados se pueden deber al uso de concentraciones muy elevadas de estas nanopartículas, a causa de su baja citotoxicidad, aunque se ha observado que en estudios crónicos por inhalación en ratas (de dos años de duración) se observan incrementos significativo de tumores pulmonares.

En resumen, pese a que se han dedicado muchos esfuerzos en la determinación de la toxicidad de estos compuestos, los resultados obtenidos no son concluyentes, ya que a menudo llegan a ser contradictorios entre sí.

5.1.1. Factores que pueden afectar las capacidades citotóxicas y genotóxicas

De lo indicado en el apartado anterior se desprende que la toxicidad y genotoxicidad de los nanomateriales puede depender de múltiples factores, lo que explicaría la gran diversidad de resultados observados entre los distintos estudios encontrados en la literatura; por lo tanto, parece interesante discutir acerca del papel que algunas propiedades de los nanomateriales o del medio de cultivo pueden jugar en su potencial genotóxico.

5.1.1.1. Estructura

Las diferencias o similitudes en los perfiles citotóxicos y genotóxicos, se pueden deber a distintos factores. Así, por ejemplo, las diferencias observadas en la citotoxicidad de los nanotubos de carbono en nuestros experimentos entre las líneas Caco-2 y BEAS-2B, pueden ser debidas a que los distintos nanotubos, pese a ser del mismo tipo estructural, pueden presentar diferencias en sus características. Una que podríamos destacar es la forma de los nanomateriales (y su rigidez), que puede afectar a las capacidades citotóxicas de éstos. Este hecho se ha observado entre nanopartículas de plata tanto esféricas como en forma lineal, donde estas últimas presentan una mayor

citotoxicidad debido a su interacción física con las membranas celulares, ya que son capaces de perforarlas (Stoehr et al., 2011) y, consecuentemente, presentar una mayor citotoxicidad. En nuestro caso, de los cuatro tipos de CNTs que se han observado en el TEM, tres tienen una apariencia flexible, mientras que uno de ellos (el NM401) presenta un aspecto mucho más rígido. La rigidez, así como el diámetro de las fibras, son parámetros que se han identificados como claves a la hora de inducir mesoteliomas *in vivo* (Nagai et al., 2011), lo que supone que es un parámetro importante a la hora de ejercer efectos biológicos. Sin embargo, hay que señalar que en nuestro caso, las diferencias de rigidez observadas con este nanomaterial sólo inducen un efecto citotóxico en la línea Caco-2, lo que indica que otros factores deben también interferir en sus efectos biológicos.

5.1.1.2. Composición del medio de cultivo

Un factor que se ha ligado de manera importante a los efectos de los nanomateriales *in vitro* es la composición del medio de cultivo. Debido a la alta reactividad de la superficie de los nanomateriales, ésta tendrá tendencia a interactuar con los componentes del medio biológico en el que se encuentran, afectando a la interacción entre las nanopartículas y la de éstas con las células (Oberdorster et al., 2005).

En nuestro caso, por lo que respecta a las diferencias en los cultivos de las líneas celulares Caco-2 y BEAS-2B, en las primeras el medio está enriquecido con un 10% de suero, mientras que a las BEAS-2B no se le añade suero, sino que se adicionan otros compuestos químicos específicos (insulina, extracto de glándula pituitaria, factores de crecimiento, etc.). Existen diversos estudios en los que se observa que la presencia o la ausencia de suero tiene efecto en varios procesos que afectan al comportamiento de los nanomateriales en los cultivos *in vitro*. Por ejemplo, en función del tipo de nanomaterial, la presencia de suero puede incrementar o disminuir las capacidades tóxicas de éste, como se muestra en el estudio de Clift et al. (2010) en el que se observa que en nanopartículas de poliestireno de 20 nm, éstas presentaban mayor citotoxicidad en medio sin suero que cuando este se enriqueció con un 10% de suero.

La composición del medio y las características fisicoquímicas del nanomaterial están ligadas a la formación de la denominada corona proteica, que es el

conjunto de proteínas que interaccionan con la superficie del nanomaterial. Esto conlleva a que cambios en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas inorgánicas en los distintos medios biológicos sean determinantes sobre su posible impacto deletéreo. La interacción de estos nanomateriales con cualquier tipo de fluido, ya sea en un organismo (sangre, mucosidades, etc.) o en un cultivo *in vitro*, alteran la composición de esta corona proteica debido a la adsorción de las proteínas presentes, en la superficie de los nanomateriales y, por lo tanto, tendrá un papel crucial en la reactividad de los nanomateriales y en cómo se desarrolla la interacción entre éstos y las células (Casals y Puentes, 2012). Por lo tanto, la presencia o ausencia de suero (o algunos otros componentes del medio de cultivo) puede tener un efecto importante en el comportamiento de los nanomateriales, debido a la formación de coronas proteicas distintas. Este hecho se ve confirmado en el estudio de Haniu et al. (2013), en el que los autores observan que la internalización de los nanotubos de carbono en la línea BEAS-2B depende de la presencia de FBS; así, en presencia de éste existe internalización, mientras que esto no sucede si esta línea se trata en un medio sin suero. Ante estos resultados los autores postulan que la capacidad de internalizar los nanotubos no es original de esta línea celular, sino que se ve inducida por la presencia de suero en el medio de cultivo.

Al parecer, la formación de la corona proteica evoluciona desde que se incorporan los nanomateriales en el medio hasta que se alcanza un punto de equilibrio, proceso en el que varía el estado de agregación que puede ir desde un estado en el que se forman aglomerados de manera débil hasta un estado de agregación irreversible. En este punto cabe comentar que la proteína más común encontrada en los distintos tipos de cultivo es la BSA, la cual incrementa de manera significativa la biocompatibilidad de los nanomateriales (Casals et al., 2010).

5.1.1.3. Propiedades de la superficie

La carga eléctrica de la superficie de los nanomateriales parece tener un efecto directo en la formación de la corona proteica. Así, en el estudio de Mortensen et al. (2013) se modificó la superficie de un mismo tipo de SAS, obteniéndose tres tipos distintos: un tipo con carga negativa (grupos carboxilo en la

superficie, COO^-), un tipo con carga positiva (grupos amino en la superficie, $-\text{NH}_2$) y el tipo sin modificar. Al añadir estos tipos de SAS en un medio de cultivo con FBS, se analizó si la dinámica de agregación y la toxicidad se veían afectadas por la carga de la superficie. Los resultados de este estudio mostraron que la SAS con grupos carboxilo era la menos citotóxica y la que presentaba agregados más pequeños. Estos estudios confirman la importancia de la carga en el posible efecto tóxico del nanomaterial.

Los efectos de la superficie en la citotoxicidad también se han detectado en el estudio de Suresh et al. (2012), donde se observa que distintas cargas y/o distintas moléculas conjugadas en la superficie de nanopartículas de plata, del mismo tamaño y forma, afectan al perfil toxicológico de las mismas. Existen otros estudios que apuntan en la misma dirección, como el realizado por Grabowski et al. (2013), quienes investigan los efectos de los cambios en la carga eléctrica de la superficie en el potencial tóxico de nanopartículas de PLGA, (poliácido láctico-co-glicólico; un copolímero) en la línea celular de origen pulmonar A549. En dicho trabajo observan que las nanopartículas cargadas negativamente inducen una mayor expresión de factores proinflamatorios (IL-6, IL-8) ligado a una mayor internalización de éstas, aunque los efectos tóxicos son similares en todos los tipos de nanopartículas utilizados. En otro estudio (Sasidharan et al., 2011), se modificó la superficie de grafeno, mediante la funcionalización con grupos carboxilo, observándose que el grafeno sin modificar presenta una mayor citotoxicidad, posiblemente debido a su alta hidrofobicidad y a su mayor interacción con las células; en cambio, el grafeno modificado no muestra efectos citotóxicos, pese a que aparentemente es internalizado por las células.

Hay estudios en los que la superficie de los nanomateriales se modifica mediante la adición de una sustancia análoga del surfactante pulmonar. En estos casos estas modificaciones tienen un marcado efecto sobre las capacidades genotóxicas y proinflamatorias (de los nanotubos de carbono utilizados en este estudio), capacidades que se ven incrementadas de manera significativa (Gasser et al., 2012). De hecho, este tipo de adición empieza a ser una recomendación habitual en los estudios con líneas celulares originarias de pulmón (Schleh et al., 2013). Aunque el uso del surfactante puede estar justificado cuando se utiliza este tipo de células, ya que se quiere simular las

condiciones en las que se puede encontrar el nanomaterial en el sistema respiratorio, el uso de este tipo de sustancias en experimentos de toxicidad *in vitro* puede llegar a generar confusión en los resultados obtenidos, no sólo por el posible efecto genotóxico que puede llegar a tener, sino porque éste afecta de una manera no realista a la superficie de los nanomateriales (Patlolla et al., 2010). Así, aunque exista el interés en conseguir una dispersión donde las partículas se encuentren en su forma primaria, o bien en forma de agregados lo más pequeños posible (debido al interés que pueda tener la forma nanoparticulada), la adición de surfactantes puede llevar a no reflejar la verdadera naturaleza y potencial de la exposición a estos nanomateriales, llevando a un escenario de exposición no acorde con la realidad (Singh et al., 2009). Además, el uso de surfactantes podría estar añadiendo otro grado de complejidad de cara al resultado final y a su posible interpretación, a no ser que dicha adición tenga una justificación biológica clara.

Otra situación que acontece en el caso de los nanotubos de carbono, aunque también puede suceder con otras nanoestructuras, es la cantidad de impurezas que puedan tener. Durante los distintos procesos de síntesis de estos nanomateriales, se da con relativa frecuencia la incorporación de otros átomos en la estructura, como por ejemplo de Fe o Ni. En estos casos, la movilización de estos átomos al medio es posible, generando posibles efectos no dependientes del CNT utilizado. Sin embargo esta movilización puede depender de distintos factores asociados con el medio biológico en el que se encuentre, así, el pH, las proteínas, la estructura del nanotubo o el tiempo de incubación pueden ser factores que afectan a la mayor o menor liberación de estos átomos (Ge et al., 2012).

Estas interacciones complejas entre el nanomaterial y el medio biológico, puede conllevar a un incremento de la biocompatibilidad o de la bioadversidad de éstos ya que las moléculas que interaccionen con los nanomateriales pueden generar cambios en su estructura y en su capacidad de interacción con las células. Por lo tanto, la comprensión de las interacciones en la superficie de los nanomateriales es esencial para ser capaces de entender los factores que la producen y desarrollar herramientas que puedan predecir las capacidades tóxicas de un nanomaterial, en función de sus distintas propiedades como el

tamaño, forma, carga eléctrica o funcionalización de la superficie (Nel et al., 2009).

5.1.2. Interacción de los nanomateriales con los componentes de los distintos ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad

Existen distintos estudios que indican que los nanomateriales, principalmente debido a su gran relación superficie-volumen, son capaces de interactuar con distintos componentes que constituyen factores esenciales de los ensayos encaminados a generar información sobre los comportamientos de los nanomateriales. Esto es especialmente importante en los ensayos colorimétricos o fluorométricos utilizados para medir la citotoxicidad de las células en cultivos *in vitro* (Wörle-Knirsch et al., 2006). Estas interacciones se han puesto de manifiesto en el estudio de Belyanskaya et al. (2007), quienes detectaron que en función de la purificación de un SWCNT, éste era capaz de —sequestrar— el compuesto del ensayo MMT, impidiendo que éste entrara y se redujera en las células, dando lugar al formazán violeta; induciendo, por lo tanto, una aparente disminución de los valores de viabilidad observados.

Son distintos los estudios que sugieren que puede existir una interacción entre nanomateriales y diversos componentes del ensayo del cometa. En este contexto Rajapakse et al. (2013) sugieren que las nanopartículas de TiO₂ son capaces de inducir incrementos en el daño en el DNA debido a su capacidad de interactuar con el nucleóide, una vez eliminadas las membranas y el resto de las estructuras celulares durante la lisis en el ensayo del cometa, y no debido a los efectos del tratamiento en sí. Otro estudio sugiere que los restos de nanomateriales derivados del tratamiento que no han sido eliminados podrían tener la capacidad, debido a su alta reactividad, de —sequestrar— la enzima FPG e impedir que lleve a cabo su función y, por lo tanto, que se subestime el efecto genotóxico debido al daño oxidativo (Kain et al., 2012). En las imágenes de los cometas obtenidas en los tratamientos llevados a cabo en nuestros experimentos crónicos a bajas dosis, se ha podido observar como los nanomateriales utilizados están interactuando con los cometas. En este contexto, en el estudio de Kermanizadeh et al. (2013), donde se realizan varios ensayos con un panel de 10 nanomateriales distintos, se observa una gran variabilidad de la respuesta en el ensayo del cometa con FPG, siendo los

valores obtenidos en algunos casos menores a los del ensayo estándar, mientras que en otros casos los valores obtenidos son mayores, tal y como sería esperable. Así pues, estas variaciones observadas en el ensayo del cometa tras los tratamientos con nanomateriales responderían a las posibles interferencias ocasionadas por los nanomateriales.

Por lo que se refiere al ensayo de micronúcleos, hemos tenido que realizar algunos ajustes en el protocolo estándar a la hora de realizar ensayos con nanomateriales. Esto es debido, principalmente, a su naturaleza particulada. En este caso las interacciones de los distintos nanomateriales con el ensayo viene dada por la adición de citocalasina-B. La adición de este compuesto no sólo impide la citocinesis, sino que también tiene un efecto en el correcto desarrollo de la endocitosis, impidiéndola. Así, la inclusión de este compuesto al mismo tiempo que el tratamiento puede dificultar o impedir la interacción del nanomaterial con la célula (Gonzalez et al., 2011). En consecuencia, se ha adaptado el protocolo, y se añade la citocalasina-B a las 6 horas de iniciar el tratamiento, con la intención de posibilitar la internalización del material (si tiene esta capacidad) y, así, evitar posibles falsos negativos debido a la falta de interacción entre nanomaterial y célula.

5.2. ESTUDIOS DE INTERCALIBRACIÓN (*ROUND ROBIN TEST*)

Los estudios de intercalibración de una misma metodología entre distintos laboratorios en una herramienta básica a la hora de definir la bondad o no de un determinado protocolo, Estos estudios son los denominados —“validación” que son los aceptados por todas las organizaciones internacionales a la hora de aceptar criterios para regular el uso de nuevos compuestos.

En el caso del proyecto Nanogenotox, las inconcreciones de los datos obtenidos en la fase de *screening*, conllevó a la incapacidad de tomar una decisión firme e inequívoca en lo que respecta, tanto a la línea celular como al ensayo a utilizar en el estudio de intercalibración. Como consecuencia de esta incapacidad se decidió llevar a cabo el estudio con dos líneas celulares (BEAS-2B y Caco-2) y con dos de los ensayos (ensayo del cometa y ensayo de micronúcleos). La ventaja de este tipo de estudios es que el mismo tipo de estudio se realiza en distintos centros, lo que permite extraer conclusiones bastante generales sobre la replicabilidad de las metodologías propuestas. En

nuestro caso todos los grupos (12) trabajaron con los mismos nanomateriales y la mitad (6) de los grupos usaron la línea BEAS-2B, mientras que la otra mitad (6) lo hicieron con la Caco-2.

Los resultados obtenidos en el *Round Robin test*, realizado con los nanomateriales más prometedores, han mostrado que en algunos casos hemos podido detectar inducción de genotoxicidad. Así, en el ensayo de micronúcleos realizado en nuestro laboratorio, dos de los nanomateriales, el NM110 y el NM403 (ZnO y CNT) han dado un resultado positivo mientras que con el NM203 se obtuvo un resultado equívoco. Por otra parte, el NM102 presentó un resultado positivo en el ensayo del cometa. Si consideramos el resultado global, obtenido en todos los laboratorios participantes, se observa una importante variabilidad, entre grupos, en lo que se refiere a los resultados obtenidos, siendo pocos los casos en los que se ha alcanzado una unanimidad. Esto únicamente ha sucedido al detectar los efectos positivos del ZnO en la línea Caco-2 en el ensayo de micronúcleos, junto con la casi unanimidad obtenida en los resultados positivos obtenidos con TiO₂, en la línea BEAS-2B, cuando se utilizó el ensayo del cometa.

Una posible explicación de la disparidad observada entre los resultados obtenidos puede atribuirse a que los efectos genotóxicos reales generados por los nanomateriales son muy leves, lo que haría que fueran difíciles de detectar y, como consecuencia del error muestral, pudiera haber resultados cercanos a la significación estadística que, debido a la variación experimental, pudieran caer en algunos casos en el lado positivo y en otros en el lado negativo.

En consecuencia la metodología utilizada no ha sido validada a causa de la ausencia de tendencias claras y contrastables del conjunto de resultados obtenidos.

A la hora de interpretar los resultados obtenidos en el ensayo de intercalibración, aparte de los posibles factores de confusión que se pueden dar en los ensayos *in vitro* discutidos anteriormente, en el caso particular del *Round Robin test* nos encontramos con otra serie de factores que pueden afectar a la robustez y homogeneidad de los resultados obtenidos, tal y como se comenta a continuación.

5.2.1. Consideraciones a tener en cuenta en los estudios de intercalibración entre laboratorios

A nivel logístico, uno de los problemas principales puede ser el uso de diferentes equipamientos en cada laboratorio, en nuestro caso específicamente el sonicador: Cada institución ha usado el propio que ya existía en el laboratorio con la excepción de aquellos que no lo tenían y se acordó que utilizaran el Branson Sonifier D450. El problema radica en que distintos sonicadores aplican distintas cantidades de energía a la muestra, pudiendo afectar al grado de dispersión de ésta. Por otra parte, el tipo de sonicación, realizada en un sistema abierto, puede conllevar a que ligeros cambios en la manera de proceder en el laboratorio induzcan variaciones entre las muestras dispersadas. Así, un mal ajuste de la profundidad de la sonda, o que ésta toque las paredes del vial, conllevará que la energía se disipe, afectando menos a la muestra y, por lo tanto, a su grado de dispersión y, en consecuencia, al tamaño de los agregados. Por lo tanto, el uso de sonicadores distintos y algunos pequeños cambios en el procedimiento de dispersión pueden conllevar que el estado de dispersión de la solución stock sea ligeramente distinto entre laboratorios, pudiendo ser éste un factor que contribuya a la disparidad de los resultados. Algunos autores han postulado que un factor a tener en cuenta es la cantidad de energía aplicada por unidad de tiempo y, siendo conscientes de la disparidad de los instrumentos utilizados para la dispersión entre distintos laboratorios, proponen que éstos sean calibrados entre diferentes grupos mediante la cuantificación de los incrementos calorimétricos como indicador de la energía aplicada a la muestra, y en consecuencia, ajustar el tiempo (Taurozzi et al., 2010; 2012).

5.3. EXPERIMENTOS CRÓNICOS

En los estudios *in vitro* existe una tendencia a utilizar concentraciones muy altas para determinar con que concentración los nanomateriales empiezan a inducir efectos deletéreos. En muchos casos esto supone utilizar concentraciones muy altas aunque, en los escenarios de exposición reales, es imposible que se den este tipo de condiciones. Por lo tanto parece más realista la utilización de bajas dosis y llevar a cabo esta exposición de manera crónica más que aguda. Así, el hecho de que sean tratamientos continuados a lo largo

del tiempo también es una condición más realista que la aplicación de una sola dosis en un periodo de exposición corto. Ligado a este hecho, y tratando con nanomateriales, la cantidad y volumen de los agregados será menor a bajas dosis que a dosis más elevadas, debido a la menor interacción entre las propias partículas del nanomaterial. Por lo tanto, el uso de concentraciones bajas puede tener una serie de ventajas, principalmente derivadas de su mayor adecuación a las concentraciones que puedan suceder en un escenario de exposición realista. Esto es muy importante si queremos obtener información que sea relevante en términos de riesgo.

5.3.1. Genotoxicidad e internalización

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos en los estudios de la internalización del NM102, hemos visto que en el ensayo de DCFH-DA se observa una fuerte internalización del TiO_2 , ya a las 24 horas de tratamiento, llegando a aumentos sensibles de ésta a las tres semanas de exposición (ambos aspectos confirmados por las imágenes del TEM). Es probable que cuando los niveles de internalización ya son altos, debido a la exposición continuada, las sucesivas divisiones celulares hacen que los endosomas se separen entre las células hijas, incrementando la concentración celular. Aunque no se tiene información sobre el destino del contenido de estos endosomas, el ensayo de DCFH-DA muestra que no hay incremento de ROS intracelular, acorde con los resultados obtenidos en el ensayo del cometa. Por lo tanto, hemos observado en este caso que la internalización *per se*, no supone riesgo genotóxico, ya que dependerá de las características genotóxicas del compuesto en cuestión.

Una situación opuesta la tenemos con los nanotubos de carbono. Con este nanomaterial los resultados del ensayo DCFH-DA muestran que no hay internalización importante de los mismos, aunque en algunas de las imágenes obtenidas así lo parece. La medición de la internalización en el ensayo de DCFH-DA se basa en la diferencia de densidad entre las células, que genera una refracción del láser. En las imágenes obtenidas se puede observar que la cantidad de nanotubos en los lisosomas es baja, no sólo en cuanto al número, sino también debido a que estos nanotubos son huecos por dentro y, por lo tanto, tienen baja densidad. A pesar de la baja internalización, en este ensayo

hemos detectado una gran cantidad de ROS generada en el interior de las células tratadas con este nanomaterial.

Así, los resultados obtenidos en los experimentos crónicos a bajas dosis muestran que los dos nanomateriales se comportan de manera distinta por lo que respecta a la inducción de efectos genotóxicos; así, en el caso del TiO_2 , éste no induce genotoxicidad, ya sea daño primario en el DNA o inducción de micronúcleos. La falta de inducción de daño genotóxico por parte del TiO_2 sorprende cuando se comparan con los resultados de internalización, donde se ha observado que una cantidad significativa de este nanomaterial es capaz de entrar en las células. Por otra parte, los nanotubos de carbono son capaces de inducir incrementos en la frecuencia de micronúcleos en todos los tiempos ensayados aunque, fundamentalmente, con la concentración más alta utilizada. La persistencia de esta inducción indica que, a pesar de que los micronúcleos formados son eliminados o se pierden a medida que las células se van dividiendo, el tratamiento crónico supone la inducción continua de roturas cromosómicas, o alteraciones en el núcleo, que se transforman en micronúcleos. Para este compuesto, la inducción de ROS podría explicar los niveles de daño observado, en clara contraposición con los resultados obtenidos en el ensayo del cometa, donde no hay inducción de daño, tampoco del tipo oxidativo. Aunque algunos autores han postulado que los nanotubos pueden inducir alteraciones cromosómicas mediante la interacción de éstos con el cinetocoro durante la mitosis (Sargent et al., 2012), no se han hecho estudios de FISH para corroborar esta hipótesis y discriminar si los micronúcleos observadas se han ocasionado por roturas o por aneuploidías.

5.3.1.1. Desventajas del TEM y del ensayo DCFH-DA para la medición de la internalización.

Aunque la utilización de TE; es una herramienta estándar en los estudios de internalización de los nanomateriales, la visualización por TEM puede dar lugar a imágenes no representativas de la realidad. Así, por ejemplo, en la observación de los nanotubos de carbono, se observan que estos tienen tendencia al enmarañamiento; pero si tenemos en cuenta el procedimiento utilizado, que consiste en depositar una gota y secarla, en realidad estamos obteniendo una visualización en dos dimensiones de una situación en tres

dimensiones. Aunque la visualización de la interacción de los nanomateriales con las células se puede observar en cortes concretos, éstos se hacen al azar sin que se pueda obtener una secuencia especial de los cortes. Esto se podría solucionar mediante otras técnicas microscópicas como la microscopia hiperespectral que es capaz de visualizar distintos planos en el interior de la célula. Por lo que se refiere a la técnica de DCFH-DA, aunque esta técnica puede no ser la más adecuada para medir la internalización de algunos nanotubos, sí que se puede considerar como una técnica complementaria a otras más potentes como puede ser el TEM. De todas maneras, aunque la internalización es una información básica que se requiere conocer a la hora de evaluar un nanomaterial, su internalización (como sucede con el TiO₂) no siempre supone riesgo genotóxico. Sin embargo, la falta de internalización podría (en algunos casos) explicar la falta de efectos genotóxicos.

5.3.2 Expresión de factores proinflamatorios

En la determinación de los niveles de expresión de las distintas interleucinas estudiadas (IL-1 β , IL-6 y IL-8), se ha observado que no existen cambios significativos tras las exposiciones al compuesto NM102 durante 4 semanas, mientras que tras el mismo tiempo de tratamiento, el compuesto NM403 induce una disminución muy significativa de la expresión, respecto al control, en los tres tipos de interleucinas. Generalmente los estudios sobre cambios en la expresión de interleucinas se han realizado en células del sistema inmunitario ya que son más sensibles a los estímulos capaces de inducir este tipo de respuestas. Por ejemplo, el estudio de Murphy et al. (2012) demuestra que tras la exposición a distintos tipos de nanotubos de carbono no hay incrementos en la expresión de las mismas en la línea Met-5A, aunque esto sí que sucede en la línea THP-1 (línea de monocitos humanos) cuando éstos son expuestos a nanotubos de carbono largos. Cuando la línea Met-5A se expone a medio de THP-1 condicionado por la exposición a estos nanotubos, también se observan incrementos de la secreción de las interleucinas estudiadas. Cuando se comparan nuestros resultados con los obtenidos en el estudio de Wang et al. (2013), en el que se exponen células de la línea SAECs (*small airway epithelial cells*) durante 6 meses a distintas concentraciones muy bajas de nanotubos de carbono y amianto, se observa que las capacidades inflamogénicas de estos

dos compuestos es muy distinta; así, mientras que el amianto induce una sobreexpresión muy elevada de todas las interleucinas estudiadas, tras los tratamientos con nanotubos de carbono existe una disminución significativa de la expresión de estos factores respecto al control para IL-8 y IL-1 β (donde observan una disminución importante de la actividad de la vía NF- κ B). Así, los resultados que hemos obtenidos son coherentes con este estudio de exposición crónica con bajas dosis. Es muy interesante recalcar que estos autores observan una inducción de la iniciación tumoral de estos compuestos (amianto y nanotubos de carbono), indicando que las vías de señalización activadas por las cuales generan estos efectos, son distintas en función del compuesto, lo que supone mecanismos distintos.

5.3.3. Potencial transformante de los nanomateriales

Hay que recordar que la genotoxicidad es un marcador de potencialidad carcinogénica para aquellos carcinógenos que actúan por la vía genotóxica. Sin embargo, resultados negativos en un ensayo de genotoxicidad no supone ausencia de riesgo carcinogénico, ya que existen carcinógenos que actúan mediante una vía no-genotóxica, afectando a los procesos de promoción más que a los procesos de inducción. Así, para evitar falsos negativos se requieren marcadores *in vitro* que detecten transformación celular. En este contexto, los resultados obtenidos en el ensayo del *soft-agar* después de 4 semanas de tratamiento, muestran que los nanotubos de carbono son capaces de inducir incrementos en el número de células capaces de crecer sin anclaje (marcador ligado a la promoción tumoral). Esto se ha observado con dos de las concentraciones utilizadas, incluyendo la más baja de 1 μ g/mL. En nuestro caso, este incremento se podría explicar por la capacidad de este nanomaterial de inducir daño genotóxico, como observamos en el ensayo de micronúcleos. Por tanto, la inducción continuada de daño genotóxico puede estar ligada a este proceso de transformación celular detectado.

En el estudio reciente, ya comentado (Wang et al., 2013), realizado con dosis subtóxicas (1 μ g/mL) de nanotubos de carbono y amianto (crocidolita) tratando de forma crónica durante 6 meses cultivos de células humanas (SAEC), se ha observado que la capacidad de inducción de la iniciación tumoral es muy alta, incluso superior a la del amianto, considerado como control positivo. Esta

inducción estaría en consonancia con los resultados que nosotros hemos obtenido en nuestro tratamiento de 4 semanas, sugiriendo que quizás el mecanismo por el cual se induce esta transformación celular es el mismo.

Hay que tener en cuenta que, *in vivo*, la capacidad de los nanotubos de carbono para inducir efectos similares a los del amianto va a depender de su capacidad para formar agregados en forma de fibra (similares estructuralmente al amianto) en lugar de agregados amorfos (Osmond-McLeod et al., 2011).

Por lo que sucede en los tratamientos con TiO_2 , pese a que muestran una tendencia a incrementar el número de colonias, ninguno de los efectos observados consigue alcanzar la significación estadística. Nuestros resultados no parecen coincidir con lo encontrado en el estudio de Huang et al. (2009), donde también investigan los efectos de tratamientos crónicos con TiO_2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estos autores sí que observaron incrementos de la capacidad transformante de dos tipos celulares distintos, NIH-3T3 (fibroblastos de ratón) y HFW (fibroblastos humanos). Ambas líneas crecen en medio con 10% de FBS y el ensayo se llevó a cabo tras 11 semanas de tratamiento. De manera distinta a lo encontrado por nosotros estos autores también encuentran incrementos en la frecuencia de micronúcleos, ya en la tercera semana de tratamiento. Los autores postulan que este incremento en la frecuencia de micronúcleos puede deberse al incremento de aberraciones cromosómicas numéricas provocado por la interferencia de estas nanopartículas con el huso mitótico, aunque no llevaron a cabo ningún ensayo de FISH para demostrar tal hipótesis. Concordando con los efectos genotóxicos observados en su estudio, los autores también detectan la inducción de ROS en los cultivos tratados con TiO_2 , a diferencia de lo que nosotros hemos detectado.

5.4. CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO EN EL ANÁLISIS DEL POTENCIAL TOXICOLÓGICO DE LOS NANOMATERIALES

Como ya hemos indicado en distintos puntos, el proyecto Nanogenotox se engloba dentro de los esfuerzos llevados a cabo para ampliar el conocimiento sobre las capacidades tóxicas de los nanomateriales, con el objetivo de desarrollar una metodología robusta para caracterizar su potencial de manera rápida y eficiente, que sirva para establecer un marco regulatorio acorde a las nuevas propiedades de estos compuestos. Dentro de este contexto se ha

intentado obtener un protocolo de dispersión universal y determinar su potencial como herramienta en la determinación del potencial tóxico de los nanomateriales. El hecho de no haber conseguido resultados claros puede ser tanto resultado de las metodologías utilizadas como de que los nanomateriales utilizados no sean compuestos altamente genotóxicos. De todas maneras, existen toda una serie de aspectos que pueden influir en los resultados obtenidos, tal y como se comenta a continuación.

5.4.1. El dilema de la dosis métrica

En nuestro proyecto hemos usado la masa como dosis métrica ya sea en $\mu\text{g/mL}$ o en $\mu\text{g/cm}^2$, por volumen o área, tal como es habitual en la mayor parte de los estudios llevados a cabo hasta ahora. Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, en el *Round Robin test* fue necesario ajustar los volúmenes usados entre laboratorios para que la relación fuera la misma en todos ellos. Actualmente existen varios autores que sostienen que ésta no es la dosis métrica adecuada para medir las concentraciones de nanomateriales utilizadas en ensayos de toxicidad.

Así, estudios como el de Duffin et al. (2007), en el que se utilizaron cantidades iguales en masa de distintos nanomateriales (con muy baja toxicidad y diferentes tamaños) para llevar a cabo tratamientos en ratones, observaron que los nanomateriales que presentaban una mayor capacidad inflamatoria eran los que tenían un área de superficie específica (área de superficie por unidad de masa) más elevada, remarcando la importancia de la relación entre la superficie, la dosis y la reactividad de los nanomateriales.

Otros autores (Pompa et al., 2011) después de realizar tratamientos en *Drosophila melanogaster* con nanopartículas de oro de diferentes tamaños, sugieren que el parámetro clave en la toxicidad de estas nanopartículas radica en el número total de las mismas, y proponen este parámetro (número de nanopartículas) como el más adecuado para determinar las concentraciones de nanomaterial.

En cambio, se encuentran otros autores que contradicen que la superficie específica o el número de partículas sean los parámetros adecuados para la medición de la concentración y proponen que la superficie total disponible o la

masa con medidas adecuadas sea el parámetro de elección (Murray et al., 2012).

Otro problema añadido es la determinación de la dosis que interacciona con las células. Aunque la mayoría de estudios no realizan experimentos para determinarla, si que empiezan a aparecer estudios proponiendo nuevas metodologías para realizar esta medición (Cohen et al., 2013).

Como se observa de todo lo indicado, la comunidad científica todavía no ha llegado a un consenso respecto a que parámetro dosimétrico es el más realista en las exposiciones a nanomateriales. Con las condiciones cambiantes de la mayoría de ellos, a lo largo de un tiempo de tratamiento, es importante que podamos ser capaces de identificar qué cambios en los parámetros influyen en la toxicidad u otros efectos deletéreos. La propuesta de metodologías complejas puede suponer que la mayoría de laboratorios sean incapaces de poderlas llevar a cabo, ya que requieren instrumental muy específico. Esto puede suponer una dificultad añadida a las intenciones de encontrar un método sencillo, rápido y efectivo para determinar el potencial tóxico de los nanomateriales.

5.4.2. La relevancia de la sonicación en las propiedades de los nanomateriales

El desarrollo de nuestros experimentos ha requerido la dispersión previa de los nanomateriales utilizados, con la intención de que éstos se encontraran en su forma más cercana a la partícula primaria. Para ello se ha realizado la sonicación de éstos en medio de dispersión. Hay que comentar que ésta es una actividad ampliamente recomendada en todos los protocolos que utilizan nanomateriales. Como se ha comentado anteriormente, pese a que la sonicación es un método muy eficaz para individualizar los nanomateriales evitando aglomeraciones, también puede resultar un proceso agresivo, ya que se aplica una gran cantidad de energía a las muestras. Por ello, existe la posibilidad de que se incremente la disolución de algunos nanomateriales, como puede suceder en el caso de las nanopartículas metálicas, como las de ZnO. En el estudio de Aruoja et al. (2009), se observó que diferentes tipos de ZnO (micrométrico, nanométrico e iónico) presentan una citotoxicidad similar en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* después de que se dispersaran en

el medio, mediante sonicación durante 30 minutos. Los autores postulan que esta similitud puede ser debida al paso (solubilización) de la forma nanoparticulada a la forma iónica, ya que detectaron importantes incrementos de esta forma en la dispersión del ZnO, tanto micro como nanométrica.

Otro ejemplo similar se puede encontrar con los SAS, con los que se ha observado que la solubilización en medio acuoso puede suceder de manera espontánea (Diedrich et al., 2012) y, posiblemente, este proceso se podría ver acelerado en nuestro caso al aplicar la sonicación durante el protocolo de dispersión, tal como sucede con algunas nanopartículas metálicas, como se ha comentado anteriormente.

La sonicación del nanomaterial no sólo puede tener un efecto en la solubilización del compuesto, sino también en su estructura. En las imágenes obtenidas por TEM de los distintos nanotubos de carbono, se ha observado que dentro de la misma muestra existe una importante variabilidad por lo que se refiere a la longitud de los mismos, así como que varios de ellos parecen haber sufrido daños a nivel estructural. Además, en las imágenes observadas mediante TEM sobre la interacción de los nanomateriales con las células, se han tomado imágenes de la endocitosis de nanotubos de carbono que también presenta el aparente daño estructural. En el estudio de Brown et al. (2007) en el que se investiga el papel de la longitud de los nanomateriales y la fagocitación incompleta, se sonicaron los nanotubos de carbono a muy baja energía, precisamente para evitar el acortamiento de éstos por rotura. De todas maneras, el acortamiento o rotura podría facilitar la internalización y producir efectos difíciles de observar con nanotubos de carbono de mayores longitudes. Otro punto de interés es el uso de BSA en el protocolo para mantener la estabilidad de la dispersión. Como ya se ha comentado, la presencia de suero en el medio de cultivo puede tener efectos en el comportamiento de los nanomateriales. Estudios como el de Das et al. (2012), muestran que la conjugación de BSA en la superficie de la nanopartícula puede disminuir su toxicidad. En dicho estudio, se conjugan distintas biomoléculas (ácido aspártico, citrato trisódico dihidrato y BSA) en la superficie de nanopartículas de oro, no presentando toxicidad las nanopartículas conjugadas con BSA, al tiempo que presentan una mayor estabilidad, mientras que las otras son menos estables y más tóxicas. Este hecho levanta sospechas sobre la posibilidad de

que, como norma general, la adición de BSA sea capaz de enmascarar los nanomateriales o bien modificar la interacción con las células.

5.4.3. La relevancia de los ensayos *in vitro*

Aunque está claro que los estudios *in vitro* no mimetizan a los estudios *in vivo*, son la herramienta menos mala de las que disponemos para determinar de una manera rápida y económica, y sin utilizar animales, el comportamiento tóxico/genotóxico de los nanomateriales bajo estudio. El hecho de sus aparentes ventajas, no nos debe hacer olvidar sus limitaciones. Así, casi la totalidad de los ensayos realizados *in vitro* se realizan en células sumergidas en un medio de cultivo y esta situación no es en la que se encuentran las células que forman parte de las barreras fisiológicas, que son las más susceptibles de interactuar con los nanomateriales. El establecimiento de este tipo de experimentos *in vitro* clásicos conlleva que los nanomateriales entren en contacto con un medio biológico más representativo del torrente sanguíneo (o de una exposición global) que no de las barreras fisiológicas, añadiendo más complejidad al sistema. La calidad o estabilidad de la dispersión y las distintas velocidades de sedimentación (influenciados por la composición del medio), pueden afectar a la capacidad de internalización de los materiales *in vitro* (Kato et al., 2010). En cambio, otros estudios recalcan que el efecto del tratamiento con nanomateriales dispersados mediante sonicación *in vitro* en realidad está incrementado de manera artificial lo que sucede en las exposiciones *in vivo*. Esto es debido al efecto de la rápida formación de agregados, la sedimentación de éstos en el medio líquido y al movimiento browniano que presentan en el fondo, incrementando hasta 1000 veces la probabilidad del contacto nanomaterial-célula. Otros autores postulan que parte del efecto observado en los estudios *in vitro* puede ser debido a fenómenos de saturación, impidiendo a la célula desarrollar sus funciones de manera normal (Wittmaack, 2011).

Actualmente se están empezando a desarrollar distintas alternativas en las que los cultivos *in vitro* se someten a exposiciones en interfases aire-líquido (donde las células están en contacto con el medio de crecimiento por su parte basal), ya que pueden ser más representativas de las exposiciones que se dan *in vivo*. En un estudio reciente (Raemy et al., 2012) se compara este método, tratando las células con aerosoles de nanopartículas de ZnO, con el tratamiento de

células sumergidas tratadas con una cantidad equivalente de nanomaterial. En este estudio se observaron patrones divergentes en las relaciones dosis-respuesta, así como en los tiempos de tratamiento, ya que los efectos se muestran a las 4 horas en los tratamientos en interfase aire-líquido requiriendo de 24 horas cuando las células se tratan sumergidas en el medio.

5.4.4. La correlación entre los ensayos *in vivo* e *in vitro*

Para poder dar un valor predictivo a los ensayos *in vitro*, cuando se trabaja con nanomateriales, es necesario que haya una buena correlación con los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*. Debido a la gran cantidad de factores que pueden influenciar el resultado, en general esta correlación es pobre. Estudios diseñados para determinar esta correlación recalcan la necesidad de desarrollar y estandarizar los ensayos *in vitro* para poder validarlos con los ensayos *in vivo* (Sayes et al., 2007). Aunque son muy pocos los estudios que enfocan este problema cuando se utilizan nanomateriales, sí que en algunos casos específicos parece existir una buena correlación entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, como en el caso del estudio de Ghosh et al. (2012), para el ensayo del cometa en linfocitos humanos, en *Allium cepa* y en ratones con nanopartículas de plata.

Así, sin negar la validez de los ensayos *in vitro* actuales, para que los resultados con dichos ensayos sean fiables y se puedan usar para realizar valoraciones robustas del potencial genotóxico de los nanomateriales es esencial ir desarrollando estrategias y proporcionando nuevas metodologías para adaptar los actuales ensayos *in vitro* para que sean más predictivos de los efectos esperados *in vivo*.

5.4.5. Perspectivas de futuro

Las dificultades encontradas en el proyecto Nanogenotox para encontrar un ensayo / protocolo lo suficientemente robusto para determinar el riesgo genotóxico de los nanomateriales indica que el análisis del potencial tóxico de éstos es muy complejo, posiblemente debido a la gran cantidad de factores de confusión existentes, debido a las propiedades intrínsecas de los mismos. Al tiempo que apreciamos estas dificultades, hay que ser consciente de la urgencia existente de poder evaluarlos de la manera más adecuada posible,

debido a la gran cantidad de materiales con estas características que existen en el mercado y al crecimiento exponencial que presentan en su producción/uso. Para desarrollar nuevas mejoras en los ensayos existentes existen dos tendencias que se están desarrollando a la vez.

La primera consistiría en, mediante el uso de nanomateriales de referencia (como ya sucede en la mayoría de proyectos europeos, donde los nanomateriales son suministrados por el JRC), estudiar los parámetros que presentan en los ensayos *in vitro* clásicos (para determinar su peso e influencia), y ligarlos a los efectos de estos nanomateriales *in vivo*. Esta aproximación podría permitir el desarrollo de métodos *in silico* como herramientas predictivas. (Mekenyan et al., 2011).

La segunda consistiría en desarrollar los ensayos *in vitro* de tal manera que reproduzcan de la manera más fiable posible las condiciones de exposición que pueden suceder *in vivo*, no sólo por lo que se refiere a la interacción nanomaterial-célula (tal como la implementación de la interfase aire-líquido), sino también en las condiciones de exposición en las que se encuentre el nanomaterial en la realidad (en forma de aerosol, integrado en una matriz, etc.). En este contexto cabría nuestra propuesta de llevar a cabo estudios crónicos con dosis bajas, relevantes en términos de las exposiciones a las que se puede encontrar expuestos determinados sectores de la población humana.

6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos inicialmente planteados, y como fruto de la discusión de los resultados obtenidos, en esta Tesis se ha llegado a las siguientes conclusiones:

-Respecto a los estudios de prevalidación y validación, ligadas directamente a los objetivos del proyecto Nanogenotox.

1. La fase de *screening* no ha arrojado resultados claros sobre que nanomateriales, células o ensayos son más sensibles a la hora de detectar genotoxicidad. Esto puede ser debido a la poca potencialidad genotóxica de los nanomateriales, o a posibles factores de confusión relacionados con la propia naturaleza de los materiales.
2. La fase de validación (*Round Robin test*) no ha servido para validar, de manera inequívoca los protocolos propuestos para detectar la genotoxicidad de los nanomateriales. La variabilidad observada entre laboratorios hace dudar si el método de dispersión utilizado es el más adecuado para llevar a cabo estos ensayos.
3. A pesar de lo anterior, los resultados del proyecto Nanogenotox cabe considerarlos muy útiles a la hora de proponer como llevar a cabo estudios de genotoxicidad con los nanomateriales.

-Respecto a la propuesta de utilizar experimentos crónicos para detectar procesos genotóxicos y carcinogénicos de los nanomateriales.

4. Los nanotubos de carbono son capaces de inducir incrementos en la frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas a bajas dosis y tiempos de tratamiento largos, mientras que las nanopartículas de dióxido de titanio no muestran dicha capacidad.
5. La exposición durante tres semanas a nanotubos de carbono indica que éstos son capaces de inducir incrementos en los niveles de ROS y, en consecuencia, incrementos en la expresión de hemooxigenasa-1. Por el contrario, los tratamientos con dióxido de titanio han producido resultados

negativos tanto en el ensayo del cometa como en la inducción de ROS y en la expresión de la hemooxigenasa-1.

6. La exposición durante 3 semanas a nanotubos de carbono conduce a la disminución significativa de la expresión de factores proinflamatorios. Aspecto que no sucede con la exposición a dióxido de titanio.
7. Finalmente, hemos demostrado que la exposición crónica a nanotubos de carbono es capaz de inducir desdiferenciación celular y, por lo tanto, procesos de iniciación tumoral, actividad no demostrada con las nanopartículas de dióxido de titanio, pese a mostrar una tendencia a inducir incrementos en los niveles de colonias que crecen en el medio semilíquido (*soft-agar*).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aranda, A., Sequedo, L., Tolosa, L., Quintas, G., Burello, E., Castell, J.V., and Gombau, L. (2013). Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol. In Vitro* 27, 954–963.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., and Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1461–1468.
- Asati, A., Santra, S., Kaittanis, C., and Perez, J.M. (2010). Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano* 4, 5321–5331.
- Baalousha, M. (2009). Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Sci. Total Environ.* 407, 2093–2101.
- Barnard, R.M. (2012). Flow cytometry: a flexible tool for biomarker research. *Bioanalysis* 4, 2471–2483.
- Barnes, C.A., Elsaesser, A., Arkusz, J., Smok, A., Palus, J., Le. niak, A., Salvati, A., Hanrahan, J.P., Jong, W.H. de, Dziubałtowska, E., et al. (2008). Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity. *Nano Lett.* 8, 3069–3074.
- Baroli, B., Ennas, M.G., Loffredo, F., Isola, M., Pinna, R., and Lopez-Quintela, M.A. (2007). Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1701–1712.
- Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P., Bruinink, A., and Wick, P. (2007). The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction. *Carbon* 45, 2643–2648.
- Bianco, A., Kostarelos, K., and Prato, M. (2011). Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chem. Commun.* 47, 10182–10188.

- Binning, G., Rohrer, H., Gerber, C., and Weibel, E. (1982). Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 49, 57–60.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., et al. (2006). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28, 625–631.
- Brezová, V., Gabčová, S., Dvoranová, D., and Staško, A. (2005). Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). *J. Photochem. Photobiol. B* 79, 121–134.
- Brown, D.M., Kinloch, I.A., Bangert, U., Windle, A.H., Walter, D.M., Walker, G.S., Scotchford, C.A., Donaldson, K., and Stone, V. (2007). An *in vitro* study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon* 45, 1743–1756.
- Casals, E., and Puentes, V.F. (2012). Inorganic nanoparticle biomolecular corona: formation, evolution and biological impact. *Nanomed.* 7, 1917–1930.
- Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G.J., and Puentes, V. (2010). Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano* 4, 3623–3632.
- Catalán, J., Järventaus, H., Vippola, M., Savolainen, K., and Norppa, H. (2011). Induction of chromosomal aberrations by carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles in human lymphocytes *in vitro*. *Nanotoxicology* 6, 825–836.
- Cavallo, D., Fanizza, C., Ursini, C.L., Casciardi, S., Paba, E., Ciervo, A., Fresegna, A.M., Maiello, R., Marcelloni, A.M., Buresti, G., et al. (2012). Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial cells. *J. Appl. Toxicol.* 32, 454–464.
- Clift, M.J.D., Bhattacharjee, S., Brown, D.M., and Stone, V. (2010). The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 198, 358–365.

-
- Cohen, J., DeLoid, G., Pyrgiotakis, G., and Demokritou, P. (2013). Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for *in vitro* dosimetry. *Nanotoxicology* 7:4, 417-431.
 - Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
 - Cozens, A.L., Yezzi, M.J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., and Gruenert, D.C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 38–47.
 - Cronholm, P., Karlsson, H.L., Hedberg, J., Lowe, T.A., Winnberg, L., Elihn, K., Wallinder, I.O., and Möller, L. (2013). Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small* 9, 970–982.
 - Das, S., Debnath, N., Mitra, S., Datta, A., and Goswami, A. (2012). Comparative analysis of stability and toxicity profile of three differently capped gold nanoparticles for biomedical usage. *Biometals* 25, 1009–1022.
 - De Rosa, S., and Roederer, M. (2001). Eleven-color flow cytometry. A powerful tool for elucidation of the complex immune system. *Clin. Lab. Med.* 21, 697–712.
 - Di Giorgio, M.L., Bucchianico, S.D., Ragnelli, A.M., Aimola, P., Santucci, S., and Poma, A. (2011). Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 722, 20–31.
 - Diedrich, T., Dybowska, A., Schott, J., Valsami-Jones, E., and Oelkers, E.H. (2012). The dissolution rates of SiO₂ nanoparticles as a function of particle size. *Environ. Sci. Technol.* 46, 4909–4915.
 - Donaldson, K. (2002). Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal. Toxicol.* 14, 5–27.

- Duan, J., Yu, Y., Li, Y., Yu, Y., Li, Y., Zhou, X., Huang, P., and Sun, Z. (2013). Toxic Effect of silica nanoparticles on endothelial cells through DNA damage response via chk1-dependent G2/M checkpoint. *PLoS ONE* 8, e62087.
- Duffin, R., Tran, L., Brown, D., Stone, V., and Donaldson, K. (2007). Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles *in vivo* and *in vitro*: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhal. Toxicol.* 19, 849–856.
- Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C.M., Andersson, P.O., Lejon, C., Österlund, L., and Bucht, A. (2011). Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology* 6, 623–634.
- Ema, M., Imamura, T., Suzuki, H., Kobayashi, N., Naya, M., and Nakanishi, J. (2012a). Evaluation of genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in a battery of *in vitro* and *in vivo* assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 188–195.
- Ema, M., Masumori, S., Kobayashi, N., Naya, M., Endoh, S., Maru, J., Hosoi, M., Uno, F., Nakajima, M., Hayashi, M., et al. (2012b). *In vivo* comet assay of multi-walled carbon nanotubes using lung cells of rats intratracheally instilled. *J. Appl. Toxicol.* DOI: 10.1002/jat.2810.
- Falck, G., Lindberg, H., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., and Norppa, H. (2009). Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Hum. Exp. Toxicol.* 28, 339–352.
- Fenech, M., and Morley, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 147, 29–36.
- Ferry, J.L., Craig, P., Hexel, C., Sisco, P., Frey, R., Pennington, P.L., Fulton, M.H., Scott, I.G., Decho, A.W., Kashiwada, S., et al. (2009). Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nat. Nano.* 4, 441–444.

-
- Foss Hansen, S., Maynard, A., Baun, A., and Tickner, J.A. (2008). Late lessons from early warnings for nanotechnology. *Nat. Nano.* 3, 444–447.
 - Freeman, W., Walker, S., and Vrana, K. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26, 112–122, 124–125.
 - Fröhlich, E., and Roblegg, E. (2012). Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology* 291, 10–17.
 - Gartia, M.R., Hsiao, A., Pokhriyal, A., Seo, S., Kulsharova, G., Cunningham, B.T., Bond, T.C., and Liu, G.L. (2013). Colorimetric plasmon resonance imaging using nano lycurgus cup arrays. *Adv. Opt. Mater.* 1, 68–76.
 - Gasser, M., Wick, P., Clift, M., Blank, F., Diener, L., Yan, B., Gehr, P., Krug, H., and Rothen-Rutishauser, B. (2012). Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential *in vitro*. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 17.
 - Ge, C., Li, Y., Yin, J.-J., Liu, Y., Wang, L., Zhao, Y., and Chen, C. (2012). The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. *NPG. Asia Mater.* 4, e32.
 - Gehrke, H., Frühmesser, A., Pelka, J., Esselen, M., Hecht, L.L., Blank, H., Schuchmann, H.P., Gerthsen, D., Marquardt, C., Diabaté, S., et al. (2013). *In vitro* toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology* 7, 274–293.
 - Ghosh, M., J, M., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S.K., Bandyopadhyay, M., and Mukherjee, A. (2012). *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 749, 60–69.
 - Gonzalez, L., Sanderson, B.J.S., and Kirsch-Volders, M. (2011). Adaptations of the *in vitro* MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis* 26, 185–191.
 - Grabowski, N., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Santiago, L.A., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., Tsapis, N., and Fattal, E. (2013) Toxicity of surface-

modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *Int. J. Pharm.* DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.05.025.

- Guidi, P., Nigro, M., Bernardeschi, M., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Onida, B., Mortera, R., and Frenzilli, G. (2013). Genotoxicity of amorphous silica particles with different structure and dimension in human and murine cell lines. *Mutagenesis*. DOI: 10.1093/mutage/ges068
- Handy, R., Owen, R., and Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17, 315–325.
- Haniu, H., Saito, N., Matsuda, Y., Tsukahara, T., Maruyama, K., Usui, Y., Aoki, K., Takanashi, S., Kobayashi, S., Nomura, H., et al. (2013). Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicol. In Vitro* 27, 1679–1685.
- Haruta, M. (2003). Catalysis and applications of gold nanoparticles. In *science and technology in catalysis 2002 Proceedings of the fourth tokyo conference on advance catalytic science and technology*, (Elsevier), pp. 31–38.
- Hosokawa, M., Naito, M., Yokoyama T.U. (2008). 25 - Development of new cosmetics based on nanoparticles. In *nanoparticle technology handbook*, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 521–527.
- Howard, J.B., Lafleur, A.L., Makarovsky, Y., Mitra, S., Pope, C.J., and Yadav, T.K. (1992). Fullerenes synthesis in combustion. *Spec. Issue Fullerenes* 30, 1183–1201.
- Huang, X., and El-Sayed, M.A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.* 1, 13–28.
- Huang, S., Chueh, P.J., Lin, Y.-W., Shih, T.-S., and Chuang, S.-M. (2009). Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell

transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 182–194.

- Huang, S., Guo, S., Guo, F., Yang, Q., Xiao, X., Murata, M., Ohnishi, S., Kawanishi, S., and Ma, N. (2013). CD44v6 expression in human skin keratinocytes as a possible mechanism for carcinogenesis associated with chronic arsenic exposure. *Eur. J. Histochem.* Vol 57 No 1 2013.
- Huang, X., Zhuang, J., Teng, X., Li, L., Chen, D., Yan, X., and Tang, F. (2010). The promotion of human malignant melanoma growth by mesoporous silica nanoparticles through decreased reactive oxygen species. *Biomaterials* 31, 6142–6153.
- Husain, M., Saber, A.T., Guo, C., Jacobsen, N.R., Jensen, K.A., Yauk, C.L., Williams, A., Vogel, U., Wallin, H., and Halappanavar, S. (2013). Pulmonary instillation of low doses of titanium dioxide nanoparticles in mice leads to particle retention and gene expression changes in the absence of inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 269, 250–262.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354, 56–58.
- Jana, S., Salehi-Khojin, A., and Zhong, W.-H. (2007). Enhancement of fluid thermal conductivity by the addition of single and hybrid nano-additives. *Thermochim. Acta* 462, 45–55.
- Jones C.F., Grainger D.W. (2009) *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 61: 438-456.
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fähling, H., and Roland Felix (1999). Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J. Magn. Mater.* 201, 413–419.
- Kain, J., Karlsson, H.L., and Möller, L. (2012). DNA damage induced by micro- and nanoparticles—interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis* 27, 491–500.

- Kato, H., Fujita, K., Horie, M., Suzuki, M., Nakamura, A., Endoh, S., Yoshida, Y., Iwahashi, H., Takahashi, K., and Kinugasa, S. (2010). Dispersion characteristics of various metal oxide secondary nanoparticles in culture medium for *in vitro* toxicology assessment. *Toxicol. In Vitro* 24, 1009–1018.
- Kermanizadeh, A., Vranic, S., Boland, S., Moreau, K., Baeza-Squiban, A., Gaiser, B., Andrzejczuk, L., and Stone, V. (2013). An *in vitro* assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrol.* 14, 96.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., and Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Celebr. 50 Years Oxyg.* 338, 558–567.
- Knaapen, A.M., Borm, P.J.A., Albrecht, C., and Schins, R.P.F. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int. J. Cancer* 109, 799–809.
- Köhler, A.R., Som, C., Helland, A., and Gottschalk, F. (2008). Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. *Sustain. Nanotechnol. Dev.* 16, 927–937.
- Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F., and Smalley, R.E. (1985). C60: Buckminsterfullerene. *Nature* 318, 162–163.
- Kumagai, M., Imaizumi, T., Suzuki, K., Yoshida, H., Takanashi, S., Okumura, K., Sugawara, K., and Satoh, K. (2004). 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits the IL-1 β -induced expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in BEAS-2B bronchial epithelial cells. *Tohoku J. Exp. Med.* 202, 69–76.
- Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Van Ravenzwaay, B., Schulz, M., Wiench, K., Champ, S., Schulte, S., Wohlleben, W., and Oesch, F. (2010). Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. *Nanotoxicology* 4, 364–381.

-
- Lindberg, H.K., Falck, G.C.-M., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., and Norppa, H. (2009). Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Toxic. Eng. Nanomater.* 186, 166–173.
 - Lindberg, H.K., Falck, G.C.-M., Singh, R., Suhonen, S., Järventaus, H., Vanhala, E., Catalán, J., Farmer, P.B., Savolainen, K.M., and Norppa, H. (2012). Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells *in vitro*. *Toxicology*. DOI: 10.1016/j.tox.2012.12.008.
 - Liu, T., Li, L., Teng, X., Huang, X., Liu, H., Chen, D., Ren, J., He, J., and Tang, F. (2011). Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials* 32, 1657–1668.
 - Lomer, M.C.E., Thompson, R.P.H., and Powell, J.J. (2002). Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc. Nutr. Soc.* 61, 123–130.
 - Lu, C., Tieu, K., and Wexler, D. (2009). Significant enhancement of bond strength in the accumulative roll bonding process using nano-sized SiO₂ particles. *J. Mater. Process. Technol.* 209, 4830–4834.
 - Martínez-Boubeta, C., Balcells, L., Cristòfol, R., Sanfeliu, C., Rodríguez, E., Weissleder, R., Lope-Piedrafita, S., Simeonidis, K., Angelakeris, M., Sandiumenge, F., et al. (2010). Self-assembled multifunctional Fe/MgO nanospheres for magnetic resonance imaging and hyperthermia. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 6, 362–370.
 - McTeer, J., Dean, A.P., White, K.N., and Pittman, J.K. (2013). Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology*. DOI: 10.3109/17435390.2013.778346.

- Mekenyan, O.G., Petkov, P.I., Kotov, S.V., Stoeva, S., Kamenska, V.B., Dimitrov, S.D., Honma, M., Hayashi, M., Benigni, R., Donner, E.M., et al. (2011). Investigating the relationship between *in vitro*–*in vivo* genotoxicity: derivation of mechanistic QSAR models for *in vivo* liver genotoxicity and *in vivo* bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* *25*, 277–296.
- Mortensen, N.P., Hurst, G.B., Wang, W., Foster, C.M., Nallathamby, P.D., and Retterer, S.T. (2013). Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity. *Nanoscale* *5*, 6372–6380.
- Mu, Q., Hondow, N., Krzeminski, L., Brown, A., Jeuken, L., and Routledge, M. (2012). Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* *9*, 29.
- Murphy, F., Poland, C., Duffin, R., Al-Jamal, K., Ali-Boucetta, H., Nunes, A., Byrne, F., Prina-Mello, A., Volkov, Y., Li, S., et al. (2011). Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *Am. J. Pathol.* *178*, 2587–2600.
- Murphy, F., Schinwald, A., Poland, C., and Donaldson, K. (2012). The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* *9*, 8.
- Murr, L.E., Esquivel, E.V., and Bang, J.J. (2004). Characterization of nanostructure phenomena in airborne particulate aggregates and their potential for respiratory health effects. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* *15*, 237–247.
- Murray, A., Kisin, E., Tkach, A., Yanamala, N., Mercer, R., Young, S.-H., Fadeel, B., Kagan, V., and Shvedova, A. (2012). Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos. *Part. Fibre Toxicol.* *9*, 10.

-
- Nagai, H., Okazaki, Y., Chew, S.H., Misawa, N., Yamashita, Y., Akatsuka, S., Ishihara, T., Yamashita, K., Yoshikawa, Y., Yasui, H., et al. (2011). Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, E1330 – E1338.
 - Naya, M., Kobayashi, N., Endoh, S., Maru, J., Honda, K., Ema, M., Tanaka, J., Fukumuro, M., Hasegawa, K., Nakajima, M., et al. (2012). *In vivo* genotoxicity study of single-wall carbon nanotubes using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *64*, 124–129.
 - Nel, A.E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., and Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* *8*, 543–557.
 - Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* *139*, 271–279.
 - O'Dowd, C.D., Facchini, M.C., Cavalli, F., Ceburnis, D., Mircea, M., Decesari, S., Fuzzi, S., Yoon, Y.J., and Putaud, J.-P. (2004). Biogenically driven organic contribution to marine aerosol. *Nature* *431*, 676–680.
 - Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., et al. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.* *2*, 8.
 - Osmond-McLeod, M., Poland, C., Murphy, F., Waddington, L., Morris, H., Hawkins, S., Clark, S., Aitken, R., McCall, M., and Donaldson, K. (2011). Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres. *Part. Fibre Toxicol.* *8*, 15.

- Ostling, O., and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291–298.
- Pala, P., Hussell, T., and Openshaw, P.J.M. (2000). Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Flow Cytom.* 243, 107–124.
- Pang, C., Selck, H., Misra, S.K., Berhanu, D., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., and Forbes, V.E. (2012). Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 114–122.
- Papageorgiou, I., Brown, C., Schins, R., Singh, S., Newson, R., Davis, S., Fisher, J., Ingham, E., and Case, C.P. (2007). The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials* 28, 2946–2958.
- Park, E.-J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., and Park, K. (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol. In Vitro* 24, 872–878.
- Patlolla, A., Knighten, B., and Tchounwou, P. (2010). Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. *Ethn. Dis.* 20, S1–65–72.
- Penn, S.G., He, L., and Natan, M.J. (2003). Nanoparticles for bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 609–615.
- Peters, R., Kramer, E., Oomen, A.G., Herrera Rivera, Z.E., Oegema, G., Tromp, P.C., Fokkink, R., Rietveld, A., Marvin, H.J.P., Weigel, S., et al. (2012). Presence of nano-sized silica during *in vitro* digestion of foods containing silica as a food additive. *ACS Nano* 6, 2441–2451.
- Petersen, E.J., Zhang, L., Mattison, N.T., O’Carroll, D.M., Whelton, A.J., Uddin, N., Nguyen, T., Huang, Q., Henry, T.B., Holbrook, R.D., et al. (2011).

Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 9837–9856.

- Petković, J., Žegura, B., Stevanović, M., Drnovšek, N., Uskoković, D., Novak, S., and Filipič, M. (2010). DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology* **5**, 341–353.
- Pompa, P.P., Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Maiorano, G., Sabella, S., and Cingolani, R. (2011). Physical assessment of toxicology at nanoscale: nano dose-metrics and toxicity factor. *Nanoscale* **3**, 2889–2897.
- Porter, K.R., Claude, A., and Fullam, E.F. (1945). A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *J. Exp. Med.* **81**, 233–246.
- Rabinovitch, P.S., Kubbies, M., Chen, Y.C., Schindler, D., and Hoehn, H. (1988). BrdU-Hoechst flow cytometry: A unique tool for quantitative cell cycle analysis. *Exp. Cell Res.* **174**, 309–318.
- Raemy, D., Grass, R., Stark, W., Schumacher, C., Clift, M., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. (2012). Effects of flame made zinc oxide particles in human lung cells - a comparison of aerosol and suspension exposures. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, 33.
- Rajapakse, K., Drobne, D., Kastelec, D., and Marinsek-Logar, R. (2013). Experimental evidence of false-positive Comet test results due to TiO₂ particle – assay interactions. *Nanotoxicology* **5**, 1043-1051
- Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I., McMenamin, M.G., Lechner, J.F., Su, R.T., Brash, D.E., Park, J.-B., Rhim, J.S., and Harris, C.C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* **48**, 1904 –1909.

- Reibold, M., Paufler, P., Levin, A.A., Kochmann, W., Patzke, N., and Meyer, D.C. (2006). Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature* 444, 286–286.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616.
- Russier, J., Menard-Moyon, C., Venturelli, E., Gravel, E., Marcolongo, G., Meneghetti, M., Doris, E., and Bianco, A. (2011). Oxidative biodegradation of single- and multi-walled carbon nanotubes. *Nanoscale* 3, 893–896.
- Rydberg, B., and Johanson, K.J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In *DNA repair mechanisms*, Philip Hanawalt, ed. (Academic Press), pp. 465–468.
- Ryu, S.W., Hwang, J.W., and Hong, S.H. (2012). Synthesis and characterization of vertically aligned carbon nanotube forest for solid state fiber spinning. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12, 5653–5657.
- Sambuy, Y., Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26.
- Sargent, L.M., Reynolds, S.H., and Castranova, V. (2010). Potential pulmonary effects of engineered carbon nanotubes: *in vitro* genotoxic effects. *Nanotoxicology* 4, 396–408.
- Sargent, L.M., Hubbs, A.F., Young, S.-H., Kashon, M.L., Dinu, C.Z., Salisbury, J.L., Benkovic, S.A., Lowry, D.T., Murray, A.R., Kisin, E.R., et al. (2012). Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 745, 28–37
- Sasidharan, A., Panchakarla, L.S., Chandran, P., Menon, D., Nair, S., Rao, C.N.R., and Koyakutty, M. (2011). Differential nano-bio interactions and

- toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale* 3, 2461–2464.
- Sayes, C.M., Reed, K.L., and Warheit, D.B. (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* 97, 163–180.
 - Schleh, C., Kreyling, W., and Lehr, C.-M. (2013). Pulmonary surfactant is indispensable in order to simulate the *in vivo* situation. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 6.
 - Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 31, 9–15.
 - Sergent, J., Paget, V., and Chevillard, S. (2012). Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann Occup Hyg* 56, 622–630.
 - Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., and Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 15.
 - Simko, M., and Mattsson, M.-O. (2010). Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: A critical review. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 42.
 - Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., and Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891–3914.
 - Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
 - Smith S.C., and Rodrigues D.F. (2012). The fate of carbon-based nanomaterials in the environment. *J. Bioremediation Biodegrad.* 4:e129.

- So, S.J., Jang, I.S., and Han, C.S. (2008). Effect of micro/nano silica particle feeding for mice. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 5367–5371.
- Sonavane, G., Tomoda, K., Sano, A., Ohshima, H., Terada, H., and Makino, K. (2008). *In vitro* permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 65, 1–10.
- Stoehr, L., Gonzalez, E., Stampfl, A., Casals, E., Duschl, A., Puentes, V., and Oostingh, G. (2011). Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. Part. *Fibre Toxicol.* 8, 36.
- Sun, T., Yan, Y., Zhao, Y., Guo, F., and Jiang, C. (2012). Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549 cells. *PLoS ONE* 7, e43442.
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Morrell-Falvey, J.L., Gu, B., and Doktycz, M.J. (2012). Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. *Langmuir* 28, 2727–2735.
- Suzuki, H., Toyooka, T., and Ibuki, Y. (2007). Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3018–3024.
- Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S., and Kanno, J. (2008). Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.* 33, 105–116.
- Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of —~~na~~o-technology.”*Bull. Jpn. Soc. Precis. Eng.* 18–23.
- Taurozzi, J.S., Hackley, V.A., and Wiesner, M.R. (2010). Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. *Nanotoxicology* 5, 711–729.

-
- Taurozzi, J.S., Hackley, V.A., and Wiesner, M.R. (2012). A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. *Nanotoxicology* 1–13.
 - Toduka, Y., Toyooka, T., and Ibuki, Y. (2012). Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence—correlation with genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7629–7636.
 - Tsoli, M., Kuhn, H., Brandau, W., Esche, H., and Schmid, G. (2005). Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small* 1, 841–844.
 - Ursini, C.L., Cavallo, D., Fresegna, A.M., Ciervo, A., Maiello, R., Casciardi, S., Tombolini, F., Buresti, G., and Iavicoli, S. (2012). Study of cytotoxic and genotoxic effects of hydroxyl-functionalized multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *J. Nanomater.* DOI:10.1155/2012/815979.
 - Valentine, J., Li, J., Zentgraf, T., Bartal, G., and Zhang, X. (2009). An optical cloak made of dielectrics. *Nat. Mater.* 8, 568–571.
 - Vanparys, P., Corvi, R., Aardema, M.J., Gribaldo, L., Hayashi, M., Hoffmann, S., and Schechtman, L. (2012). Application of *in vitro* cell transformation assays in regulatory toxicology for pharmaceuticals, chemicals, food products and cosmetics. *Int. Prevalidation Study Cell Transform. Assays* 744, 111–116.
 - Veisoh, O., Gunn, J.W., and Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Target. Deliv. Using Inorg. Nanosyst.* 62, 284–304.
 - Von der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K.R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., and Unrine, J.M. (2012). Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): General considerations and conceptual case studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 32–49.

- Walter, P., Welcomme, E., Hallégot, P., Zaluzec, N.J., Deeb, C., Castaing, J., Veyssiére, P., Bréniaux, R., Lévêque, J.-L., and Tsoucaris, G. (2006). Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula. *Nano Lett.* 6, 2215–2219.
- Wang, L., Stueckle, T.A., Mishra, A., Derk, R., Meighan, T., Castranova, V., and Rojanasakul, Y. (2013). Neoplastic-like transformation effect of single-walled and multi-walled carbon nanotubes compared to asbestos on human lung small airway epithelial cells. *Nanotoxicology*. DOI:10.3109/17435390.2013.801089
- Wang, W.-C., Kuo, C.-Y., Tzang, B.-S., Chen, H.-M., and Kao, S.-H. (2012). IL-6 augmented motility of airway epithelial cell BEAS-2B via Akt/GSK-3 β signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* 113, 3567–3575.
- Westbrook, A.M., Wei, B., Braun, J., and Schiestl, R.H. (2011). Intestinal inflammation induces genotoxicity to extraintestinal tissues and cell types in mice. *Int. J. Cancer* 129, 1815–1825.
- Williams, D., and Carter, C.B. (1996). The transmission electron microscope. in *transmission electron microscopy*, (Springer US), pp. 3–17.
- Wittmaack, K. (2011). Excessive delivery of nanostructured matter to submersed cells caused by rapid gravitational settling. *ACS Nano* 5, 3766–3778.
- Woodrow Wilson Project of Emerging Nanotechnologies (2009a). Woodrow Wilson Database. [Http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/browse/](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/browse/)
- Woodrow Wilson Project of Emerging Nanotechnologies (2009b). Woodrow Wilson Database Analysis. [Http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/)
- Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., and Krug, H.F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 6, 1261–1268.

-
- Xiao, J., and Qi, L. (2011). Surfactant-assisted, shape-controlled synthesis of gold nanocrystals. *Nanoscale* 3, 1383–1396.
 - Yamani, J.S., Miller, S.M., Spaulding, M.L., and Zimmerman, J.B. (2012). Enhanced arsenic removal using mixed metal oxide impregnated chitosan beads. *Water Res.* 46, 4427–4434.
 - Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Mimura, K., Morishita, Y., Nozaki, M., Yoshida, T., Ogura, T., Nabeshi, H., Nagano, K., et al. (2011). Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nano.* 6, 321–328.
 - Yavuz, C.T., Mayo, J.T., Yu, W.W., Prakash, A., Falkner, J.C., Yean, S., Cong, L., Shipley, H.J., Kan, A., Tomson, M., et al. (2006). Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals. *Science* 314, 964–967.
 - Yeo, M.-K., and Nam, D.-H. (2013). Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: A comparison of TiO₂ nanoparticles and nanotubes. *Environ. Pollut.* 178, 166–172.
 - Yi, J., Chen, B.T., Schwegler-Berry, D., Frazer, D., Castranova, V., McBride, C., Knuckles, T.L., Stapleton, P.A., Minarchick, V.C., and Nurkiewicz, T.R. (2013). Whole-body nanoparticle aerosol inhalation exposures. *J. Vis. Exp.*
 - Zhang, J., and Misra, R.D.K. (2007). Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core–shell nanoparticle carrier and drug release response. *Acta Biomater.* 3, 838–850.