



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Facultad de Biociencias
Departamento de Genética y de Microbiología
Unidad de Genética

**Desarrollo de un modelo *in vitro* de barrera
intestinal para la evaluación del riesgo de los
nanomateriales**

TESIS DOCTORAL

Laura Vila Vecilla

2016



Facultad de Biociencias
Departamento de Genética y de Microbiología
Unidad de Genética

Desarrollo de un modelo *in vitro* de barrera intestinal para la evaluación del riesgo de los nanomateriales

Memoria presentada por

LAURA VILA VECILLA

en el marco de los estudios de doctorado en Genética de la *Universitat Autònoma de Barcelona* para optar al grado de Doctora por la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Bajo la dirección del Dr. Ricard Marcos Dauder y la Dra. Alba Hernández Bonilla

Dr. Ricard Marcos Dauder

Director de tesis

Dra. Alba Hernández Bonilla

Directora de tesis

Laura Vila Vecilla

"¡BAILAR NO ES CIENCIA!"- GLaDOS (Portal 2)

Agradecimientos

Al finalizar un trabajo tan complejo como el desarrollo de una Tesis doctoral es inevitable que te invada un sentimiento de egocentrismo que te lleve a creer que la mayor parte del mérito es tuyo. Pronto te das cuenta de que todo tu trabajo habría sido imposible sin el apoyo de personas e instituciones que han estado manteniéndote a flote en la sombra. Por ello, y siendo realmente escueta, quiero aprovechar este espacio para agradeceros, en un par de líneas, todo vuestro apoyo.

En primer lugar, agradecer a mis directores de Tesis, Dr. Ricard Marcos y Dra. Alba Hernández, la confianza que han depositado en mí para llevar a cabo este trabajo. También agradecerles su función de guía tanto en el proyecto como en mi formación como investigadora.

GRACIAS –así, en mayúsculas- a todos los que, de forma directa o indirecta, me habéis acompañado en este camino de rosas y espinas. Eso os incluye a absolutamente todos. Habéis formado todos los engranajes de una maquinaria casi perfecta durante todos estos años.

Por último, agradecer a la Generalitat de Catalunya la concesión de la beca FI-FGR y al proyecto Europeo NANoREG, ya que sin ellos, esta Tesis no se podría haber llevado a cabo.

“I get by with a little help from my friends

Yes, I get by with a little help from my friends

Gonna try with a little help from my friends”

The Beatles – With a little help from my friends

RESUMEN

El campo de la nanotecnología está expandiéndose de forma exponencial y con ello la preocupación social sobre los posibles efectos de sus productos (nanomateriales; NMs) en los organismos vivos. Dado que las principales vías de exposición a los NMs son el contacto dermal, la inhalación y la ingestión, la barrera intestinal adquiere gran importancia debido a la presencia de NMs en comida y envases de comida, además de su presencia en muchos otros productos de uso diario. En este contexto, el objetivo de esta Tesis es desarrollar un modelo intestinal formado por células Caco-2 para la evaluación del riesgo de NMs. Las células Caco-2 son células de adenocarcinoma de colon que tienen la capacidad de diferenciarse en enterocitos del intestino delgado. Bajo el marco del proyecto NANoREG, los resultados obtenidos han demostrado que se ha desarrollado con éxito un protocolo robusto para obtener una barrera *in vitro* intestinal estable y reproducible compuesta por estas células Caco-2 diferenciadas. Usando concentraciones subtóxicas de TiO₂NPs, ZnONPs, SiO₂NPs, CeO₂NPs, AgNPs y MWCNT durante 24 horas, se han realizado diferentes tipos de análisis, a saber: a) evaluación de la integridad y permeabilidad de la monocapa, b) internalización celular, c) translocación de los NMs, d) evaluación del daño genotóxico y d) evaluación de la integridad de la monocapa a través de cambios de la expresión del mRNA. Los resultados tras la exposición a concentraciones subtóxicas no mostraron alteración en la integridad ni en la permeabilidad de la monocapa. Además, se observó internalización de las AgNPs tanto en el citoplasma como en el núcleo, mientras que las TiO₂NPs y las CeO₂NPs se encontraron sedimentadas en la membrana apical de las células. La capacidad de evaluar la translocación de los NMs a través de la barrera celular resultó ser muy limitada. El TEM-EDX, la microscopía confocal y el ICP-MS produjeron resultados de los que se puede concluir una limitada translocación de TiO₂NPs, ZnONPs y CeO₂NPs. En la evaluación del daño genotóxico mediante el ensayo del cometa, se observó que sólo las AgNPs son capaces de producir daño oxidativo en el DNA y tan sólo en la concentración más alta analizada (50 µg/mL). En la evaluación de la expresión del mRNA de genes de transportadores celulares (*SI* y *SLC15A1*) y de adhesión célula-célula (*OCCLUDIN* y *CLAUDIN2*), los resultados mostraron mucha variabilidad entre réplicas y no se encontraron cambios significativos en ninguno de ellos tras la exposición a AgNPs.

Al margen del proyecto europeo y con el fin de evaluar el riesgo de la exposición a NMs a largo plazo, se expusieron las células Caco-2 en su estado no diferenciado a concentraciones subtóxicas de AgNPs durante 6 semanas evaluándose su capacidad de transformación. Estas células mostraron necesitar un tiempo de adaptación en el que disminuyen el ritmo de división debido a la exposición hasta que lo recuperan a lo largo del tratamiento. Tras 6 semanas de exposición, las células Caco-2 expresan algunas características de célula transformada: a) aumentan su nivel de proliferación, b) adquieren la capacidad de crecer en *soft-agar*, y de promover el crecimiento en *soft-agar* de otras células tumorales (HCT116), c) aumentan la secreción de MMPs, y d) incrementan su capacidad migratoria. Sin embargo, la exposición no mostró inducir cambios en la expresión de los genes involucrados en EMT, adhesión celular, citoesqueleto o supresores de tumores. A pesar de esto, los resultados globales indicarían que las AgNPs no son seguras en términos de carcinogénesis.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ¿Qué es la nanotecnología? Conceptos básicos.....	1
1.1.1. ¿Cómo empezó? El origen del concepto.....	2
1.1.2. Las NPs a nuestro alrededor.....	2
1.2. Características de los NMs.....	3
1.2.1. Características físico-químicas	4
1.3. Clasificación de las NPs	8
1.3.1. Según su origen.....	9
1.3.2. Según sus características físicas	10
1.4. Exposición a NPs	13
1.4.1. NMs en productos de consumo.....	13
1.4.2. Exposición ocupacional.....	17
1.5. Entrada y distribución en el organismo.....	20
1.5.1. Principales vías de penetración	21
1.5.2. Transporte	26
1.5.3. Eliminación	27
1.6. Efectos sobre la salud	27
1.7. Evaluación del riesgo	29
1.8. Las Caco-2 como modelo <i>in vitro</i> de exposición intestinal	30
1.8.1. El proyecto NANoREG y el uso de células Caco-2 como modelo de barrera intestinal	34
1.8.2. Tratamiento de larga duración con la línea celular Caco-2.....	40
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Línea celular.....	49
3.1.1. Estudios de transporte	49
3.1.2. Estudios de larga duración.....	50

3.2. NMs utilizados	50
3.3. Dispersión de los NMs.....	51
3.4. Caracterización de los NMs.....	52
3.5. Viabilidad celular/Ensayo de toxicidad.....	53
3.6. Estudios con células diferenciadas.....	53
3.6.1. Exposición	54
3.6.2. Evaluación de la integridad y de la permeabilidad.....	54
3.6.3. Internalización.....	55
3.6.4. Translocación de las NPs	56
3.6.5. Valoración del daño genotóxico/oxidativo: ensayo del cometa.....	58
3.6.6. Valoración de la monocapa a través de cambios en la expresión génica ...	60
3.7. Estudios de larga duración	64
3.7.1. Proliferación celular	64
3.7.2. Ensayo del <i>soft-agar</i>	64
3.7.3. Ensayo del zimograma.....	66
3.7.4. Ensayo de migración	67
3.6.5. RT-PCR a tiempo real.....	68
4. RESULTADOS	71
4.1. Caracterización de los NMs.....	71
4.1.1. Caracterización usando TEM.....	71
4.1.2. Caracterización usando Zetasizer	73
4.2. Viabilidad celular/ensayo de toxicidad	74
4.3. Estudios de transporte.....	79
4.3.1. Puesta a punto del protocolo.....	79
4.3.2. Evaluación de la integridad y de la permeabilidad.....	80
4.3.3. Internalización.....	84
4.3.4. Translocación de las NPs	88
4.3.5. Valoración del daño genotóxico/oxidativo: ensayo del cometa.....	96
4.3.6. Valoración de la monocapa a través de la expresión génica.....	97

4.4. Estudios de larga duración	98
4.4.1. Proliferación celular	98
4.4.2. Ensayo del <i>soft-agar</i>	100
4.4.3. Zimograma.....	102
4.4.4. Migración	104
4.4.5. Cambios en la expresión génica	105
5. DISCUSIÓN.....	107
5.1. Dispersión y caracterización de los NMs	107
5.2. Citotoxicidad de los NMs	108
5.3. Estudios de transporte.....	109
5.4. Estudios de genotoxicidad.....	117
5.5. Estudios de larga duración.	122
6. CONCLUSIONES	135
7. BIBLIOGRAFÍA.....	137

TABLA DE ABREVIATURAS

ACTA2	α Actina de músculo liso (Smooth muscle α actin)
Ag	Plata
AgNP	Nanopartícula de plata.
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>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCRP	Cassette de union a ATP subfamilia G miembro 2 (<i>ATP binding cassette subfamily G member 2</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDH1	E-cadherina
cDNA	DNA complementario
CeO₂	Dióxido de cerio
CeO₂NP	Nanopartícula de dióxido de cerio
CM	Medio condicionado
CNT	Carbonanotubos
CoNP	Nanopartícula de cobalto
Cp	Punto de cruzamiento (<i>Crossing point</i>)
CPI	Inventario de productos de consumo de nanotecnología (<i>Nanotechnology Consumer Product Inventory</i>)
CT	Control
CYP3A4	Citocromo P450 familia3 subfamilia A miembro 4 (<i>Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4</i>)
DEFRA	Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales del Reino Unido (<i>Department for Environment, Food and Rural Affairs</i>)
DLS	Dispersión de luz dinámica (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dublecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de doble cadena (<i>double-stranded DNA</i>)
ECVAM	Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (<i>the European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

EDX	Energía dispersiva de rayos X (<i>Energy Dispersive X-Ray</i>)
EMT	Transiciones epiteliales - mesenquimales (<i>Epithelial - mesenchymal transition</i>)
EPCAM	Molécula de adhesión celular epitelial (<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>)
f	Fibras
FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal bovine serum</i>)
FCS	Suero bovino (becerro) fetal (<i>Fetal Calf serum</i>)
FPG	Formamidopirimidina-DNA glicosilasa
GB	Gelbond®
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietilo)-1-piperazinoetanosulfónico
HF	Ácido fluorhídrico
HNO₃	Ácido nítrico
HPT1	Cadherina 17
IC₅₀	Concentración Inhibitoria máxima media
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
IIT	Instituto Italiano de Tecnología, Italia (<i>Istituto Italiano di Tecnologia</i>)
INT	(2-p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio clórico
IRSAL	Instituto Riojano de Salud
ISS	Instituto Superior de Sanidad, Italia (<i>Istituto Superiore di Sanità</i>)
JRC	Centro Europeo de Investigación, Ispra, Italia (<i>Joint Research Center</i>)
KBrO₃	Bromato de potasio
LDV	<i>Laser Doppler Velocimetry</i>
LY	<i>Lucifer Yellow</i>
MET	Transiciones mesenquimales - epiteliales (<i>Mesenchymal - epithelial transition</i>)
MilliQ	Agua ultrapura
MMP	Metaloproteinasa de matriz (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
MMS	Metil-metano sulfonato
MNM	NM manufacturado
MNP	NP manufacturada
mRNA	RNA mensajero
MRP2	Cassette de union a ATP subfamilia C miembro 2 (<i>ATP binding cassette subfamily C member 2</i>)
MWCNT	Nanotubos de carbono multicapa (<i>multiwalled carbonanotubs</i>)
NaCl	Cloruro de sodio
NANoREG	<i>A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials</i>

NEEA	Aminoácidos no esenciales (<i>Non-Essential Aminoacids</i>)
NIOSH	Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional
NM	Nanomaterial
NP	Nanopartícula
OEL	Límite de exposición ocupacional (<i>Occupational Exposure Limit</i>)
Ogg1-/-	Knockout para el gen <i>Ogg1</i>
pb	pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDI	Índice de polidispersidad
PET	Polietileno-tereftalato
PGP	<i>Phosphoglycolate phosphatase</i>
PTEN	Fosfatasa y tensina homólogo (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
PUF	Partículas ultrafinas
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopio electrónico de barrido (<i>Scanning electron microscopy</i>)
SI	Sacarasa-isomaltasa (<i>Sucrose-isomaltase</i>)
SiO₂	Dióxido de silicio (sílica)
SiO₂@IIT(-)	Nanopartícula de sílica fluorescente de 50 nm cargada negativamente
SiO₂NP	Nanopartícula de dióxido de silicio
SLC15A1	Transportador de solutos familia 15 miembro 1 (<i>Solute carrier family 15 member 1</i>)
SLUG	Repressor transcripcional de la familia Snail 2 (<i>Snail family transcriptional repressor 2</i>)
SNAIL1	Repressor transcripcional de la familia Snail 1 (<i>Snail family transcriptional repressor 1</i>)
SOPs	Procedimientos Operativos Estándar (<i>Standard Operating Procedures</i>)
TE	Tris-EDTA
TEER	Resistencia Eléctrica Transepitelial (<i>TransEpithelial Electrical Resistance</i>)
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TIMP	Inhibidor de metalopeptidasas (<i>metallopeptidase inhibitor</i>)

TiO₂	Dióxido de titanio
TiO₂NP	Nanopartícula de dióxido de titanio
TWIST	Factor de transcripción de la familia bHLH (<i>family bHLH transcription factor 1</i>)
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UE	Unión Europea
UNamur	Universidad de Namur
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A (<i>Vascular endothelial growth factor A</i>)
VIM	Vimentina
w/v	Peso/volumen (<i>Weight/Volume</i>)
WP	Paquete de trabajo (<i>Work Package</i>)
WT	<i>Wild-type</i>
ZEB	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
Zn	Zinc
ZnO	Dióxido de zinc
ZnONP	Nanopartículas de zinc
ZO-1	Zonula occludens (<i>tight junction protein 1</i>)

1. INTRODUCCIÓN

Con el objetivo global de mejorar la competitividad de la industria se han ido dando cambios importantes en un amplio rango de sectores, como en los de las nanotecnologías, generando durante las últimas tres décadas una gran cantidad de nanopartículas y nanoproductos con nuevas e inusuales propiedades muy beneficiosas para la sociedad y distintos sectores industriales.

Los productos de la nanotecnología están teniendo cada vez un mayor impacto en sectores como el de la información y las comunicaciones, en el sector agrario y en el de la alimentación, así como en el de la medicina. Además, su uso se está extendiendo en el sector textil y en el de los revestimientos, así como en el de la automoción, entre otros múltiples sectores.

A pesar de sus aparentes virtudes, que son las que están extendiendo su uso de manera casi exponencial, las nanopartículas (NPs) pueden tener propiedades y efectos biológicos muy diferentes a las que poseen los mismos materiales en tamaños convencionales, lo que puede dar lugar a nuevos riesgos para la salud del hombre y de otras especies. En efecto, los mecanismos biológicos normales de defensa no siempre parecen ser capaces de responder adecuadamente a estas partículas que pueden tener características tan diferentes a las de las formas de mayor tamaño. Además, las NPs pueden propagarse y persistir en el medio ambiente, pudiendo tener un importante impacto ambiental. Es en este contexto donde la nanotoxicología emerge como un campo involucrado en conocer los riesgos potenciales que pueden suponer la exposición a los nanomateriales manufacturados (MNMs; Singh et al., 2009)

1.1. ¿Qué es la nanotecnología? Conceptos básicos

La **nanotecnología** es una ciencia nueva, aunque con fuerte empuje, donde convergen diferentes campos como la física, química, biología, medicina, ciencia de los materiales e ingenierías. La nanotecnología consiste en el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control del tamaño y la forma, a una escala nanométrica. La unidad de longitud, el **nanómetro (nm)**, equivale a una millonésima de milímetro, es decir, 10^{-9} metros. Así pues, la nanoescala comprende estructuras de tamaño de hasta 100 nm. Dentro de esta nanoescala se puede diferenciar entre nanopartículas (NPs) y nanomateriales (NMs). Las NPs son estructuras/partículas con todas sus dimensiones del orden de 100 nm o menos y en cambio llamamos NMs a los materiales con una o más dimensiones externas o una estructura interna dentro de la nanoescala (Oberdörster et al., 2005;

Buzea et al., 2007). Dado que los nanomateriales pueden tener un origen natural, se utiliza el término nanomateriales manufacturados (MNMs) para definir a aquellos que son resultado de la actividad directa de la nanotecnología.

La **nanotoxicología** se ha propuesto como una nueva rama de la toxicología para determinar los efectos adversos que sobre la salud de los organismos vivos puede provocar la exposición a las NPs (Singh et al., 2009). La investigación en el campo de la nanotoxicología no sólo evalúa la seguridad de las nanoestructuras y dispositivos diseñados, sino que además nos ayuda a avanzar en el campo de la nanomedicina dándonos información sobre las propiedades indeseables de éstos y ayudándonos a evitarlos (Oberdörster et al., 2005).

1.1.1. ¿Cómo empezó? El origen del concepto

El concepto de nanociencia y de nanotecnología apareció en una charla titulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” impartida por el físico Richard Feynman en la reunión de la *American Physical Society* en el *California Institute of Technology* (CalTech) el 29 de Diciembre de 1959. En esta charla, Feynman describió un proceso en el cual los científicos serían capaces de manipular y controlar átomos y moléculas de forma individual. Esta novedosa idea demostró una nueva forma de pensamiento. Es por esto que se considera a Feynman el padre de la nanotecnología moderna (Buzea et al., 2007; Hulla et al., 2015).

Una década después, el profesor Norio Taniguchi acuñó el término de nanotecnología para describir procesos semiconductores que ocurren en el orden del nanómetro. Él defendía que la nanotecnología consiste en el procesado, separación, consolidación y deformación de los materiales por un átomo o una molécula. Sin embargo, no fue hasta 1981, con el desarrollo del microscopio de efecto túnel, que permite “ver” átomos individuales, que empezó la nanotecnología moderna (Hulla et al., 2015).

1.1.2. Las NPs a nuestro alrededor

Las NPs existen en el planeta desde su inicio. El mundo natural está gobernado por estructuras cuyas dimensiones están dentro de la nanoescala. Son ejemplos de ello las moléculas del cuerpo humano (DNA, proteína, fosfolípidos, lípidos, células, etc.), algunos componentes alimentarios, virus, etc. Todo en la Tierra está compuesto por átomos: la comida, la ropa, los edificios,..., aunque sólo desde el último cuarto de siglo ha sido posible la modificación de moléculas y estructuras dentro de este rango (nanotecnología).

Estamos rodeados de miles de millones de NPs, incluyendo el polvo de arena, sustancias químicas generadas por el plancton oceánico, los productos de la combustión (principalmente los gases de combustión de los motores diésel), etc. Además, algunos procesos naturales como volcanes e incendios generan NPs y otras nanoestructuras que permanecen en el ambiente a lo largo del tiempo. Un ambiente habitual puede contener unas 20.000 NPs por centímetro cúbico. En un bosque, esta cifra puede elevarse a 50.000, y en una calle del centro de la ciudad a 100.000 NPs, lo que nos da idea de la abundancia de estas estructuras nanoparticuladas.

En contraste con las NPs de origen natural, la proporción de NPs artificiales procedentes de la producción industrial es muy pequeña. Sin embargo, en el futuro se espera que las NPs manufacturadas (MNPs) se fabriquen en grandes cantidades para obtener nuevos productos, de tal manera que a medida que sus usos se extiendan, las posibilidades de exposición, tanto del ser humano como de otros organismos, se irán incrementando. De hecho, los científicos y los ingenieros de hoy en día están desarrollando deliberadamente una amplia variedad de materiales en la nanoescala para aprovechar sus propiedades que permiten, entre otras, una mayor resistencia, menor peso, mayor control del espectro de la luz y una mayor reactividad química que sus contrapartes de mayor escala (NNI).

Aunque el término nanotecnología es reciente, el uso de las NPs no lo es. Antiguamente algunas civilizaciones utilizaron NPs aprovechando sus propiedades ópticas y medicinales desconociendo, obviamente, el concepto moderno de las mismas. Por ejemplo, en la civilización egipcia ya usaron NPs de oro como coloides medicinales. Es también muy conocida la copa Lycurgus (Egipto, siglo IV a.C.) que está compuesta por vidrio de sílice con NPs de plata y oro de unos 70 nm. Esta copa cambia de color según la incidencia de luz, debido a las asombrosas propiedades de los NMs contenidos en ella (Gartia et al., 2013). Otros ejemplos son las vidrieras de las iglesias y catedrales góticas o la pintura azul de los Mayas, que contienen materiales nanoestructurados.

1.2. Características de los NMs

En el Sistema Internacional de Unidades el prefijo nano significa una milmillonésima parte del metro o 10^{-9} m. Debido a que esta magnitud muchas veces es difícil de visualizar, los ejemplos dados a continuación nos pueden ayudar a hacernos una idea de lo que esto significa:

- Una hoja de papel tiene un grosor aproximado de 100.000 nm.
- Un cabello rubio tiene un diámetro de 15.000 a 50.000 nm; y si es negro su diámetro es probable que esté entre 50.000 y 180.000 nm.

- Una hebra de DNA tiene 2,5 nanómetros de diámetro.
- Un único átomo de oro tiene un diámetro de $\frac{1}{3}$ de nm.
- Un nm es aproximadamente lo que crece una uña en un segundo.

El rango de la nanoescala va desde el nivel atómico, de alrededor de 0,2 nm, hasta los 100 nm (Figura 1). Dentro de este rango los NMs pueden tener propiedades muy diferentes, tanto por un aumento sustancial de la superficie, en relación con la masa, como por los efectos cuánticos que tienen lugar en estas dimensiones, lo que lleva a cambios significativos en las propiedades físicas (Buzea et al., 2007; FDA, 2007).

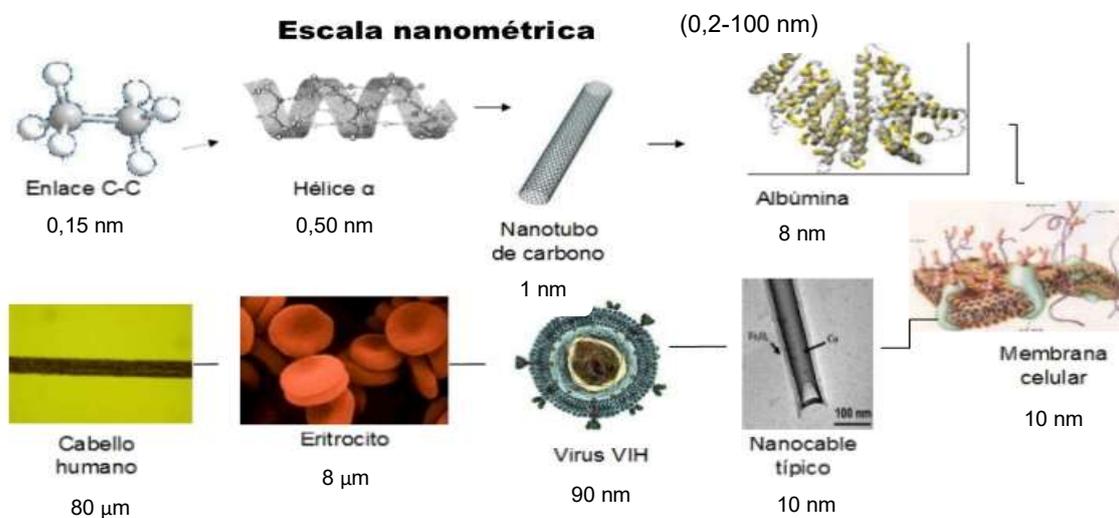


Figura 1. Visualización de la escala nanométrica (Adaptado de <http://es.slideshare.net/joseigna80/presentacin-master-nanotubos-jose-ignacio>).

1.2.1. Características físico-químicas

Los recientes avances en áreas como la microscopía han dado a los científicos nuevas herramientas para entender los fenómenos que se producen de forma natural cuando la materia se organiza en la nanoescala. Ésta es la escala en la que dominan los efectos cuánticos en las propiedades de los materiales. Además, el hecho de que la mayoría de los procesos biológicos ocurran en la nanoescala hace que se puedan generar modelos para mejorar y construir nuevos procesos en el campo de la medicina, del tratamiento de imágenes, de la informática, de la impresión, de la catálisis química, de la síntesis de materiales, y de muchos otros campos. En esta escala, las superficies e interfases juegan un papel importante en las propiedades de los materiales y en sus interacciones (Buzea et al., 2007).

Los principales parámetros característicos de las NPs son su tamaño, forma, características de la superficie, su carga eléctrica y su estabilidad.

a) Tamaño

El pequeño tamaño de las NPs, que constituye su principal característica diferencial, les confiere propiedades importantes desde el punto de vista toxicológico, pues al disminuir el tamaño se produce un considerable aumento del área y un mayor número de átomos en la superficie, lo que aumenta la reactividad de la partícula.

En general, cuanto más reactiva es una sustancia, desde un punto de vista biológico, más tóxica es. Esto hace que una determinada masa de nanomateriales en forma de NPs sea más reactiva que la misma masa de material a escala mayor (Buzea et al., 2007).

b) Superficie

Cuanto más pequeña sea una partícula de cualquier material, mayor es su superficie en relación con su masa. Con frecuencia su reactividad, y por tanto su toxicidad, se ven también aumentadas. En los sistemas nanométricos, las superficies pasan a jugar un papel más importante que el que tenían en los sistemas macroscópicos. Esto es así porque al reducir la escala, el número de átomos que tenemos en la superficie, con respecto al número de átomos que tenemos en volumen, va a aumentar drásticamente. Una de las características de las NPs es que la relación entre el número de átomos superficiales y el tamaño de la partícula es de carácter exponencial (Figura 2). La superficie específica de una partícula es inversamente proporcional a su tamaño. Así, la reactividad química de una partícula depende de su superficie, ya que las reacciones químicas tienen lugar en ella. Si además, la superficie de una partícula se ha modificado para lograr un determinado comportamiento, esto puede dar lugar a interacciones inesperadas con importantes moléculas biológicas (Oberdörster et al., 1996; Cassee et al., 2002; Huang et al., 2004; Warheit, 2004; Yang et al., 2005).

Diámetro de la partícula (µm)	Partículas (cm ⁻³)	Área de superficie de las partículas (µm ² /cm ³)
5	153.000.000	12.000
20	2.400.000	3.016
250	1.200	240
5.000	0.15	12

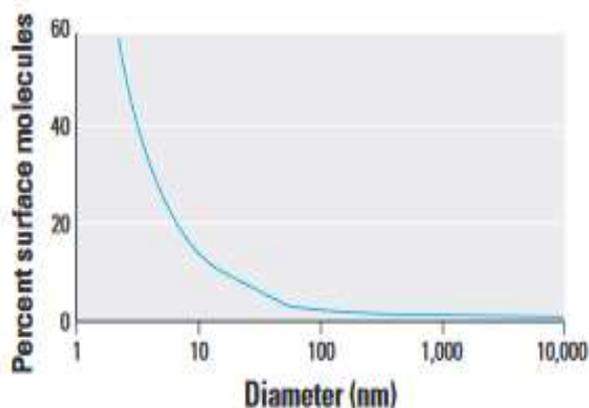


Figura 2. Demostración de la disminución del número de átomos en la superficie al aumentar el tamaño de la partícula (Adaptado de Oberdörster et al., 2005).

El incremento de la superficie de reactividad predice que las NPs van a mostrar una actividad biológica mayor por masa, en comparación con partículas más grandes. Esta actividad biológica puede ser positiva y deseable, como actividad antioxidante, portadores de fármacos terapéuticos, penetración de barreras celulares para liberar fármacos, etc., o negativos e indeseables como toxicidad, inducción de estrés oxidativo, disfunción celular, etc., o una mezcla de los dos.

Por ello, las propiedades relacionadas con la superficie, como las eléctricas, mecánicas, magnéticas, ópticas o químicas de los NMs son diferentes a las de los mismos materiales a escala no nanométrica (Buzea et al., 2007). Es importante conocer estas propiedades para entender, predecir y gestionar el riesgo potencial que pueden representar para las personas.

Que las NPs tienen una relación superficie/volumen muy elevada, se demuestra en el siguiente ejemplo: un cubo de 1 cm por cada lado tiene 6 cm² de superficie. Pero si ese volumen se llena con cubos de 1 mm de lado (que serían 1.000 cubos de tamaño milimétrico), cada una de las cuales tiene una superficie de 6 mm², la superficie total es de 60 cm². Cuando el centímetro cúbico se llena de cubos de tamaño micrométrico, el total de superficie es de 6 m². Si este cubo se llena con cubos de 1 nanómetro de tamaño, su superficie total llega a 6.000 m² (60.000.000 cm²; Figura 3). En otras

palabras, un solo centímetro cúbico de NPs cúbicas tiene una superficie total de un tercio más grande que un campo de fútbol (NNI).

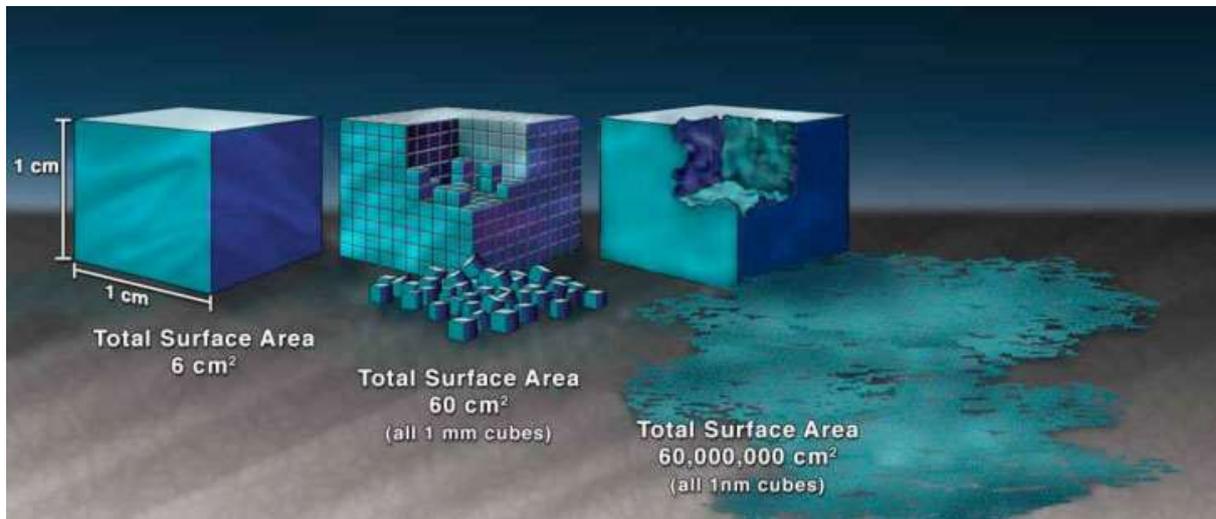


Figura 3. Ilustración que demuestra el efecto del incremento de superficie que proporcionan los materiales nanoestructurados (NNI).

c) Forma

Los MNMs pueden tener diferentes formas (esfera, fibra, tubo, anillo, hojas...). De hecho, existen materiales de la misma composición química con distintas formas dependiendo de su proceso de síntesis. La forma del NM afecta a la superficie expuesta, así que van a tener propiedades distintas en función de ella (Xiao y Qi, 2011). Se ha comprobado que, en términos generales, la toxicidad es mayor para las NPs con forma tubular, seguida de formas irregulares y sería menor para las NPs esféricas, considerando iguales el resto de parámetros toxicológicos. La toxicidad parece, por tanto, estar agravada por la forma fibrosa o filamentosa de las NPs (Buzea et al., 2007). Esto podría ser debido a que las esferas exponen menos superficie por volumen que las otras formas no esféricas.

d) Carga eléctrica (Potencial Z)

La carga eléctrica de los NMs 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 NPs.

La intensidad de esta carga eléctrica tendrá un efecto muy importante en la dinámica de agregación de las NPs en dispersión, ya que las fuerzas de repulsión

electrostáticas están contrapuestas con la tendencia a la agregación, debida a las fuerzas de Van der Waals. El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Su medida proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de dispersión electrostático. 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.

El potencial Z es una medida de la estabilidad de una dispersión coloidal, debido a que éste es un buen índice de la magnitud de la interacción repulsiva entre partículas coloidales.

e) Estabilidad

Las NPs tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados; de hecho, las NPs no suelen encontrarse aisladas. El patrón de aglomeración y/o agregación vendrá determinado por su estabilidad en un medio biológico determinado. Cuanta mayor sea la estabilidad de las NPs en cuestión, menor será el nivel de agregación o aglomeración. Los aglomerados son grupos de NPs unidas mediante fuerzas relativamente débiles del tipo Van Der Waals, electrostáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos. Por el contrario, los agregados son grupos de partículas fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil. El nivel de agregación cambiará el tamaño de la NP y, por tanto, su superficie, modificando su reactividad (Oberdörster et al., 2005; Buzea et al., 2007). Este nuevo tamaño puede estar en ocasiones fuera de la nanoescala, por lo que pasarían a comportarse como NPs micrométricas.

La estabilidad de las NPs viene determinada por el conjunto de las características anteriormente nombradas, aunque cabe destacar el tipo de material, la superficie total, la carga eléctrica y las interacciones de las NPs con el medio. Otros factores como el pH y la presencia o ausencia de materia orgánica también pueden jugar un papel importante (Baalousha, 2009)

1.3. Clasificación de las NPs

Las NPs se pueden clasificar según su origen, natural o antropogénico, o según sus propiedades físicas.

1.3.1. Según su origen

a) *NPs de origen natural*

Las NPs existen en el medio ambiente desde el comienzo de la historia de la Tierra y se encuentran ampliamente distribuidas por tierras, océanos, aguas superficiales y subterráneas, e incluso en los organismos vivos. Las NPs son abundantes en la naturaleza porque se producen en muchos procesos naturales incluyendo reacciones fotoquímicas, erupciones volcánicas, fuegos forestales o simplemente la erosión (Smita et al., 2012). Los eventos naturales como tormentas de polvo, erupciones volcánicas y fuegos forestales pueden producir una amplia cantidad de materiales nanoparticulados que afectan profundamente la calidad del aire (NTP 797). Los aerosoles generados por la actividad humana se estima que son sólo el 10% del total, mientras que el 90% restante se atribuye a origen natural (Taylor, 2002). Se estima que los componentes más abundantes del total atmosférico de aerosoles son, en orden decreciente en masa, (i) aerosoles minerales resultado de la deflación del suelo (erosión por viento), (ii) resultado de la acción volcánica (16,8 Tg), (iii) sales marinas (3,6 Tg), (iv) sulfatos naturales y antropogénicos (3,3 Tg), (v) productos de la combustión de biomasa con exclusión de hollín (1,8 Tg), (vi) fuentes industriales que incluyen hollín (1,4 Tg), (vii) hidrocarburos no-metanos naturales y antropogénicos (1,3 Tg), (viii) nitratos naturales y antropogénicos (0,6 Tg), y (ix) restos biológicos (0,5 Tg). En estos ejemplos, Tg denota terragramos, que equivale a 10^{12} g (Buseck y Pósfai, 1999).

b) *NPs de origen antropogénico*

Las personas hemos creado NMs durante miles de años, desde productos de la combustión simple (con tamaño por debajo de varios nm) a la cocción de alimentos. Más recientemente procesos tales como los que tienen lugar en la industria química, soldaduras, refinamiento y fundición de minerales, combustión en motores de vehículos y aviones (Rogers et al., 2005), combustión de lodos pulverizados de depuradora (Seames et al., 2002), y combustión de carbón y fuel para la generación de energía (Linak et al., 2000), son otros procesos generadores de NMs. Hay que señalar que todos estos procesos generan NMs, pero de manera no intencionada.

Las NPs generadas deliberadamente se producen mediante las llamadas nanotecnologías. Los métodos para la obtención de NPs son, a grandes rasgos, de dos tipos: los llamados “*top-down*”, en los que se llega a NMs sometiendo los materiales convencionales a diversos procesos y los “*bottom-up*” en los que se construyen NPs a partir de átomos o moléculas (Oberdörster et al., 2005). Son ejemplos de este tipo las NPs derivadas de la arcilla para reforzar y aumentar la resistencia del plástico, las

utilizadas en la fabricación de resinas para acabados del exterior de vehículos, y las que modifican propiedades ópticas de algunos materiales que se utilizan en cosmética. A pesar de que estos MNMs ya están en el mercado desde hace un cierto tiempo, constituyen una pequeña parte de los NMs presentes en el ambiente (Buzea et al., 2007). La Tabla 1 esquematiza las distintas fuentes naturales y antropogénicas enumeradas.

Tabla. 1. Fuentes naturales y antropogénicas de los NMs (Adaptado de Oberdörster et al., 2009).

Natural	Antropogénico	
	No intencionado	Intencionado
Conversión de gas a partícula	Motores de combustión interna	Nanopartículas diseñadas
Fuegos forestales	Plantas de energía	<i>(tamaño y forma controladas,</i>
Volcanes (lava ardiente)	Incineradoras	<i>diseñadas para una funcionalidad)</i>
Virus	Aviones	<i>Metales, semiconductores, óxidos de metales,</i>
Magnetita biogénica:	Humos de metales	<i>carbón, polímeros, nano-esferas, -alambres,</i>
<i>bacteria magnetotactica</i>	<i>(fundición, soldadura, etc.)</i>	<i>-agujas, -tubos, -proyectiles, -anillos, -plaquetas;</i>
<i>protocistas, moluscos</i>	Humos y vapores de polímeros	<i>no tratadas, cubiertas</i>
<i>artópodos, peces, pájaros</i>	Otros vapores	<i>(nanotecnología aplicada a muchos productos:</i>
<i>cerebro humano, ¿meteoritos?</i>	Superficies calentadas	<i>cosmética, medicina, fábricas, electrónica, óptica,</i>
Ferritina (12,5 nm)	Freír, asar, asar a la parrilla	<i>pantallas, etc.)</i>
Micropartículas (<100 nm)	Motores eléctricos	
<i>(células activadas)</i>		

1.3.2. Según sus características físicas

Las NPs suelen clasificarse en función de sus dimensiones, morfología, composición, uniformidad y aglomeración (Buzea et al., 2007).

a) Dimensionalidad

La forma o morfología de las NPs juega un papel importante en su toxicidad, pero para clasificar las NPs es útil hacerlo según su número de dimensiones (NTP 797);

- NMs tridimensionales (3D): son los materiales que tienen las tres dimensiones en la escala nanométrica. Esto incluye películas finas, coloides y NPs libres con varias morfologías: nanocristales, fullerenos y quantum dots.
- NMs de dos dimensiones (2D): son los materiales que tienen dos dimensiones en la escala nanométrica. Esto incluye las películas 2D: nanotubos y los nanohilos.
- NMs de una dimensión (1D): son los materiales con una dimensión en la escala nanométrica. Estructuras que se utilizan en los recubrimientos de superficies o películas finas en los que sólo su grosor es de orden nanométrico.

Ejemplos de NMs:

Fullerenos:

Son estructuras cerradas formadas por átomos de carbono dispuestos en forma de pentágonos y hexágonos a modo de “nanobalones” de fútbol. Entre sus propiedades físicas destaca la de que son capaces de resistir presiones extremas y recuperar su forma original cuando cesa la presión. Se usan como lubricantes, catalizadores, semiconductores, combinados con nanotubos de carbono en nanofarmacología, por ejemplo para dianas farmacológicas.

Quantum dots:

A veces se les refiere como átomos artificiales. Los *quantum dots*/puntos cuánticos constituyen un conjunto de materiales entre los 2 y los 10 nm, que pueden estar compuestos por metales, óxidos metálicos o materiales semiconductores, que ofrecen propiedades electrónicas, ópticas, magnéticas y catalíticas muy determinadas. Una característica principal de los puntos cuánticos es la capacidad que tienen para dar lugar a diferentes colores de luz, lo que se logra modificando el tamaño de los nanocristales individuales. Esta propiedad permite que se utilicen en técnicas del mercado fluorescente en aplicaciones biomédicas.

Nanotubos de carbono:

Pueden describirse como un tubo cuya pared es una malla de agujeros hexagonales. También es posible obtener nanotubos de varias capas, a modo de varios tubos concéntricos. Son muy destacables sus propiedades eléctricas y mecánicas. Son grandes superconductores capaces de resistir el paso de corrientes elevadísimas, de densidades de corriente de hasta mil millones de amperios por metro cuadrado, y, por otra parte su resistencia mecánica es sesenta veces superior a la de los mejores aceros; a su vez son ligeros y flexibles ya que su peso específico es más de seis veces inferior al de los mencionados aceros. También es de destacar la estabilidad de sus propiedades térmicas y químicas. Una de las aplicaciones de los nanotubos de carbono es formar parte de las pantallas de televisión sustituyendo a las actuales de LCD, dando lugar a mejores resoluciones y calidad de imagen, basándose en la propiedad de los nanotubos de emitir luz.

Nanohilos:

Son también estructuras alargadas que destacan por sus propiedades como conductores o semiconductores. Se han obtenido nanohilos de diversos materiales

como silicio, cobalto, oro y cobre. Sus aplicaciones más importantes pertenecen al campo de la nanoelectrónica.

Grafeno:

En el grafeno los átomos de carbono se unen en láminas planas de un átomo de espesor, formando un panal de abejas hexagonal (con un átomo en cada vértice). El grafeno es un semiconductor que puede operar a escala nanométrica y a temperatura ambiente, con propiedades que ningún otro semiconductor ofrece. Este material ha llegado para revolucionar la electrónica permitiendo fabricar dispositivos electrónicos mucho más pequeños que cualquiera de los que existen actualmente.

b) Morfología

Como ya se ha descrito en el apartado 1.2.1.c, las NPs pueden tener diferentes formas y éstas afectarán a la superficie expuesta y, consecuentemente, a su reactividad (Buzea et al., 2007; Xiao y Qi, 2011). Por este motivo, la morfología de los NMs adquiere un papel fundamental en este tipo de estudios.

c) Composición

Las NPs pueden estar compuestas por un único material o por más de un material. Las NPs encontradas en la naturaleza están a menudo formando aglomeraciones de materiales con varias composiciones, mientras que los más puros, de una única composición, suelen ser los sintetizados mediante nanotecnologías (Buzea et al., 2007).

d) Uniformidad y aglomeración

Basados en su composición química y en sus propiedades electromagnéticas, las NPs pueden existir dispersas en aerosoles, como suspensiones/coloides o en aglomerados/agregados. Las NPs tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados; de hecho, las NPs no suelen encontrarse aisladas. Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las NPs en el organismo y también pueden modificar su toxicidad pues, en una estructura relativamente compacta, el área de la superficie específica expuesta es menor, teóricamente, que la de una estructura abierta o tipo cadena. Es, por lo tanto evidente, que hay que tener en cuenta los aglomerados de NPs, su tamaño y la reactividad de su superficie cuando se consideran las regulaciones ambientales y de salud de los nuevos materiales (Oberdörster et al., 2005; Buzea et al., 2007).

1.4. Exposición a NPs

Como se indica a continuación las fuentes de exposición a NPs pueden ser variadas.

1.4.1. NMs en productos de consumo

Tras lo comentado, es obvio que el campo de la nanotecnología ha ido creciendo de manera muy significativa en la última década. Para poder documentar la incidencia de la nanotecnología en el mercado de consumo, el *Woodrow Wilson International Center for Scholars* y el *Project Nanotechnology* crearon el *Nanotechnology Consumer Product Inventory* (CPI) en 2005, recopilando 54 productos (Vance et al., 2015). Desde entonces, la lista ha seguido creciendo recopilando en Marzo de 2015 un total de 1814 productos, lo cual representa un incremento de 30 veces los 54 productos originales (Tabla 2).

Tabla 2. Número de productos en el CPI a lo largo del tiempo (Vance et al., 2015).

Year	Total products	Products added	Products archived	Data collection notes
2005	54	54	0	Beginning of CPI as a static pdf document.
2006	356	302	0	Launch of the online CPI.
2007	580	278	0	Nanoscale silver emerged as most cited nanomaterial.
2008	803	223	0	Health and fitness products represented 60% of the inventory.
2009	1015	212	107	Added archiving function to the CPI.
2010	1015	0	0	No data collected.
2011	1015	0	0	No data collected.
2012	1438	426	0	Beginning of CPI 2.0 project, focus on adding new products.
2013	1628	190	288	Launch of crowdsourcing component. Extensive effort put into adding and archiving products.
2014	1814 ^a	238 ^a	223 ^a	Extensive effort put into adding and archiving products.

^aThe CPI now has crowdsourcing capabilities, so these numbers are a snapshot in time and will not represent the CPI at the time of reading.

En el CPI, las entradas se agrupan en ocho categorías de bienes de consumo que se basan en los sistemas de clasificación de productos de consumo disponibles públicamente (Figura 4). La categoría de *Salud y Fitness* incluye el mayor listado de productos en el CPI, comprendiendo el 42% de los productos mencionados. Dentro de la categoría de *Salud y Fitness*, los productos de cuidado personal (por ejemplo, cepillos de dientes, lociones y herramientas de peluquería) comprenden la sub-categoría más grande (39% de los productos).

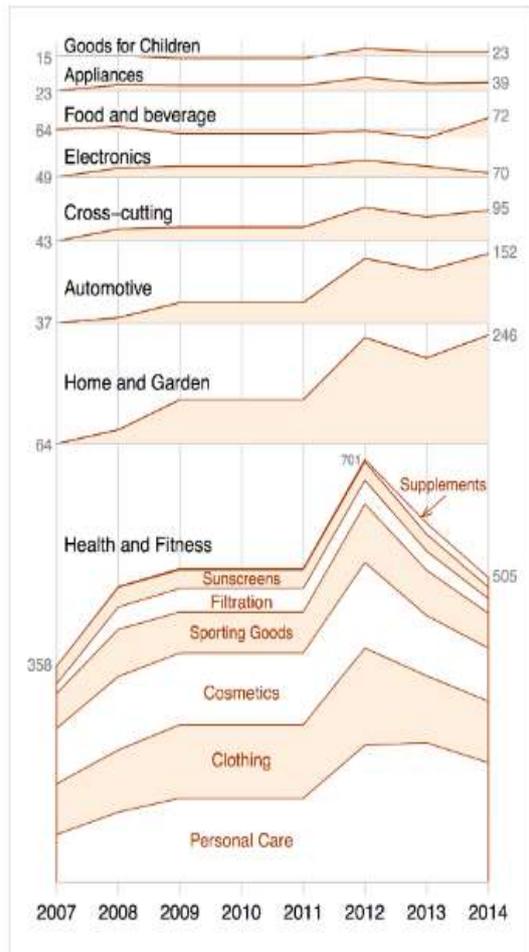


Figura 4. Número de productos disponibles a lo largo del tiempo (desde 2007) en cada categoría y en la categoría de *Salud y Fitness* (Vance et al., 2015).

De los 1814 productos enumerados en el CPI, el 47% (846 productos) están compuestos de al menos un componente NM, y 62 de esos productos, de más de un componente NM (por ejemplo, un producto compuesto por dos NMs: plata y dióxido de titanio). Hay 39 tipos diferentes de componentes de NMs que figuran en el inventario, que se han agrupado en cinco categorías principales en la Figura 5. Nominalmente, metales y óxidos metálicos constituyen el mayor grupo de composición de los NMs indicados en el inventario, apareciendo estos compuestos en el 37% de los productos indicados (Vance et al., 2015).

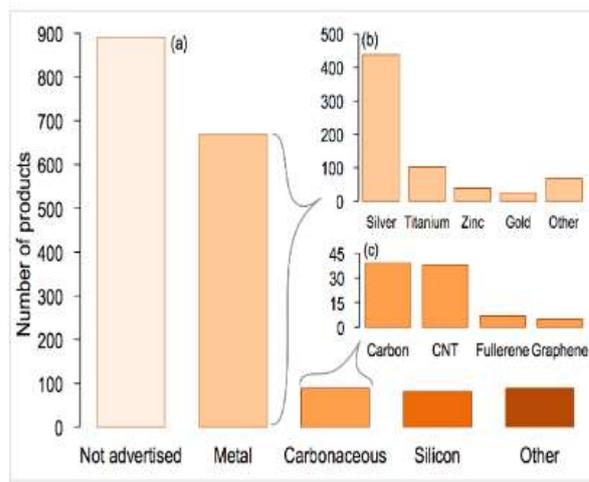


Figura 5. (a) Composición de los NMs incluidos en la lista del CPI, agrupados en 5 categorías: sin indicación, metal (incluyendo metales y óxidos metálicos), NMs de carbono (carbón negro, carbonanotubos, fullerenos, grafeno), NMs con silicio (silicio y sílica) y otros (orgánicos, polímeros, cerámicos, etc.). (b) Composición elemental de los NMs listados en la categoría de metal: plata, titanio, zinc, oro y otros metales (magnesio, óxido de aluminio, cobre, platino, hierro y óxidos de hierro, etc.). (c) NMs de carbono (CNT: carbonanotubos)(Vance et al., 2015).

negro, carbonanotubos, fullerenos, grafeno), NMs con silicio (silicio y sílica) y otros (orgánicos, polímeros, cerámicos, etc.). (b) Composición elemental de los NMs listados en la categoría de metal: plata, titanio, zinc, oro y otros metales (magnesio, óxido de aluminio, cobre, platino, hierro y óxidos de hierro, etc.). (c) NMs de carbono (CNT: carbonanotubos)(Vance et al., 2015).

El dióxido de titanio (TiO_2), el dióxido de silicio (SiO_2) y el óxido de zinc (ZnO) son los NMs que más se producen en todo el mundo (en cuanto a volumen de producción se refiere); mientras que la producción anual mundial de NPs de plata (AgNPs) representa sólo el 2% de la de TiO_2 (Piccinino et al., 2012; Keller et al., 2013). Sin embargo, las AgNPs son los NMs más populares en el CPI, ya que están presentes en 438 productos (24%). Las AgNPs son el producto de consumo más popular debido a sus propiedades antimicrobianas (Nowack et al., 2011). Además, la plata y el TiO_2 son los NMs que más se combinan con otros NMs en los distintos productos de consumo que contienen NMs (Vance et al., 2015).

Alrededor del 29% de los productos de consumo en el CPI (528 productos) contienen NMs en suspensión en una variedad de líquidos (por ejemplo, agua, loción de la piel, aceite, lubricantes para el coche, etc). El segundo grupo más numeroso en esta categoría - con 307 productos - comprende productos sólidos con NPs unidas a la superficie (por ejemplo, de cabello rizado y planchas, textiles). La Figura 6 muestra la ubicación de los nanomateriales para los que se ha identificado una composición (Hansen et al., 2009).

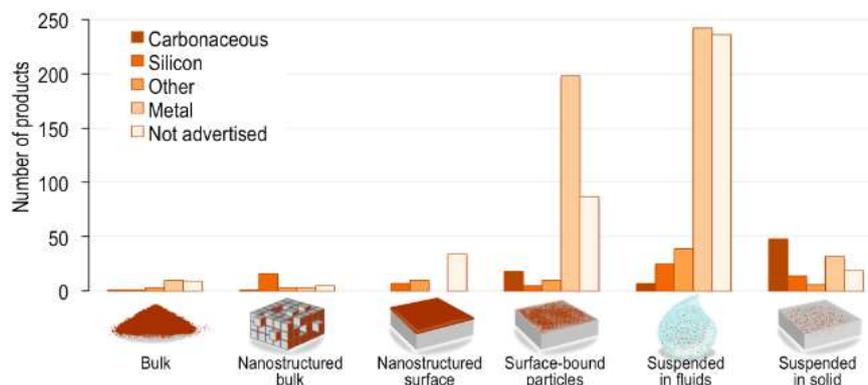


Figura 6. Localización de los NMs en productos de consumo para los cuales se ha identificado una composición NM (Vance et al., 2015).

De las 1814 entradas del inventario, 1244 se agruparon de acuerdo con los beneficios esperados de la adición de estos NMs al producto (Figura 7). Una parte significativa de los productos en el CPI (31% de los productos analizados) utilizan AgNPs en su mayoría, pero también TiO₂NPs y otros, para conferir protección antimicrobiana. NMs tales como TiO₂NPs y SiO₂NPs se utilizan en revestimientos de protección (15%) y para el tratamiento del medio ambiente (para proteger los productos contra el daño ambiental o para el tratamiento de aire y agua en el hogar). Los cosméticos (12%) contienen una variedad de NMs tales como AgNPs, TiO₂NPs, nano-orgánicos, oro, y otros. Como suplementos dietéticos (11%) también se encuentran una amplia variedad de composiciones de NMs (plata, nano-orgánicos, calcio, oro, SiO₂, magnesio, cerámica, etc.) (Vance et al., 2015).

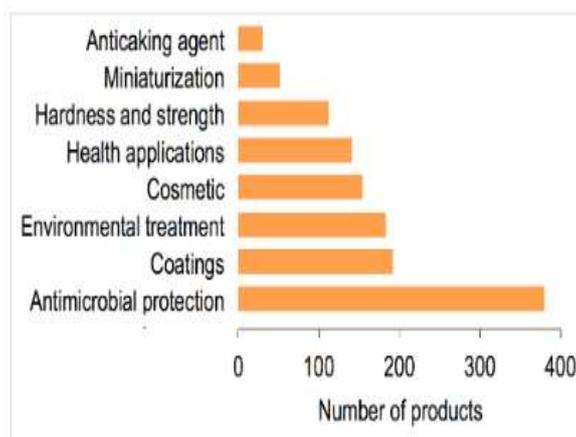


Figura 7. Beneficios esperados de incorporar aditivos NMs en productos de consumo (Vance et al., 2015).

Dado que la información crítica, como el tamaño de los NMs y la concentración, no son conocidos por la mayoría de los productos enumerados en el CPI, los riesgos reales para la salud de estos productos siguen siendo en gran parte desconocidos. Sin embargo, el CPI puede ser útil para inferir posibles vías de exposición esperadas de los productos mencionados. Para investigar esta utilidad, se analizaron un subconjunto de 770 productos del CPI para determinar su forma más probable de exposición (Figura 8).

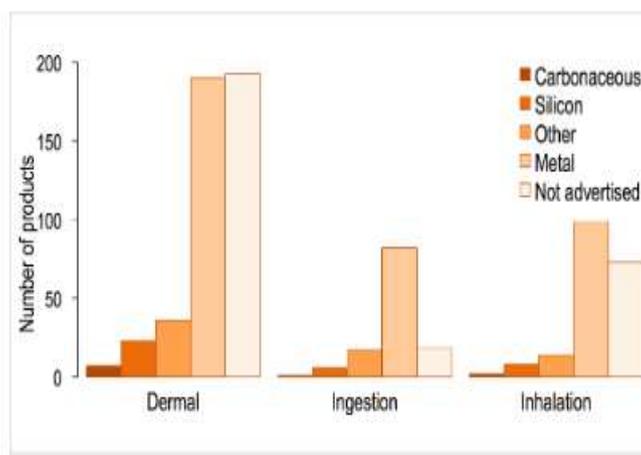


Figura 8. Vías de exposición potenciales esperados del uso normal de productos de consumo, agrupados por categorías según la composición del NM (Vance et al., 2015).

Como los metales y óxidos metálicos son la composición NM más común en el CPI, se asume que también son los materiales más probables a los que serán expuestos los consumidores durante el uso normal del producto a través de la dermis, ingestión y rutas de inhalación. Por el contrario, los productos con NMs de composición desconocida tienen más probabilidades de exposición por vía cutánea (Vance et al., 2015).

1.4.2. Exposición ocupacional

Como ya se ha comentado, la exposición a MNMs no es la más relevante en cuanto a volumen; aun así, cobra una mayor importancia en el caso de las exposiciones ocupacionales. Los trabajadores pueden estar expuestos a NPs debido a procesos cuyo objetivo no es la producción de nano-objetos ni la aplicación de estos, pero durante dichos procesos se pueden generar partículas ultrafinas (PUF). Las PUF se emiten involuntariamente en algunos procesos industriales, especialmente durante los procesos mecánicos y térmicos o durante la combustión (Tabla 3).

También se puede estar en contacto con dichos MNMs debido a la exposición durante la fabricación y el uso intencional de nano-objetos y MNMs: NPs generadas deliberadamente mediante las nanotecnologías. En este caso la exposición se puede

dar en todas las etapas de producción. Desde la fabricación manipulación, traslado, embalaje y almacenaje de productos, a limpieza, conservación y mantenimiento de equipos e instalaciones, pasando por tratamiento de residuos y operaciones con NMs (corte, pulido, mecanizado,...) (IRSAL, 2011).

Tabla 3. Fuentes potenciales de emisiones secundarias de PUF.

Tipo de proceso	Ejemplo de fuentes de emisión
Procesos térmicos	Fundición y refinado de metales (acero, aluminio, hierro, etc.). Galvanización, etc. Soldadura, corte de metal (láser, térmico, etc.), humos de vulcanización, humos de negro de carbono. Tratamientos térmicos de superficies (láser, proyección térmica, etc.). Aplicación de resinas, ceras, etc.
Procesos mecánicos	Mecanizado. Lijado. Perforación. Pulido.
Combustión	Emisiones de motor diesel, gasolina o gas. Plantas de incineración, cremación. Ahumado de alimentos. Calefacción de gas.
Otros	Polvo generado en los procesos de manipulación de pinturas, pigmentos, fabricación de cemento, etc.

Son varios los ámbitos industriales en los que se pueden generar NPs de forma intencionada:

- El sector de las nanotecnologías, el desarrollo de la investigación primaria (universidades y otros grupos de investigación).
- Empresas dedicadas al desarrollo, producción y uso de los NMs o sus productos (alimentación, automoción, electrónica, industrias de semiconductores, etc.)
- En empresas químicas y farmacéuticas; fabricación de cosméticos y bloqueadores solares, productos para el cuidado de la piel (óxidos metálicos, tales como el dióxido de titanio, óxido de hierro u óxido de zinc), etc.

Los parámetros que influyen en el grado de exposición no son sólo la naturaleza de los nano-objetos y la concentración de exposición, sino también la duración y la frecuencia de esta exposición, los métodos de síntesis, la capacidad de estos NMs de pasar al ambiente de trabajo en polvo, gotas o aerosoles, etc.

1.4.2.1. Valoración y medición de NPs. Valores límites ambientales.

La detección de las NPs es compleja, tanto en gases como en líquidos. En la actualidad los instrumentos disponibles pueden detectar partículas tan pequeñas como de 3 nm, pudiendo alcanzar el límite de 1 nm. Recientemente se han desarrollado procedimientos alternativos, que implican la utilización de espectrometría de masas lo que permite medir de forma muy precisa la composición química de las NPs de tamaños específicos dentro de un gas. La microscopía electrónica es el método habitual para estudiar el tamaño, forma y estructura de las partículas en líquidos, pudiendo detectar partículas inferiores a 10 nm. Cuando se complementa con un espectrómetro específico, también se puede determinar la composición química, al menos para las NPs más grandes.

En un futuro cercano se dispondrá de valores límite para un pequeño grupo de MNMs. Los límites de exposición profesional basados en la concentración másica, que se aplican para materiales pulverulentos en su forma habitual macroscópica, podrían no ser adecuados para los NMs de la misma composición química. En la actualidad se han desarrollado algunos límites de exposición para algún tipo de NP. Por ejemplo el NIOSH (NIOSH, 2009) propone valores límite para algunos compuestos como:

- Partículas de dióxido de titanio (TiO₂NP):

Partículas finas, con diámetro >0,1 µm: OEL* = 1,5 mg/m³

(*OEL *Occupational Exposure Limit*: límite de exposición ocupacional).

Partículas ultrafinas (que se pueden asemejar a NPs), con diámetro <0,1 µm: OEL = 0,1 mg/m³.

El Instituto Alemán de Seguridad, también ha propuesto límites de referencia para algunos NMs:

- Para los metales, óxidos metálicos y otros NMs biopersistentes con una densidad >6.000 kg/m³, propone un límite de 20.000 partículas/cm³ (en el rango de medición entre 1 y 100 nm), como concentración que no debe superarse.
- Para NMs biopersistentes con una densidad <6.000 kg/m³, propone un límite de 40.000 partículas/cm³ (en el rango de medición entre 1 y 100 nm), que no debe ser superado.
- Para nanotubos de carbono, se propone una concentración de fibras menor de 10.000 f/m³, basándose en su posible similitud con las fibras de amianto.

1.5. Entrada y distribución en el organismo

Mientras que muchas de las rutas de entrada y translocación de las NPs y NMs han sido demostradas, otras son todavía una hipótesis y necesitan ser estudiadas con más detalle (Figura 9). Las ratios de translocación, acumulación y retención en sitios diana son todavía desconocidas.

Las características físico-químicas de los NMs y su vía de penetración van a determinar los patrones de absorción y por tanto su localización en el tejido diana (Figura 10).

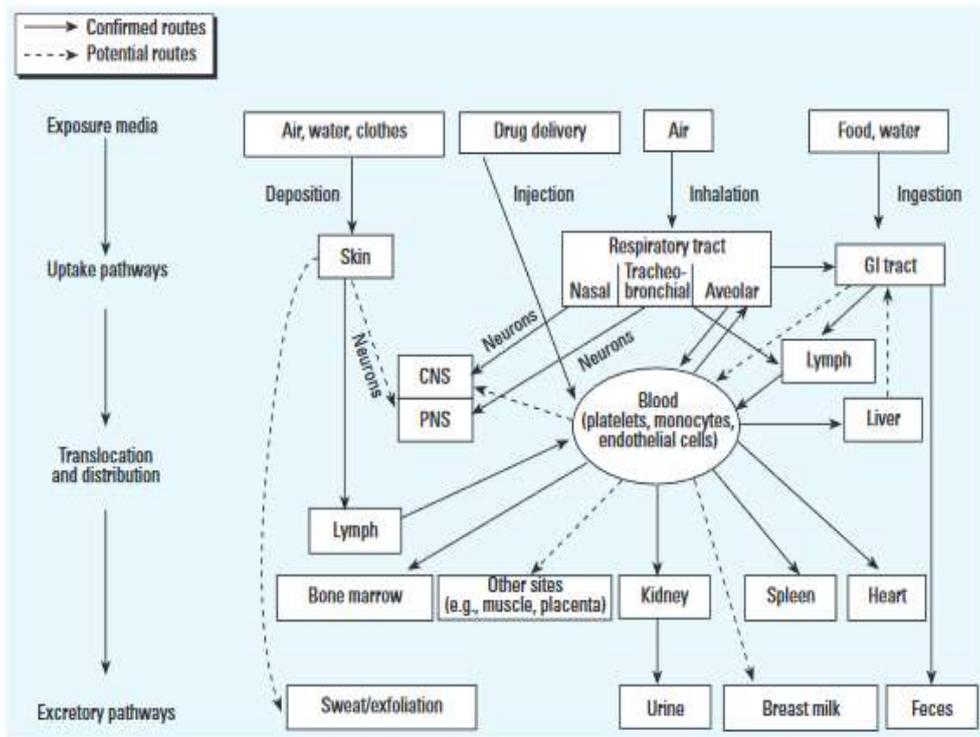


Figura 9. Rutas de entrada y translocación de los NMs. Algunas de ellas demostradas y otras son sólo hipótesis (Oberdörster et al., 2005).

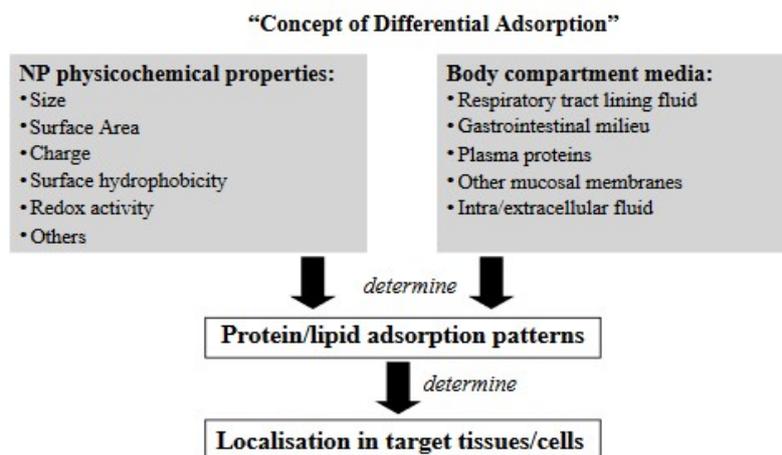


Figura 10. Conceptos de absorción diferencial. Las propiedades físico-químicas de las NPs influyen en la absorción de las proteínas y lípidos por los diferentes compartimentos del cuerpo y esto determina el destino de las NPs en el organismo (Adaptado de Muller y Heinemann, 1989; Oberdörster et al., 2009).

1.5.1. Principales vías de penetración

La piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal están constantemente en contacto con el ambiente. Mientras que la piel es generalmente una barrera efectiva para los elementos foráneos, los pulmones y el tracto gastrointestinal son más vulnerables. Estas tres vías son los puntos más importantes de entrada para las NPs naturales o antropogénicas.

Aunque la vía de inyección o de implantes son otras posibles rutas de exposición, en la actualidad se consideran no importantes frente a los MNMs (Buzea et al., 2007). En los puestos de trabajo la vía de entrada más común de las NPs en el organismo es la vía inhalatoria, especialmente si se trata de un material poco soluble, aunque no hay que descartar la dérmica y la ingestión (Oberdörster et al., 2005).

Debido a su tamaño, las NPs pueden translocarse desde los portales de entrada a los sistemas circulatorio y linfático hasta llegar a órganos y tejidos. Con respecto a la exposición, hay pruebas de que las NPs pueden ser capaces de penetrar las membranas celulares y, por lo tanto, entrar en distintos tipos de células, mientras que las partículas más grandes pueden ser excluidas. Si las NPs pueden penetrar las membranas celulares, se puede suponer que éstas tienen potencial para llegar a otros órganos. En el interior de las células se pueden dar interacciones de las NPs con diversas biomoléculas, como el DNA y el RNA, pudiendo inducir especies reactivas de oxígeno y el consecuente estrés oxidativo experimentado por las células. Algunas NPs pueden producir daños irreversibles a las células por estrés oxidativo y/o orgánulos

maltrechos (Buzea et al., 2007). En los mamíferos, los distintos portales de entrada tienen mecanismos de defensa frente a materiales dañinos. No obstante, estas defensas pueden no ser siempre efectivas frente a las NPs (Oberdörster et al., 2005). Hay que enfatizar que no todas las NPs producen efectos adversos en la salud. La toxicidad en las NPs depende de varios factores, incluyendo el tamaño, la agregación, composición, cristalinidad, superficie, etc. Las enfermedades asociadas con las NPs inhaladas son similares a las asociadas con otras partículas presentes en el aire: asma, bronquitis, enfisema, cáncer de pulmón y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer. Por lo que respecta a las NPs absorbidas en el tracto gastrointestinal sus efectos se asocian con la enfermedad de Crohn y el cáncer de colon (Buzea et al., 2007).

En la actualidad hay muy poca información acerca de cómo las NPs se distribuyen dentro de las células una vez absorbidas. Para llevar a cabo una evaluación de riesgo fiable es esencial especificar el tamaño exacto y otras características de cada producto con NPs, ya que el cambio en el tamaño, forma y otras propiedades físico-químicas de una NP puede dar lugar a cambios en los efectos adversos inducidos.

a) *Vía inhalatoria*

Los NMs inhalados, dependiendo de su tamaño, forma y composición química, son capaces de penetrar y depositarse en los diferentes compartimentos del aparato respiratorio: en la región extratorácica incluyendo la boca, fosas nasales, la laringe y la faringe; la región traqueo-bronquial, de la tráquea a los bronquios; y la región alveolar que comprende los bronquiolos y los alvéolos. La deposición puede tener lugar como consecuencia de la sedimentación gravitatoria, la impactación inercial, la intercepción de las partículas con la superficie de contacto, por fenómenos de difusión relacionados con los movimientos aleatorios de las partículas muy finas y por la atracción electrostática debida a su carga.

Hay diferencias significativas entre las NPs y las partículas de mayor tamaño en cuanto a su comportamiento durante la deposición y el despeje en el tracto respiratorio. Las partículas de alrededor de 300 nm son las que se depositan menos en el tracto respiratorio ya que son demasiado gruesas para que los fenómenos de difusión les puedan influir y, por otro lado, son demasiado pequeñas para que los fenómenos de impactación y sedimentación tengan influencia sobre ellas. A partir de este valor la deposición crece de manera significativa siendo la difusión el fenómeno predominante. Las PUF superiores a 10 nm se depositan mayoritariamente en la región alveolar y las inferiores a 10 nm se depositan principalmente en la región extratorácica y en una menor

cantidad en la región traqueo-bronquial (Oberdörster, 2001; Oberdörster et al., 2005; Elder et al., 2006).

Una vez depositadas las NPs, al contrario que las partículas de mayor tamaño, se translocan a regiones extrapulmonares y alcanzan otros órganos por diferentes rutas y mecanismos. Uno de ellos involucra la transcitosis a través del epitelio del tracto respiratorio al intersticio y accede a la circulación sanguínea directamente o a la vía linfática, distribuyéndose por todo el cuerpo. El otro es un método que involucra terminaciones nerviosas sensoriales incrustadas en el epitelio de las vías respiratorias, seguido de translocación axonal hasta los ganglios y estructuras del sistema nervioso central (Schlesinger et al., 1977; Kreyling y Scheuch, 2000; U.S. EPA, 2004). Una vez las NPs han llegado a la sangre, éstas se pueden distribuir por todo el cuerpo. El hígado es el órgano que más recibe las NPs vía las células de Kupffer, seguido por el páncreas (Akerman et al., 2002). También se ha observado la distribución al corazón, riñones y órganos del sistema inmunológico (bazo y médula ósea; Kreuter, 2001, 2004; Kreuter et al., 2002).

La depuración de las partículas depositadas en el tracto respiratorio se lleva a cabo básicamente a través de dos procesos: a) translocación física de partículas por diferentes mecanismos y b) procesos químicos (Ferin, 1994; Takenaka et al., 2001; Oberdörster et al., 2004; Oberdörster et al., 2005; Sioutas et al., 2005; Borm et al., 2006; Peters et al., 2006).

A. Procesos físicos de depuración:

- Movimiento mucociliar (nasal, traqueobronquial)
- Fagocitosis de macrófagos (traqueobronquial, alveolar)
- Endocitosis epitelial (nasal, traqueobronquial, alveolar)
- Translocación intersticial (traqueobronquial, alveolar)
- Drenaje linfático (traqueobronquial)
- Circulación sanguínea (traqueobronquial, alveolar)
- Neuronas sensoriales (nasal, traqueobronquial)

B. Procesos químicos de depuración (nasal, traqueobronquial, alveolar):

- Disolución
- Lixiviación
- Enlace proteico

b) Vía dérmica

No se han descrito efectos específicos para la salud relacionados con la exposición dérmica a PUF, aunque hay estudios que sugieren que este tipo de partículas pueden penetrar a través de los folículos pilosos, donde los constituyentes de las partículas pueden disolverse en condiciones acuosas y penetrar a través de la piel. Por otro lado, hay que tener en cuenta que, dado que la penetración directa a través de la piel ha estado descrita para partículas con un diámetro de 1.000 nm, es razonable pensar que las NPs penetraran con mayor facilidad.

La piel está compuesta por tres capas: la epidermis, la dermis y la subcutánea. La epidermis, que consta de la capa córnea exterior (estrato córneo), la capa de células espinosas (estrato espinoso), y la capa de células basales (estrato basal), forma una capa protectora muy estrecha para la dermis subyacente. La parte de epidermis más externa (estrato córneo), es de unos 10 μm de grosor y está queratinizada lo que hace difícil el paso de compuestos iónicos y moléculas solubles en agua (Hoet et al., 2004). La superficie de la epidermis está muy microestructurada con apariencia escamosa y poros para el sudor, glándulas sebáceas y folículos pilosos.

Como en muchos temas relacionados con las NPs, la penetración a través de la piel es aún tema de controversia (Borm et al., 2006), aunque varios estudios muestran que las NPs son capaces de penetrar en el estrato córneo (Corachan, 1988; Corachan et al., 1988; Blundell et al., 1989; Tinkle et al., 2003; Toll et al., 2004; Oberdörster et al., 2005; Borm et al., 2006). La penetración de las NPs a través de la piel ocurre a través de los folículos pilosos (Toll et al., 2004) y en piel flexionada (Tinkle et al., 2003) y lesionada (Oberdörster et al., 2005). La penetración intracelular también es posible como se ha demostrado en experimentos con células en cultivo (Monteiro-Riviere et al., 2005). Las lesiones en la piel representan un portal de fácil acceso de entrada, incluso para partículas más grandes (0,5-7 μm). Tinkle et al. (2003) propusieron la hipótesis de que la piel intacta cuando se flexiona- como en la muñeca- haría la epidermis permeable para las NPs. Ellos demostraron en un experimento que, en efecto, la piel flexionada, pero no la piel plana, permite la penetración de perlas fluorescentes de 1 μm hasta la dermis. Dado que la dermis está provista de sangre y macrófagos, vasos linfáticos, células dendríticas y terminaciones nerviosas (Oberdörster et al., 2005), las partículas que cruzan a través del estrato córneo y de la epidermis hacia la dermis son potencialmente reconocidos por el sistema inmune.

Un área actual de discusión es si las NPs de TiO_2 encontradas en las cremas solares comerciales son capaces o no de penetrar en la piel (Tsuji et al., 2006). Por ejemplo, la aplicación de crema solar que contiene un 8% de NPs (10 nm) en la piel humana no

mostró penetración, mientras que la emulsión aceite-agua sí mostró penetración (Tsuji et al., 2006). Sin embargo, hay que resaltar que la cantidad de NPs que penetran es muy baja, menos del 1% del total de la crema solar aplicada se encuentra en el folículo piloso (Lademann et al., 1999).

c) Vía digestiva

El tracto gastrointestinal es una barrera compleja y es la ruta más importante de entrada al cuerpo de múltiples macromoléculas. El epitelio del intestino delgado está en contacto cercano con el material ingerido, que es absorbido por las vellosidades intestinales. El grado de absorción de NPs se ve afectado por el tamaño, la superficie química y la carga, el tiempo de administración y la dosis (Hoet et al., 2004).

Como ya he dicho, la absorción a nivel del tracto gastrointestinal de las NPs depende de su tamaño, siendo menor la captación cuanto más grandes sean las NPs (Jani et al., 1990). Además, el tiempo necesario para cruzar la capa de mucus del colon también depende del tamaño de la partícula, las partículas pequeñas cruzan más rápido que las más grandes. Las partículas que penetran en el mucus llegan a los enterocitos y son capaces de translocar más allá. Hay que recordar que los enterocitos constituyen el tipo de célula epitelial de la capa superior del intestino que se encarga de la absorción de nutrientes, por lo que se podría considerar como una barrera relativa. Cuando las NPs cruzan la barrera de enterocitos y entran en contacto con la submucosa, éstas pueden entrar en el sistema linfático y los capilares, y luego llegar a cualquier órgano (Hoet et al., 2004). Hay que señalar que la cinética de las partículas en el tracto gastrointestinal depende fuertemente de la carga de las partículas. Partículas de látex cargadas positivamente se quedan atrapadas en la carga negativa del mucus, mientras que las negativas cruzan la capa de mucus y se convierten en disponibles para la interacción con las células epiteliales (Hoet et al., 2004).

Las fuentes exógenas de partículas ingeridas pueden tener distintas procedencias: comida (como colorantes, ej.: TiO_2), fármacos, agua, productos de cosmética (pintalabios y pasta de dientes) (Lomer et al., 2004), prótesis dentales (Ballestri et al., 2001) así como partículas inhaladas (Takenaka et al., 2001). Se estima que el consumo de NPs a través de la dieta en los países desarrollados es de alrededor de 10^{12} partículas/persona por día (Oberdörster et al., 2004). Estas NPs consisten mayoritariamente en TiO_2 y silicatos. Estas NPs no se degradan fácilmente y se acumulan en los macrófagos. Hay que indicar que una pequeña fracción de las NPs inhaladas también pasan al tracto gastrointestinal (Takenaka et al., 2001).

Hay pocos estudios sobre la absorción y deposición de los NMs por el tracto gastrointestinal, aunque la mayoría de ellos muestran que las NPs son capaces de atravesar el tracto gastrointestinal y eliminarse rápidamente. Las diferencias de absorción no sólo dependen del tamaño de la NP sino que también depende de la composición química de la superficie (Yamago et al., 1995). Variando las características de las NPs como el tamaño, la carga de la superficie y adjuntando ligandos o recubrimientos con surfactantes, se observa que varían los sitios específicos de entrada entre las distintas regiones del tracto gastrointestinal. El tránsito rápido de material a través del intestino (del orden de horas), junto con la constante renovación del epitelio, lleva a la conclusión de que los NMs permanecen en él durante periodos de tiempo limitados (Hoet et al., 2004). La mayoría de los estudios de ingestión de NPs han demostrado que se eliminan rápidamente: el 98% en las heces en 48 horas y la mayoría del remanente vía orina (Oberdörster et al., 2005). No obstante, otros estudios indican que ciertas NPs son capaces de translocarse a la sangre, bazo, hígado, médula ósea, nódulos linfáticos, riñones, pulmones y cerebro y que también pueden encontrarse en el estómago y en el intestino delgado (Jani et al., 1990). A pesar de lo anterior, para muchos NMs no se conoce la secuencia exacta de eventos que suceden en su translocación desde el tracto gastrointestinal a los órganos y la sangre.

1.5.2. Transporte

Ligado a lo anterior, se considera que una propiedad específica de las NPs es su capacidad para atravesar las barreras biológicas mediante un proceso de translocación. A través del tejido pulmonar, las NPs pueden pasar a la sangre y la linfa alcanzando distintos órganos como el corazón, el hígado o el bazo, pudiendo llegar incluso hasta el cerebro por medio del nervio olfativo. El término translocación se refiere al proceso mediante el cual las NPs atraviesan las barreras biológicas y aparecen en otras partes del organismo distintas a las de entrada, pero manteniendo su integridad como partícula (es decir, sin que se produzca disolución).

Se supone que la acumulación y la distribución de las NPs por el organismo pueden jugar un papel fundamental en el desarrollo de ciertas patologías en los órganos diana. Una vez que las NPs han penetrado en el organismo, existen distintas posibles rutas, entre las que podemos destacar:

a) *Vía sistema circulatorio*

Cuando las NPs han alcanzado el sistema circulatorio, pueden distribuirse a cualquier parte del cuerpo. El principal órgano diana es el hígado, seguido del bazo y

otros órganos del retículo endotelial. Algunos estudios han demostrado la localización de NPs en otros órganos como corazón y riñones (IRSAL, 2011).

b) Vía sistema nervioso

La translocación de partículas sólidas en el tracto respiratorio a través de los axones neuronales es una vía aparentemente específica de las NPs. La corta distancia que existe entre la mucosa olfativa nasal y el bulbo olfativo requiere un transporte muy corto. Desde la mucosa nasal las partículas pueden migrar por los axones de las neuronas olfativas al sistema nervioso central (Oberdörster et al., 2004).

1.5.3. Eliminación

En la mayoría de los casos las partículas que se depositan en las vías respiratorias son eliminadas del pulmón por medio de mecanismos de aclaración. Estos mecanismos pueden ser:

- **Físicos:** los mecanismos involucrados en la eliminación física difieren entre las distintas regiones del sistema respiratorio. Las NPs insolubles que se depositan en las vías respiratorias superiores y en el árbol traqueobronquial se eliminan principalmente por el transporte mucociliar hacia la nariz y la boca. Pueden, entonces, ser tragadas (y entrar en el sistema digestivo), o bien, ser rechazadas hacia el exterior (al estornudar o sonarse la nariz). En los alvéolos pulmonares, se encuentran unas células llamadas macrófagos que favorecen la eliminación de las NPs insolubles por un proceso llamado fagocitosis. Sin embargo, varios estudios sugieren que las NPs individuales, es decir no agregadas, no son eficientemente fagocitadas por los macrófagos, por lo que se puede producir una acumulación significativa de NPs en los alvéolos y una mayor interacción con las células de los mismos. Esta sobrecarga puede causar inflamación que conduzca al desarrollo de ciertas enfermedades pulmonares (IRSAL, 2011).
- **Químicos:** disolución (para las que son solubles) o fijación a los componentes de los líquidos que recubren las vías respiratorias, lo que permite su transferencia a la sangre o excreción por la orina (IRSAL, 2011).

1.6. Efectos sobre la salud

Los riesgos potenciales para la salud de una sustancia están asociados con la magnitud y duración de la exposición, con la persistencia del material en el organismo, con la toxicidad intrínseca del material, y con la susceptibilidad o estado de salud de la persona.

Dado que la nanotecnología es un campo emergente, existen incertidumbres sobre los riesgos de los MNMs sobre la salud de los trabajadores y de los consumidores. Según distintos estudios, tanto epidemiológicos como en animales y cultivos celulares, la exposición a NPs se asocia con procesos inflamatorios (que en algunos casos pueden ser una respuesta inflamatoria generalizada, inflamación aguda, inflamación pulmonar, etc.), así como con la formación de ROS que pueden dar lugar a estrés oxidativo celular y daño tisular (Ferin et al., 1992; Heyder y Takenaka, 1996; Baggs et al., 1997; Zhang et al., 1998; Stone et al., 2000; Stearns et al., 2001; Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2003; Brown et al., 2004; Hetland et al., 2004; Ramage y Guy, 2004; Warheit et al., 2004; Barlow et al., 2005; Cui et al., 2005).

La Figura 11 esquematiza algunos de los efectos biológicos asociados con la exposición a NPs.

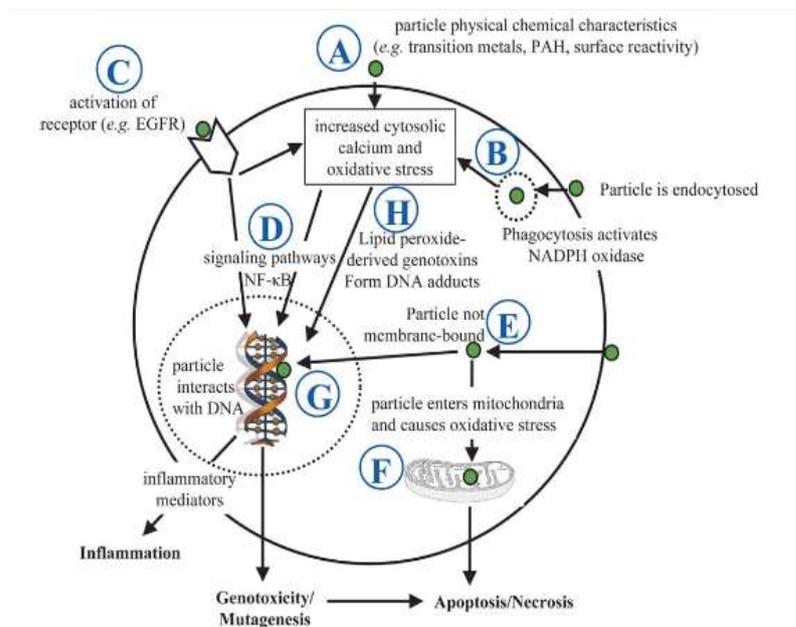


Figura 11. Interacciones celulares hipotéticas de las NPs. El diagrama muestra los efectos potenciales de las NPs con especial énfasis en el

potencial estrés oxidativo y sus consecuencias. (A) Las características asociadas a la partícula inducen peroxidación lipídica, estrés oxidativo intracelular y un incremento de la concentración de iones de calcio; (B) Las NPs pueden ser activamente endocitadas por diferentes mecanismos, incluyendo caveolas, depresiones revestidas de clatrina, o mecanismos que involucran receptores específicos. En las células fagocíticas, la fagocitosis activa la oxidasa NADPH y la generación de ROS; (C) Las partículas y sus metales asociados, así como el estrés oxidativo, pueden activar el receptor EGF; (D) Estrés oxidativo, activación del receptor e incremento de los iones de calcio activan la transcripción de genes pro-inflamatorios como el *NF-KB*; (E) Las NPs pueden entrar a la célula por difusión pasiva y no permanecer adheridas a la membrana por lo que pueden entrar en las mitocondrias; (F) y distorsionar el transporte de electrones, llevando a generar estrés oxidativo. (G) Las partículas libres pueden también entrar en el núcleo por el complejo de poros nuclear y ocasionar genotoxicidad y mutagénesis (Oberdörster et al., 2009).

Los efectos sobre la salud obviamente dependen de la relación exposición-dosis-respuesta. En los estudios *in vitro*, la práctica común es exponer células primarias o líneas celulares a concentraciones muy altas sin ninguna consideración o discusión acerca de si estas exposiciones se ajustan o no a las exposiciones que tienen lugar *in vivo*. Por ejemplo, la concentración de 100 µg/mL de NPs en medio de cultivo es una concentración extremadamente alta (pero muy utilizada) aunque es poco probable que se produzca esta situación en condiciones *in vivo*. Aunque estos estudios se utilizan para tener una primera noción del comportamiento del agente evaluado, el seguimiento y validación de los resultados debe utilizar concentraciones varios órdenes de magnitud menores, y parecidas a las exposiciones reales *in vivo*, aún considerando los peores escenarios posibles. La frase de "la dosis hace el veneno" también puede ser parafraseada como "la dosis hace el mecanismo". Las rutas y mecanismos que operan a dosis bajas es probable que sean diferentes de los que operan en dosis muy altas, cuando las defensas del organismo son sobrepasadas (Oberdörster et al., 2005).

1.7. Evaluación del riesgo

Por el momento no está claro si los beneficios de la nanotecnología son mayores que los riesgos asociados con la liberación al medio ambiente de NPs y la exposición a éstas, existiendo la preocupación de que las NPs puedan suponer una nueva clase de peligros ambientales (DEFRA, 2007). Hasta ahora, se han realizado relativamente pocos estudios sobre los efectos toxicológicos y ambientales de la exposición a las NPs y MNMs y es esta falta de datos la que no nos permite realizar una evaluación adecuada de los riesgos asociados con su exposición. Aun así, se hace un enorme esfuerzo tanto a nivel nacional como internacional (mediante proyectos internacionales) en investigar el impacto de las NPs en el medio ambiente y la salud. Aunque no existen directrices claras sobre cómo evaluar y cuantificar estos efectos, parece obvio que se requiere una información sistemática de las NPs (Buzea et al., 2007) y, además, aplicar un enfoque integrado (Thomas et al., 2009). Para poder hacer esto, es necesario que haya un mayor conocimiento de las NPs a nivel ecotoxicológico y acerca de los perfiles de riesgo en mamíferos. Dado que las NPs difieren en tamaño, forma, composición química y en muchas de sus propiedades físico-químicas, es, por tanto, de vital importancia saber cuales son las propiedades que pueden causar mayores efectos adversos sobre la salud (Stone et al., 2010), ya que los riesgos potenciales de las NPs no son los mismos que los del mismo material a mayor tamaño. La Figura 12 muestra un paradigma de evaluación/gestión de riesgos que señala diferentes medidas y datos necesarios para este proceso aplicado a los MNMs.

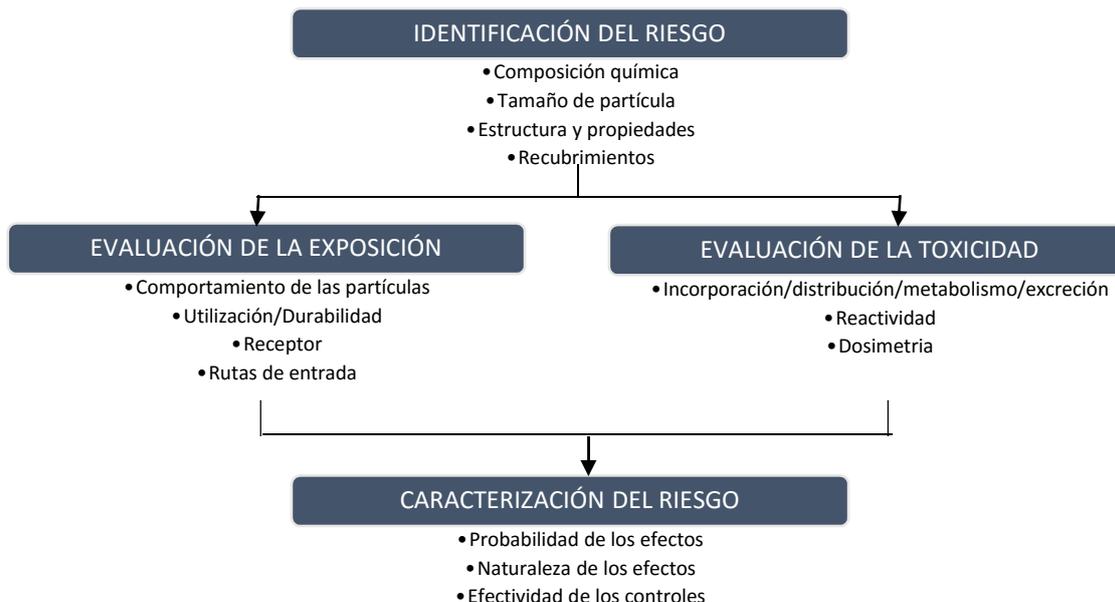


Figura 12. Fases de la identificación, evaluación y caracterización del riesgo de los NMs (Adaptado de IRSAL, 2011).

Ante el riesgo potencial que puede suponer la exposición a los MNMs, los organismos reguladores, asociaciones profesionales, organizaciones no gubernamentales y la industria se están involucrando en el desarrollo y validación de guías estándar de ensayos toxicológicos y ecotoxicológicos para determinar su riesgo. Esto puede ayudar a determinar los posibles riesgos derivados de la exposición, intencionadas o no, a los NMs. Es en este sentido en el que una parte de este proyecto de Tesis se ha desarrollado bajo el marco del proyecto europeo NANoREG, usando la línea Caco-2 como modelo *in vitro* de barrera intestinal.

1.8. Las Caco-2 como modelo *in vitro* de exposición intestinal

La línea celular intestinal Caco-2 humana se ha utilizado ampliamente en los últimos veinte años como modelo de barrera intestinal. La línea celular parental, obtenida originalmente a partir de un adenocarcinoma de colon humano de un hombre caucásico de 72 años, se somete en cultivo a un proceso de diferenciación espontánea que conduce a la formación de una monocapa de células que expresan varias características morfológicas y funcionales de los enterocitos maduros.

Los primeros estudios llevados a cabo utilizando la línea celular Caco-2 demostraron que estas células, una vez adquirida su diferenciación, expresan varias características morfológicas y bioquímicas típicas de los enterocitos del intestino delgado (Pinto et al., 1983). Estas células crecen en monocapa y muestran una

morfología polarizada cilíndrica con microvellosidades en la parte apical y con uniones estrechas entre las células adyacentes, expresando actividades de las enzimas hidrolasas intestinales (tales como la sacarasa-isomaltasa, lactasa, aminopeptidasa N, y dipeptidil peptidasa IV) en la membrana apical. Sin embargo, algunos estudios sobre las características de las enzimas expresadas por las células Caco-2 diferenciadas sugieren un parecido más cercano con las células fetales iliales que con los enterocitos adultos (Sambuy et al., 2005).

Entre otras características enterocíticas, las células Caco-2 expresan receptores de membrana polarizados para factores de crecimiento y varias actividades de transporte en ambas membranas. Distintos grupos han confirmado que las células Caco-2 muestran una diferenciación enterocítica mejor, tanto morfológica como funcional, en comparación con otras líneas celulares de carcinoma de colon (Chantret et al., 1988; Matsumoto et al., 1990), aunque existe la convivencia en esta línea celular de características enterocíticas y colonocíticas (Harris et al., 1992; Engle et al., 1998).

Para reproducir mejor las condiciones estéricas existentes en el intestino *in vivo*, las células Caco-2 se cultivan en soportes de filtro permeables que permiten el acceso libre de iones y nutrientes a los dos lados de la monocapa de células. Dado que estas condiciones conducen a una mejor diferenciación morfológica y funcional, su uso se ha extendido desde hace tiempo como un modelo fisiológico para los estudios de transporte y de toxicidad intestinal (Hidalgo et al., 1989; Artursson, 1990; Hilgers et al., 1990; Wilson et al., 1990). Para medir y controlar la integridad de la capa de células se utiliza como parámetro la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) después de la confluencia; asimismo, se utilizan distintas moléculas marcadoras para determinar la permeabilidad de la misma. Complementariamente, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) también se utiliza para determinar la morfología ultraestructural y para comprobar la diferenciación morfológica.

En la actualidad existen muchos clones de células Caco-2 que se están usando en diferentes laboratorios. Esto, junto con las variaciones en los protocolos de cultivo y de diferenciación, hace que exista una gran variabilidad en los resultados publicados, lo que hace difícil la comparación de los mismos. Este es un aspecto relevante ya que el uso de células Caco-2 ha crecido enormemente en los últimos años en muchas áreas de investigación sobre nutrición, farmacología y toxicología (Artursson et al., 2001).

Existen muchos factores que pueden afectar a esta variabilidad observada en los resultados, siendo el número de pases uno de ellos. Varios autores han indicado que el número de pases en cultivo influye en diferentes funciones y actividades de esta línea celular, observándose un aumento en la tasa de proliferación con el número de pases y

exhibiendo un aumento de los valores de TEER (Lu et al., 1996). También se ha visto la aparición de zonas con capas múltiples en la población de células de pase tardío (Lu et al., 1996; Briske-Anderson et al., 1997) observándose que la expresión de la actividad sacarasa-isomaltasa aumenta con el número de pases, mientras que al mismo tiempo la actividad fosfatasa alcalina disminuye (Chantret et al., 1994; Briske-Anderson et al., 1997; Yu et al., 1997). Además, el número de pases también puede influir en las actividades metabólicas, ya que la variabilidad de la expresión del mRNA de *CYP3A4*, depende del número de pases.

La explicación de tales diferencias en la expresión de los parámetros de diferenciación con un número creciente de pases se ha atribuido a la heterogeneidad intrínseca de la población de células Caco-2 parental lo que lleva a la selección, durante los pases de cultivo, de subpoblaciones de células de crecimiento más rápido que expresan diferentes subconjuntos de características (Walter y Kissel, 1994, 1995; Briske-Anderson et al., 1997; Yu et al., 1997). Dada esta heterogeneidad se ha propuesto aislar los diferentes clones de la línea Caco-2 parental para obtener una población más homogénea y más adecuada para diferentes estudios.

Durante mucho tiempo se ha establecido que el tiempo de cultivo y las densidades de siembra de células puede influir en la evolución de un cultivo de células con respecto a la replicación celular, la senescencia y la diferenciación. Estos factores deben, por lo tanto, ser estrictamente estandarizados con el fin de obtener modelos experimentales reproducibles y resultados comparables. La densidad de siembra es un factor importante en la expresión de los rasgos relacionados con la diferenciación, ya que el proceso de diferenciación sólo se inicia cuando las células alcanzan la confluencia. El uso de una densidad de siembra intermedia de 6×10^4 células/cm² logró una buena diferenciación después de tres semanas en cultivo. Por otra parte, mayores densidades de siembra llevaron a la formación de multicapas (Behrens y Kissel, 2003). Sin embargo, la formación de múltiples capas también puede depender de las células usadas, ya que se ha demostrado que distintos subtipos de Caco-2, aunque se sembraron a la misma densidad, presentaron diferente grado de formación de múltiples capas durante la diferenciación (Behrens et al., 2004).

a) Diferenciación celular

La diferenciación de las células Caco-2 parece seguir una secuencia estricta en la expresión de las características morfológicas y bioquímicas de los enterocitos. Sin embargo, ya desde los primeros estudios, se ha hecho evidente que este proceso se produce de acuerdo con un patrón de mosaico con zonas de monocapa de forma

homogénea indiferenciada (en sub-confluencia), y zonas de forma heterogénea polarizada y diferenciada (desde el día 0 hasta el día 20 después de confluencia), hasta zonas polarizadas y diferenciadas (más de 30 días después de la confluencia) de forma homogénea (Vachon y Beaulieu, 1992).

Una cuestión interesante que todavía está sin resolver es el fenotipo expresado por las células Caco-2 totalmente diferenciadas. Aunque esta línea celular se originó a partir de un adenocarcinoma de colon, después de la confluencia se diferencia en una monocapa polarizada de células que expresan propiedades de las células epiteliales ileales fetales. Las diferencias entre los enterocitos maduros se explican como la persistencia de fenotipo fetal o derivado del tumor o la conversión incompleta de la proliferativa (cripta) al fenotipo diferenciado (vellosidades) (Engle et al., 1998). Un estudio de la expresión, tanto de los enterocitos como de proteínas colonocíticas, durante la diferenciación celular Caco-2 demostró una disminución general de los marcadores colonocíticos y un aumento de los marcadores de los enterocitos desde el día 3 hasta el día 18 después de la confluencia. Sin embargo, el mismo estudio mostró que estos eventos no siempre pueden ocurrir en estrecha coordinación, advirtiendo que la expresión puede seguir patrones diferentes incluso para la misma proteína en los diferentes clones o bajo condiciones de cultivo diferente (Engle et al., 1998). El perfil de la expresión génica de las Caco-2/ATCC, crecidas en el inserto durante 21 días, después de la confluencia indica que durante la diferenciación *in vitro* se produce una coordinada sub-expresión de los genes implicados en la progresión del ciclo celular, en la síntesis de DNA, en el procesado del RNA y en la traducción de proteínas. Al tiempo que se observa una sobre-expresión de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos y de fármacos, en el transporte y metabolismo de lípidos, así como en la deposición de la matriz extracelular. Otros genes del fenotipo enterocítico, que se encuentran sobre-expresados son los que regulan las proteínas del borde en cepillo, como la dipeptidil peptidasa IV y villina, la proteína de unión adherente E-cadherina y la proteína de unión estrecha *CLAUDIN 7* (Mariadason et al., 2002). El análisis del proteoma de las células Caco-2/ATCC cultivadas en inserto confirma que los cambios en la expresión de proteínas durante la diferenciación representan un cambio de un fenotipo de colon neoplásico hacia un fenotipo de intestino delgado más normal (Stierum et al., 2003).

b) La expresión de transportadores de nutrientes

Los enterocitos del intestino delgado expresan varias proteínas transportadoras en las membranas apical y basolateral que permiten el paso trans-epitelial de moléculas nutricionalmente relevantes de la luz intestinal a la circulación de la sangre. Se han

identificado y caracterizado transportadores intestinales específicos para azúcares, aminoácidos, di- y tri-péptidos, vitaminas, ácidos biliares, micronutrientes, incluyendo metales pesados y nucleósidos en las células Caco-2 (Hidalgo y Li, 1996). Así, se ha observado la expresión continua y estable de la proteína P-gp en células Caco-2 desde la segunda hasta la cuarta semana de cultivo; mientras que la actividad funcional completa del transportador sólo se obtuvo en células cultivadas en los insertos de filtro durante 20 días (Hosoya et al., 1996).

c) Soporte de filtro

Los soportes con filtros de óxido de aluminio y polietileno-tereftalato (PET) constituyen membranas translúcidas que permiten de este modo la observación microscópica durante el cultivo celular. Es por esto que las membranas de PET se han preferido a los otros modelos de diferenciación Caco-2 dada la posibilidad de controlar microscópicamente la monocapa de células durante esta diferenciación.

El crecimiento y la diferenciación de las células Caco-2 en diferentes sustratos no han mostrado tener ningún efecto sobre la expresión del mRNA de los transportadores de membrana. Sin embargo, el tamaño del poro y la densidad de éstos en los filtros de diferentes materiales sí que pueden influir en la permeabilidad (Delie y Rubas, 1997). La amplia caracterización de las funciones de la línea celular Caco-2 diferenciadas en cultivo llevada a cabo durante más de 15 años en varios laboratorios de todo el mundo ha puesto de manifiesto la gran variabilidad de este modelo de células derivadas, tanto por las mismas células como por factores relacionados con el cultivo.

A pesar de los potenciales inconvenientes ya comentados, dada la fuerte preocupación internacional para reducir el uso de animales de laboratorio, se debe considerar el utilizar el modelo de células Caco-2 para el desarrollo de alternativas en ensayos de toxicidad *in vitro*. Hay que enfatizar que entre las rutas de exposición a agentes potencialmente tóxicos (incluidos los MNMs), el tracto gastrointestinal es particularmente relevante para la absorción y la biotransformación.

1.8.1. El proyecto NANoREG y el uso de células Caco-2 como modelo de barrera intestinal

El potencial innovador y económico aparentemente ilimitado de los MNMs contrasta con nuestra comprensión actual de la seguridad de los NMs, ya que en este momento hay mucha incertidumbre sobre cómo realizar efectivamente la evaluación de sus riesgos potenciales. El proceso de identificación de peligros para la evaluación del riesgo, seguido de la gestión de riesgos, su mitigación y evitación, constituye la única

vía aceptable para evaluar los MNMs. El objetivo final de este proceso es la producción y uso de los NMs de forma segura, contribuyendo a la confianza del consumidor. Por tanto, la finalidad del proyecto europeo NANoREG es proporcionar resultados que conduzcan a una reducción de la incertidumbre mediante la mejora de la aplicabilidad de los instrumentos comunes y su capacidad para evaluar el riesgo de los MNMs bajo investigación. Esta información nos proporcionará un enfoque más robusto para el desarrollo de nuevas estrategias de ensayo, así como las estrategias de decisión y los paradigmas de decisiones en condiciones de incertidumbre (persistente), y las estrategias de gobierno del riesgo a largo plazo.

Se debe acelerar la obtención de respuestas acerca de los riesgos a la exposición de los NMs para reducir la preocupación social. Sin embargo, también porque la industria necesita reducir el tiempo de comercialización de nuevos productos.

En este contexto, los objetivos científicos y técnicos de este proyecto son:

- Proporcionar a los legisladores un conjunto de herramientas para la evaluación del riesgo y los instrumentos para la toma de decisiones a corto y medio plazo, mediante la recopilación de datos y la realización de la evaluación del riesgo, incluyendo la exposición seguimiento y control, para un número seleccionado de los NMs utilizados en los productos.
- Desarrollar a largo plazo las nuevas estrategias de ensayos adaptados a un gran número de los NMs, cuando muchos factores pueden afectar su impacto ambiental y la salud.
- Concretar una estrecha colaboración entre las autoridades y la industria en relación con los conocimientos necesarios para la adecuada gestión del riesgo, y sentar las bases de enfoques comunes, conjuntos de datos mutuamente aceptables y prácticas de gestión de riesgos.

En la actualidad existen muchos tipos de proyectos enfocados a obtener información sobre el medio ambiente y la salud, centrados en una amplia gama de aspectos de los NMs. El proyecto NANoREG se distingue de éstos en que pone el foco en el mundo regulador, ofreciendo pruebas de los métodos de análisis disponibles. En este contexto NANoREG está claramente posicionado para satisfacer las necesidades y requerimientos de los reguladores y legisladores nacionales de la UE, a través de una estructura de proyecto que tiene fuertes vínculos con los actores locales (países) a través de los Coordinadores Nacionales. Este enfoque se basa principalmente en crear enlaces con todas las partes interesadas de los reguladores, la normalización, los

científicos e industrias seleccionadas. Esto permitirá proporcionar recomendaciones para la regulación y la legislación de los MNMs en base a los resultados y datos de alta calidad de los ensayos de métodos de pruebas.

Dentro del proyecto NANoREG, nosotros nos hemos involucrado en el paquete de trabajo 5 (Work Package 5: WP 5) que trata sobre los estudios *in vitro*. Dentro de este mismo paquete, nuestro grupo ha focalizado su actuación en la relevancia de las barreras. De las distintas barreras biológicas propuestas (barrera hemato-encefálica, piel, intestino, pulmón y placenta) nos hemos centrado en la subtarea que consiste en la evaluación de la idoneidad de los modelos actuales de absorción *in vitro* para el estudio de los NMs en un **modelo intestinal**. Dentro de este proyecto los distintos grupos han compartido el mismo clon de células Caco-2 proporcionado por el *Istituto Superiore di Sanità (ISS)* italiano, y el mismo lote de FBS, para minimizar al máximo la variabilidad entre laboratorios. Además, se han establecido los SOPs (*Standard Operating Procedures*) para el cultivo de las Caco-2 diferenciadas y los ensayos de integridad y permeabilidad de membrana, así como también para la dispersión de los NMs.

Dentro del proyecto NANoREG se seleccionó una lista de 19 MNMs con los que todos los grupos han trabajado, a los que se les ha denominado “*the NANoREG Core Nanomaterials*”. De todos estos MNMs nosotros elegimos los siguientes:

- TiO₂: NM100 y NM101.
- ZnO: NM110.
- SiO₂: NM200 y NM203. Además también se usó una sílice fluorescente roja de 50 nm y carga negativa → IIT (*Istituto Italiano di Tecnologia*, Génova, Italia).
- CeO₂: NM212.
- Ag: NM300K.
- MWCNT: NM401.

Por lo tanto, los materiales y métodos de análisis de nuestro modelo de barrera, así como la exposición de ésta a los NMs, son muy concretos y detallados dentro del proyecto. Éstos han consistido en i) caracterizar los NMs en la solución stock y en medio de cultivo, antes y después del tratamiento a la concentración mínima (que permite el instrumento) y máxima evaluada; ii) evaluar la integridad y permeabilidad de la monocapa de células Caco-2; iii) evaluar la internalización de los NMs dentro de la monocapa de Caco-2; iv) evaluar el cruce de los NMs a través de la monocapa de

células; y un punto adicional fuera del proyecto v) evaluar el daño genético que producen estos NMs a la monocapa. Para ello las células se siembran en un inserto o *transwell* (según el protocolo detallado en el apartado de Materiales y Métodos) en el que tardan 21 días en diferenciarse. Después de estos 21 días, las células se tratan durante 24 horas y se procede al análisis de los diferentes ensayos.

a) *Caracterización de los NMs*

La dispersión se realizó a partir del protocolo establecido en el proyecto previo NanoGenotox. Para evaluar la calidad de la dispersión, la morfología de los NMs y el estado de éstos en dispersión se usa TEM y DLS (*dynamic light scattering*). Este proceso es importante ya que una mala dispersión de los NMs nos va a dar unos resultados muy diferentes a los encontrados en una buena dispersión y esto puede llevar a confusión y una mala interpretación de los resultados obtenidos.

b) *Evaluación de la integridad y permeabilidad*

El epitelio intestinal está formado por células que se encuentran unidas entre ellas mediante uniones estrechas (*tight junctions*). Estas uniones impiden el paso de compuestos indeseados a través de las células, actuando así de barrera gastrointestinal. De esta misma forma, nuestra monocapa de células Caco-2 expresa estas uniones cuando se encuentra diferenciada en el soporte de plástico. Los NMs podrían estar actuando sobre nuestra monocapa de células produciendo la abertura de estas uniones estrechas. De esta forma, los compuestos no deseados, no sólo NMs sino también otros compuestos de otra naturaleza química, podrían cruzar la monocapa y producir efectos tóxicos en otros órganos y tejidos. Es por este motivo que se evalúa la integridad de la monocapa de Caco-2 y su permeabilidad durante la diferenciación y después de la exposición.

Para evaluar la integridad de la monocapa se mide el TEER que ejerce nuestra monocapa entre los dos compartimentos que genera el inserto o *transwell* donde se siembran las células (Figura 13). Se espera que los valores de TEER aumenten durante la diferenciación, ya que las uniones entre células se están aún formando, hasta llegar a un *plateau* a los 21 días, momento en el que se realizará la exposición.

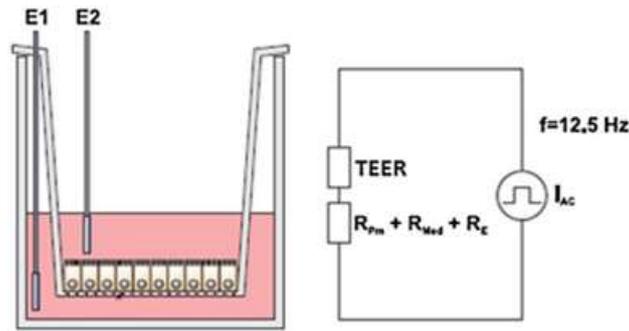


Figura 13. Esquema de la medición de TEER con un voltímetro tipo pinza.

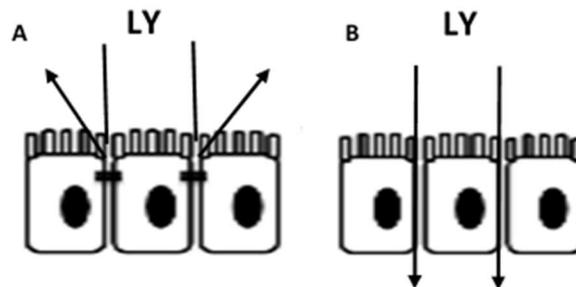


Figura 14. Esquema del ensayo *Lucifer Yellow* (LY). Membrana intacta donde las uniones no permiten el cruce de LY (A) y membrana con las uniones afectadas que permite el paso de LY (B).

Para los ensayos de permeabilidad se usa el compuesto paracelular Lucifer Yellow (LY). Este compuesto es incapaz de penetrar dentro de las células y sólo puede cruzar la monocapa si las uniones estrechas están abiertas (ruta paracelular). Así que si la membrana está en buen estado, no se encontrará LY en la cámara basolateral, pero si la monocapa está dañada y las uniones se han abierto, el compuesto LY podrá cruzar la monocapa entre las células y lo podremos encontrar en la cámara basolateral (Figura 14).

c) Internalización de los NMs

Para la observación de la internalización de los NMs suele usarse el TEM. La microscopía electrónica ha permitido aumentar muchísimo la resolución de las muestras en comparación a la microscopía óptica convencional (Williams y Carter, 1996). La longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones y esto permite aumentar la resolución, es decir, observar estructuras mucho más pequeñas, del orden de varios nanómetros, y mucho más nítidas. Se han realizado varias modificaciones para poder observar muestras biológicas (Porter et al., 1945) y esto permite observar estructuras internas de la célula, y también la internalización de los NMs. No obstante,

las células Caco-2 diferenciadas son células muy granuladas que dificultan la observación clara de los NMs. Afortunadamente, disponemos también de la microscopía confocal como alternativa. El microscopio confocal es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste y/o reconstruir imágenes tridimensionales. El concepto de imagen confocal fue patentado por Marvin Minsky en 1957. A diferencia del microscopio de fluorescencia convencional, donde el espécimen entero está sobresaturado de luz, el microscopio confocal utiliza iluminación puntual y un "pinhole" (colimador de orificio delimitante) en un plano óptico conjugado frente del detector, para eliminar la información que está fuera del plano focal. Sólo la luz que está dentro de este plano puede ser detectada, de modo que la calidad de imagen es mucho mejor que las de campo amplio. El disponer de NPs fluorescentes y NPs metálicas capaces de reflejar la luz polarizada hace que se puedan observar con esta técnica de microscopía. Aun teniendo la resolución de un microscopio óptico, se pueden observar los agregados/aglomerados de NPs sin las estructuras internas de la célula que las enmascaran.

d) *Translocación de los NMs*

El estudio de la capacidad de los NMs de atravesar barreras biológicas es un punto realmente importante ya que los NMs podrían ser distribuidos por todo el organismo y afectar a otros órganos o tejidos diana. Para ello se analiza la presencia de NMs en el medio basolateral mediante distintas técnicas como pueden ser TEM, TEM acoplado a EDX (*Energy Dispersive X-Ray*), microscopía confocal, y ICP-MS (espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente). Las tres primeras metodologías nos permiten el análisis cualitativo del cruce de NMs y la última, el análisis cuantitativo.

e) *Evaluación del daño genético*

Para la evaluación del daño genético se decidió usar el ensayo del cometa para evaluar el daño primario en el DNA inducido por las NMs en las Caco-2 diferenciadas después de la exposición. Esto se complementó con la detección de cambios en los niveles de expresión génica mediante qRT-PCR.

Respecto a la evaluación del daño primario en el DNA, se usó el ensayo del cometa con la versión alcalina, complementada con la enzima formamidopirimidina-DNA glicosilasa (FPG). En este ensayo, las células se incluyen en una matriz de agarosa donde, tras varios tratamientos, se eliminan las estructuras celulares y se deja el DNA superenrollado desnudo. La electroforesis en medio alcalino permite la migración del DNA. Aquellos lazos que hayan sufrido roturas de doble o simple cadena migrarán hacia el ánodo a mayor velocidad que las estructuras no relajadas produciendo así una

migración en forma de cometa. Analizando el tamaño de este cometa, se puede extrapolar el nivel de daño. La enzima FPG permite evaluar el daño oxidativo ya que ésta es capaz de detectar y cortar el DNA por donde se hayan producido purinas oxidadas.

Los cambios de expresión génica se evaluaron mediante qRT-PCR (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*). Este método consiste en una retrotranscripción seguida de una PCR cuantitativa que permite la detección de los niveles de expresión del mRNA. Se ha decidido analizar la expresión de genes involucrados en las uniones celulares (*claudinas, ocludinas*) y genes involucrados en la diferenciación del intestino (*SI, SLC15A1*). Hay estudios que indican variaciones en todos ellos durante la diferenciación (Van Beers et al., 1995; Adibi, 2003; Behrens y Kissel, 2003; Olsen et al., 2005; Le Gall et al., 2007; Nakano et al., 2009; Boyd et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010; Dalmaso et al., 2011; Yu et al., 2013; Cheng et al., 2014; Markov et al., 2015). Resultados contradictorios pueden ser el resultado de la gran heterogeneidad y variabilidad que a veces existe en el cultivo celular Caco-2 diferenciado, como ya se ha comentado.

Una breve descripción de los genes indicados se encuentra a continuación.

SI → *Sucrose-isomaltase* (sacarasa-isomaltosa). Este gen codifica la enzima sacarasa-isomaltasa que se expresa en el borde en cepillo (microvillis).

SLC15A1 → *Intestinal hydrogen peptide cotransporters (member of the solute carrier family 15*; cotransportador intestinal de péptidos de hidrógeno). La proteína codificada se localiza en la membrana con microvillis y media la admisión de dipéptidos y tripéptidos del lúmen del intestino al interior de los enterocitos.

CLAUDIN2 → La proteína codificada por este gen es una proteína integral de membrana y componente de las hebras de las uniones estrechas (*tight junctions*).

OCCLUDIN → Este gen codifica una proteína integral de membrana y componente principal de las uniones estrechas (*tight junctions*) junto a las claudinas (que se requiere para la regulación inducida por citoquina de la barrera de permeabilidad paracelular de uniones estrechas).

1.8.2. Tratamiento de larga duración con la línea celular Caco-2

Generalmente, los estudios realizados *in vitro* sobre NMs u otros compuestos usan concentraciones muy elevadas y tratamientos muy cortos, de tan sólo unas horas, que no mimetizan lo que ocurre en una exposición real. Un enfoque más realista sería disminuir estas concentraciones de tratamiento y aumentar el tiempo de exposición a un

mínimo de varias semanas. Este tipo de tratamiento ya se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio tanto en exposiciones a otros contaminantes ambientales como el arsénico (Bach et al., 2014, 2015, 2016), como a distintas NPs (Annangi et al., 2015, 2016; Vales et al., 2016). Este cambio de enfoque nos permite no tan sólo evaluar el daño genotóxico que los diferentes compuestos producen en la línea celular de estudio, sino que también nos permite evaluar el posible daño carcinogénico evaluado como la capacidad de inducir la transformación celular en dicha línea celular.

Se sabe que la línea celular Caco-2 no diferenciada es una línea tumoral. Esta línea celular se ha usado de forma no diferenciada en multitud de estudios con NMs (Sääf et al., 2007; Bourseau-Guilmain et al., 2011; Böhmert et al., 2012, 2015; Sahu et al., 2014), pero en todos ellos la exposición ha sido aguda, es decir, a concentraciones altas y poco tiempo de exposición. Como hemos señalado, nuestro interés reside en estudiar si este modelo celular sirve, no sólo para estudios de barrera intestinal, sino también como modelo de estudios a largo plazo. En nuestro caso, hemos decidido exponer la línea celular Caco-2 a diferentes concentraciones de AgNPs (NM300K) durante 6 semanas. Las concentraciones elegidas (0,5 y 1 µg/mL) fueron confirmadas como subtóxicas. Para analizar el posible daño carcinogénico se han evaluado distintos parámetros como a) los cambios de proliferación frente a los diferentes tratamientos durante las semanas de exposición (*doubling time*); b) el crecimiento de las células sin requerir estar adheridas a una superficie (*soft-agar*); c) la capacidad del secretoma de las células expuestas de promover el crecimiento tumoral; d) la excreción al medio de metaloproteínas de la matriz extracelular (MMP) (zimografía); e) la capacidad de migración; y f) los cambios en la expresión génica (qRT-PCR).

A continuación se hace una breve descripción de estos marcadores:

a) *Doubling time*

Las células pueden ver alterado su tiempo de división con el tratamiento, ya sea porque la internalización de los NMs interfiere en el ciclo celular y lo ralentiza, o porque el tratamiento promueve la transformación celular y acelera la división. Con este método, se cuenta el número de células a las 24, 48, 72 y 96 horas y esto nos permite evaluar el tiempo de división según los tratamientos.

b) *Soft-agar*

Este ensayo fue desarrollado por Hamburger y Salmon (1977) y nos permite evaluar la habilidad de las células para crecer en una matriz de agar sin necesitar la fijación a una superficie, como es lo normal en células no transformadas. Las células se siembran en una matriz de agar blando donde, *a priori*, no son capaces de adherirse y

crecer. En el caso de que las células adquieran la capacidad de crecer en esta matriz, lo harán formando colonias. Las colonias se forman a partir de una única célula y pueden llegar a tardar más de 15 días en ser visualizadas. Su cuantificación se realiza como muy pronto el día 10 posterior a la siembra. Para cuantificarlas se tiñen con cristal violeta o INT [(2-p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio clórico] y se usa un software de uso libre denominado OPENCFU.

Existe también una modificación de este ensayo propuesto en nuestro laboratorio. En este caso se valora la promoción de crecimiento de células con capacidad de crecer en el agar blando, sometidas a lo que se conoce como medio condicionado (CM). Estas células pueden ser células tumorales como HeLa (cáncer de cérvix) o como HCT116 (adenocarcinoma de colon). Teniendo en cuenta que estas líneas celulares tienen la capacidad espontánea de crecer en agar blando, lo que se valora es la diferencia de crecimiento en cuanto al tamaño de las colonias y/o en número cuando se las enfrenta a un CM proveniente de la línea celular de estudio (Caco-2) después del tratamiento. Para colectar el CM después del tratamiento con AgNPs (como modelo de NP) las células Caco-2 se cultivan con medio sin suero durante 72 horas. De esta forma, las células secretan factores de crecimiento y citoquinas debido al estrés inducido; así, que pueden ejercer de promotor de expansión en el crecimiento de un tumor.

c) Zimograma

Es importante en los estudios de transformación celular la evaluación de la angiogénesis y la metástasis. En este campo, las MMPs juegan un papel muy importante. Las MMPs pertenecen a la familia de las endopeptidasas dependientes de zinc, que degradan la matriz extracelular. Actualmente hay 23 proteínas descritas. En condiciones de homeostasis se suelen encontrar en una forma pre-enzimática no activa, inhibidas por los inhibidores llamados TIMPs. Estas endopeptidasas contienen un enlace entre un residuo de cisteína (Cys73) y una molécula de Zn^{2+} y se necesita la desestabilización de este enlace, mediante una molécula de agua, para formar una molécula intermediaria que posteriormente será sometida a una auto-rotura o a la acción de proteasas dando lugar a la forma enzimática final activa (Springman et al., 1990, Visse y Nagase, 2003). De las 23 descritas hay dos gelatinasas llamadas MMP-2 y MMP-9, que tienen preferencia por degradar la gelatina y diferentes formas de colágeno, Éstas se encuentran incrementadas en las células transformadas y son las más comúnmente evaluadas en los estudios de transformación celular (Snoek-van Beurden y Von den Hoff, 2005).

Una de las técnicas utilizada para detectar estas dos MMPs es el zimograma y más concretamente el zimograma dependiente de sustrato. En este caso, como se evalúa la presencia de la MMP-2 y MMP-9 se usa la gelatina como sustrato (Wilkesman y Kurz, 2012). Se hace correr el CM por un gel de SDS con poliacrilamida. El SDS provocará la transición de la forma pre-enzimática a la forma intermediaria y la migración a través del gel según su peso molecular (Springman et al., 1990). Después, una incubación con Tritón® X-100 permitirá la transformación a la forma enzimática activa final y se incubará durante la noche permitiendo la degradación de la gelatina. Así, se visualizará una banda transparente con falta de sustrato en el lugar donde se hallen las MMPs cuya intensidad puede cuantificarse.

d) Migración

Otra característica de las células transformadas es la adquisición de la capacidad de migración. Las células pueden migrar hacia otros órganos y tejidos para invadirlos y formar otros tumores. Comúnmente, la capacidad de migración se evalúa formando una estría en la monocapa de células para ver su migración, colonizando la estría, o a través de un *transwell* con un tamaño de poro suficiente para la migración de las células. En el caso del uso del *transwell*, se siembran las células en la parte apical en medio sin suero. En el medio basolateral se coloca un quimioatrayente para potenciar la migración de las células, en nuestro caso medio con alto porcentaje de suero (Figura 15).

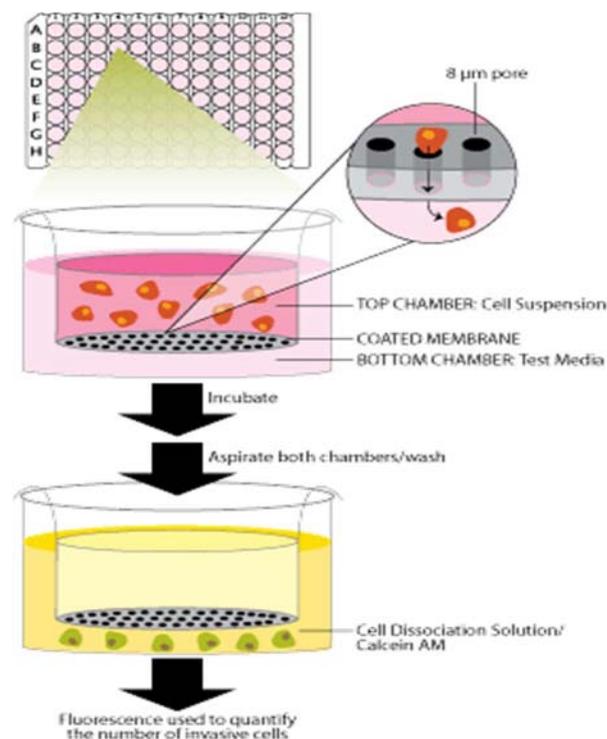


Figura 15. Esquema del proceso de migración de las células transformadas.

e) *qRT-PCR*

La invasión local y la metástasis del cáncer colorrectal, y de algunos otros tipos de carcinoma, se cree que implican la remodelación transitoria del fenotipo de célula tumoral epitelial a un estado tipo mesenquimal invasivo, caracterizado por defectos en la formación de uniones estrechas y adherentes (*ZO-1*, *CADH1*), aumento de proteínas de filamentos intermedios (vimentina), y la expresión elevada de las proteasas que median la degradación de la matriz extracelular. Tales transiciones epiteliales-mesenquimales (EMT) -y también transiciones mesenquimales-epiteliales (MET)- implican cambios extensos y altamente coordinados en la expresión de genes, regulados por las redes de señalización y factores de transcripción complejos que involucran a los factores EMT de transcripción que pertenecen a la *hélice-lazo-hélice básico* (*bHLH*), *SNAIL*, *TWIST* y familias *ZEB* (Polyak y Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009; Thompson y Haviv, 2010), entre otros.

En esta Tesis se ha decidido usar una batería de genes que cubran los diferentes procesos involucrados en la transformación celular. Por eso se decidió usar para el estudio de la adhesión celular a los genes *ZO-1* y *CDH1*. *ZO-1* es un gen que codifica una proteína que se encuentra en la superficie de la membrana plasmática de las uniones estrechas entre células. Es una de las proteínas implicadas en la adhesión entre células en la diferenciación de las Caco-2 en *transwell*. Por otro lado, *CDH1* codifica la E-caderina. El cambio de la expresión de E-cadherina a N-cadherina durante la EMT confiere a las células cancerosas epiteliales originarias cambios drásticos en su comportamiento migratorio (Li et al., 2001; Nakashima et al., 2003; Rieger-Christ et al., 2004; Taeger et al., 2011; Kolijn et al., 2015).

En el caso de las proteínas de filamentos intermedios, se analizaron los genes *VIM* y *ACTA2*. El gen *VIM* codifica la proteína vimentina implicada en la estructura y la integridad celular. Es un gen con actividad Wnt que se expresa en las células mesenquimales normales. La vimentina influye en la forma celular y en la motilidad durante el proceso de EMT que se produce durante la metástasis. Ésta se sobreexpresa en una serie de cánceres y está vinculada a la progresión metastásica (Gilles et al., 2003; McInroy y Maatta, 2007; Mendez et al., 2010; Satelli y Li, 2011). Por su parte, *ACTA2* codifica para una proteína de la familia de las actinas. Es una proteína implicada en la regulación de la motilidad celular.

Hay muchos marcadores de membrana asociados con el cáncer y con la auto-renovación. Algunos de ellos son *CD133*, *CD166*, *CD44*, *CD24*, *beta1 integrin-CD29*, *Lgr5*, *EPCAM (ESA)*, *ALDH-1*, *Msi-1*, *DCAMLK1* o receptores de *EphB* (Thenappan et al., 2009; Vaiopoulos et al., 2012). De todos ellos se decidió usar *EPCAM* en nuestra

batería de genes a analizar. El gen *EPCAM* codifica un antígeno asociado a carcinoma. Se expresa en la mayoría de células normales y en carcinomas gastrointestinales y funcionando como una molécula de adhesión.

En cuanto a los factores de transcripción, se eligió *SNAIL1* y *SLUG* para nuestro análisis. *SNAIL* es un represor transcripcional con dedos de zinc que regula a la baja la expresión de genes ectodérmicos dentro del mesodermo. Este gen juega un papel importante en el desarrollo de tumores malignos humanos, incluyendo los del tracto gastrointestinal (Cunningham et al., 2010). *SLUG* también codifica un miembro de la familia Snail, siendo otra proteína implicada en la EMT, presentando actividad antiapoptótica.

Por último, el gen *PTEN* se usó como un supresor tumoral que está mutado en un gran número de tipos de cáncer a alta frecuencia, y el gen *VEGFA*, como miembro de la familia del factor de crecimiento *PDGF/VEGF*. Este factor de crecimiento induce la proliferación y migración de células endoteliales vasculares por lo que es esencial en la angiogénesis fisiológica y patológica. Este gen está regulado positivamente en muchos tumores conocidos y su expresión se correlaciona con el estadio del tumor y con la progresión del mismo (He et al., 2012; Tang y Moore, 2013).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis es el de poner a punto la línea celular Caco-2 como modelo de barrera intestinal para los estudios sobre los riesgos asociados con la exposición a los NMs, ya sea en estudios sobre transporte o sobre exposiciones prolongadas.

Dado que los estudios de transporte se han desarrollado en el marco del proyecto europeo NANoREG, nuestros objetivos han sido los planteados en el proyecto, y consisten en:

Un objetivo principal, que es el de desarrollar la línea Caco-2 como modelo de barrera intestinal *in vitro*, y establecer una metodología de análisis y de detección del impacto de los NMs en dicha barrera.

Unos sub-objetivos derivados de este gran objetivo, como:

- Establecer una correcta formación de la barrera Caco-2 y hacer que sea reproducible.
- Evaluar la posible afectación de los NMs en la integridad y permeabilidad de la monocapa.
- Evaluar la internalización de los NMs en el sistema.
- Analizar el cruce de dichos NMs a través de la monocapa de células.
- Valorar el daño genotóxico y/o oxidativo producido por los NMs.
- Valorar el estado de la monocapa mediante la expresión de diversos genes relacionados con su integridad y funcionalidad.

En cuanto a los estudios de larga exposición:

El objetivo principal es el de valorar el uso de la línea Caco-2 como modelo de transformación celular en la exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de AgNPs, una NP con relevancia en la exposición intestinal debido a sus características antibacterianas.

Este objetivo principal se ha distribuido en distintos sub-objetivos, a saber:

- Exponer las células de colon Caco-2 a concentraciones subtóxicas de AgNPs durante 6 semanas.

Objetivos

- Analizar cambios en la proliferación celular a lo largo de 6 semanas de exposición.
- Evaluar en las células Caco-2 expuestas la adquisición de la habilidad de crecer en una matriz de agar sin necesitar la fijación a una superficie mediante el ensayo del *soft-agar* directo.
- Evaluar si el secretoma de las células Caco-2 expuestas promueve el crecimiento de otras células en dicha matriz de agar mediante el *soft-agar* indirecto.
- Analizar la presencia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular MMP-2 y -9 en el secretoma de las Caco-2 expuestas.
- Valorar la capacidad de migración de las células Caco-2 tras la exposición.
- Evaluar en las células Caco-2 expuestas los patrones de expresión génica de genes relacionados con la EMT, con la identidad epitelial, y con la actividad como supresores de tumores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Línea celular

Tanto para la realización de los estudios *in vitro* de transporte celular, como para los de larga exposición, se ha usado la línea celular Caco-2, que es una línea epitelial de adenocarcinoma de colon humano. A pesar de ser una línea tumoral, estas células tienen la capacidad de diferenciarse espontáneamente cuando llegan a la confluencia y adquirir características típicas de intestino expresando proteínas de membrana, uniones estrechas (*tight junctions*) y microvellosidades (*microvilli*). En esta línea celular este proceso de diferenciación se considera completo 21 días después del inicio del cultivo.

Estas células se cultivan en medio DMEM con altos niveles de glucosa y sin piruvato de sodio (Life Technologies, NY, USA), junto con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Labclinics, Barcelona, España), un 5% de aminoácidos no esenciales (PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austria) y 2,5 mg/mL de plasmocín (InvivoGen, San Diego, CA, USA) a 37 °C y con un 5% de CO₂. En condiciones normales, se realiza el pase de células una vez por semana, cuando éstas se encuentran alrededor del 80% de confluencia, evitando así su diferenciación. El medio se cambia cada 2-3 días.

3.1.1. Estudios de transporte

Gracias a su capacidad de diferenciación celular, las células Caco-2 son capaces de mimetizar un intestino y esto permite realizar estudios de transporte de NPs simulando lo que ocurriría tras la ingestión de las mismas. Las células crecen en un soporte llamado *transwell* que nos permite separar dos compartimentos: el compartimento *apical* (que simula el lumen del intestino), y el compartimento *basolateral* (que simula el interior del organismo).

Para el estudio del transporte de NPs a través de la monocapa de células Caco-2, se siembran 170.000 células por *transwell*. Éste es un soporte permeable formado por una membrana de tereftalato de polietileno (PET), de 1,12 cm² y con un tamaño de poro de 1 µm (Merck Millipore, Alemania). En estas condiciones, las células van adquiriendo características de intestino, diferenciándose y formando uniones estrechas entre ellas. Para evaluar la integridad de la monocapa se mide el TEER los días, 7, 14 y 21 posteriores al inicio del cultivo. Estos valores de TEER nos dan información sobre la confluencia de la monocapa y la calidad de sus uniones. Dichos valores van aumentando progresivamente hasta llegar a su máximo el día 21, coincidiendo con la finalización de la diferenciación de la monocapa. En este momento ya se pueden realizar los estudios de transporte de NPs.

3.1.2. Estudios de larga duración

Se sabe que estamos expuestos a una amplia gama de NPs en nuestro día a día. Para intentar mimetizar al máximo una exposición real, hemos realizado estudios de larga duración (en nuestro caso de 6 semanas), utilizando concentraciones sub-tóxicas de NPs de plata (AgNPs). Las concentraciones elegidas (0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de AgNPs no producen ninguna disminución en la viabilidad celular (ver apartado de viabilidad celular), lo que confirma su condición de concentraciones sub-tóxicas. El objetivo de este estudio de larga duración ha sido determinar si en estas condiciones las AgNPs son capaces de inducir transformación celular y demostrar, por tanto, si poseen potencialidad carcinogénica.

En el caso de los estudios de larga duración las células de los distintos tratamientos se mantienen por duplicado (control, AgNPs 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y AgNPs 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de ahora en adelante abreviados como CTA, CTB, 0.5A, 0.5B, 1A y 1B) en frascos de 75 cm^2 y se sub-cultivan a razón de 800.000 células por frasco una vez por semana. Cada 2-3 días se cambia el medio que contiene los tratamientos con AgNPs. Los diferentes ensayos encaminados a determinar la inducción de transformación celular se realizan en cuatro puntos determinados: (a) a las 24 horas del tratamiento, (b) al principio de la exposición (2 semanas), (c) a la mitad del proceso (4 semanas), y (4) al final del mismo (6 semanas).

3.2. NMs utilizados

Parte de este proyecto de Tesis se encuentra bajo el marco del proyecto europeo NANoREG (*A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials*). Los NMs/NPs con los que se ha trabajado han sido facilitados/suministrados por el mismo proyecto. Hay que indicar que no todos ellos se han usado en todos los procesos experimentales, sino que para cada objetivo específico se han elegido un subconjunto del total de NMs.

Éstos han sido:

- **TiO₂NPs:**
 - NM100 → JRC (*Joint Research Centre, Ispra, Italia*): anatasa
 - NM101 → JRC: anatasa
- **ZnONPs:**
 - NM110 → JRC: zincita

- **SiO₂NPs:**
 - NM200 → JRC: amorfa
 - NM203 → JRC: amorfa
 - Fluorescentes rojas 50 nm carga negativa → IIT (*Istituto Italiano di Tecnologia*, Genova, Italia)
- **CeO₂NPs:**
 - NM212 → JRC: cerita
- **AgNPs:**
 - NM300K → Fraunhofer (Alemania); metálica

En el caso de las AgNPs se nos facilitó información adicional. Las NPs no vienen en polvo como en el resto de los casos, vienen dispersas en una solución acuosa con agentes estabilizantes, 4% polioxietileno glicerol trioleato y polyoxyetileno (20) sorbitan mono-laurat (tween 20). El contenido en plata es del 10,16% w/w. El material es muy viscoso y se recomienda pesarlo para la preparación de la muestra.
- **MWCNT:**
 - NM401 → JRC: MWCNT

3.3. Dispersión de los NMs

Para la dispersión de los NMs se ha seguido el protocolo de dispersión acordado en el proyecto NANoREG, elaborado en un proyecto europeo anterior llamado NanoGenotox.

Primeramente se pesan 15,3 mg de NM en polvo (TiO₂NPs, ZnONPs, SiO₂NPs, CeO₂NPs, MWCNT) o 150,5 mg de AgNPs en un vial de 20 mL dentro de la campana de bioseguridad con extracción de gases usando un neutralizador electrostático para evitar la electricidad estática que pueda haberse creado, y que dificultaría el pesado. Se añaden 30 µL de etanol absoluto, procurando que el NM esté homogeneizado. A continuación se añaden 6 mL de una solución de 0,05% w/v de BSA (albúmina de suero bovino)-agua milliQ (previamente filtrada) para obtener una concentración final de la dispersión equivalente a 2,56 mg/mL.

La dispersión de los NMs se lleva a cabo mediante la sonicación de la muestra. La sonda del sonicador (Branson Sonifier D250) se introduce dentro del vial sumergiéndose 0,5-1 cm por debajo de la superficie del medio de dispersión. La sonicación se realiza a una amplitud del 10% durante 16 minutos. Este proceso se lleva a cabo en un baño de

hielo para evitar el incremento de la temperatura que produce la aplicación de los ultrasonidos.

En el caso de los experimentos de transporte, las NPs se usaron inmediatamente después de la sonicación, diluyéndose en medio de cultivo a la concentración deseada.

En el caso de los experimentos a largo plazo, las AgNPs se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de su sonicación, y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, siguiendo el protocolo descrito por el grupo.

3.4. Caracterización de los NMs

a) TEM

Después de la sonicación y/o congelación de los NMs, éstos se observan en el TEM Jeol 1400 (Jeol LTD, Tokyo, Japón) para corroborar su dispersión, su agregación/aglomeración y su forma y tamaño. Para ello se deposita una gota de la solución stock en una rejilla de cobre con carbono, se retira el exceso y se deja secar al aire. Esta rejilla es la que se utiliza directamente en el TEM para la visualización de las NPs. Con el programa ImageJ se miden, una a una, unas 100 NPs de diferentes campos al azar para hacer una distribución de su tamaño y calcular su media y desviación estándar, para cada una de las NPs.

b) Zeta-sizer

Después de la sonicación y/o congelación de los NMs también se evalúa el estado de éstos en dispersión en medio líquido. Es conocido que los NMs tienden a agregarse/aglomerarse cuando se encuentran en dispersión/solución. Para ello se realiza la caracterización del tamaño hidrodinámico y el potencial Z de las NPs mediante las metodologías DLS y LDV (*laser Doppler velocimetry*), respectivamente, con el instrumento Malvern ZetasizerNano-ZS zen3600 (Malvern, UK). Estos valores nos dan información acerca del estado de la muestra en dispersión una vez sonicada, y también una vez disuelta en medio. El DLS es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión. A parte del tamaño en suspensión, también nos da información sobre la polidispersión (PDI). Se considera una muestra monodispersa cuando el PDI es menor a 0,5. El LDV nos da información sobre el potencial Z. El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Su medida proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de dispersión electrostático. Se considera más estable cuánto más negativo es el valor. El potencial Z sólo se midió en los estudios a largo plazo ya que en el NANoREG sólo se evaluó el DLS.

3.5. Viabilidad celular/Ensayo de toxicidad

La viabilidad celular se determina usando el método del conteo de células con el contador Beckman ZTM Series coulter-counter (Beckman coulter, CA). Esto nos permite evaluar la toxicidad de las diferentes NPs y elegir concentraciones subtóxicas, es decir, que no comprometan la viabilidad de nuestra línea celular.

Para ello, en el caso de las células Caco-2 indiferenciadas, se siembran $1,5 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos en triplicado y se incuban durante toda la noche. Pasado este tiempo, se tratan las células con diferentes concentraciones de los NMs en un rango de 1-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dependiendo del NM) durante 24 horas. Posteriormente se cuentan las células. La IC_{50} , definida como la concentración del NM que reduce la viabilidad en un 50%, se calcula haciendo el promedio de tres experimentos independientes.

En el caso de las células Caco-2 diferenciadas, se siembran las células como se detalla en el apartado 3.1., para que completen su diferenciación. Pasados los 21 días, las células se tratan con diferentes concentraciones del NM durante 24 horas en un rango de 1-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dependiendo del NM. Posteriormente se cuentan las células y se calcula la IC_{50} .

3.6. Estudios con células diferenciadas

Los estudios de interacción de los NMs con la barrera “intestinal” formada por la diferenciación de las células Caco-2 se encuentran bajo el paraguas del proyecto NANoREG. Los parámetros a evaluar tras la exposición a NMs vienen marcados son los siguientes:

- Capacidad de los NMs de afectar la integridad y permeabilidad de la membrana. Se analiza mediante los ensayos de TEER y LY. Para este estudio se han usado todos los NMs seleccionados para el proyecto: TiO_2 (NM100 y NM101), ZnO (NM110), SiO_2 (NM200 y NM203), CeO_2 (NM212), Ag (NM300K) y MWCNT (NM401).
- Capacidad de los NMs de internalizarse en la monocapa de células Caco-2. Se observa mediante TEM y microscopía confocal. Estos ensayos se llevaron a cabo usando: TiO_2 NM100, CeO_2 NM212, Ag NM300K, y la sílice fluorescente cargada negativamente.
- Capacidad de los NMs de cruzar la monocapa. Este parámetro se determina mediante TEM, TEM acoplado a EDX, microscopía confocal, e ICP-MS. Este ensayo se llevó a cabo utilizando: TiO_2 NM100 y NM101, ZnO NM110, SiO_2 NM200 y NM203, CeO_2 NM212, Ag NM300K y MWCNT NM401.

- Capacidad de los NMs de producir daño genotóxico y más concretamente, daño oxidativo en el DNA. Para estos estudios se seleccionaron: TiO₂NPs NM100, CeO₂NPs NM212, y AgNPs NM300K.
- Capacidad de los NMs de modificar la expresión de determinados genes tras la exposición. Este estudio tan sólo se llevó a cabo evaluando los efectos de Ag NM300K.

3.6.1. Exposición

Las células fueron expuestas durante 24 horas a los diferentes NMs seleccionados. La exposición se realiza únicamente en la cámara apical para simular la exposición a través del lumen del intestino. La concentración de cada NM se eligió en función de los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, y en todos los casos se eligieron concentraciones sub-tóxicas. Así, para TiO₂NPs, SiO₂NPs, CeO₂NPs y MWCNT se usaron las concentraciones de 10, 25 y 100 µg/mL; para ZnONPs se usaron 10, 25 y 50 µg/mL; y para AgNPs se usaron 1, 10, 25 y 50 µg/mL. En el caso de la sílice fluorescente, sólo se usó la concentración de 100 µg/mL, ya que sólo se usó en el ensayo de microscopía confocal. Para todos los ensayos se realizaron tres experimentos independientes, y en cada uno de ellos se usaron dos réplicas como mínimo.

3.6.2. Evaluación de la integridad y de la permeabilidad

La integridad y la permeabilidad de la monocapa de células Caco-2 se evalúa con el TEER y el ensayo de LY, respectivamente. Estos ensayos nos permiten valorar el estado de la monocapa después de la exposición.

a) TEER

Se mide el TEER con un voltímetro tipo pinza (con Millicell[®] ERS-2 Voltohmmeter) los días 7, 14 y 21 posterior a la siembra. Para ello se introducen los electrodos en la cámara apical y basolateral a la vez y nuestra monocapa de células actúa como resistencia entre las dos cámaras. Los valores de TEER aumentan progresivamente hasta llegar a su máximo el día 21, coincidiendo con la finalización de la diferenciación de la monocapa. Después del tratamiento se vuelven a medir los valores de TEER para evaluar la integridad de la membrana tras la exposición.

b) Lucifer Yellow

Se evalúa la permeabilidad de la membrana con el compuesto LY después del tratamiento de las células. El LY es un compuesto de transporte paracelular que no es capaz de internalizarse en las células y sólo es capaz de cruzar la monocapa cuando

las uniones entre células se abren. Así, este compuesto no es capaz de atravesar la monocapa de células si ésta se encuentra intacta. Sólo se dará el transporte del LY cuando las uniones entre células se vean afectadas por el tratamiento con las NPs. Para llevar a cabo el ensayo, se añade LY a una concentración de 0,4 mg/mL en la cámara apical de cada uno de los pocillos. Después de una incubación de 2 horas se analiza la fluorescencia del medio de la cámara basolateral con un fluorímetro (Victor III; Filtros Exc: 450 nm; Em: 530 nm).

3.6.3. Internalización

a) TEM

El TEM se usa para visualizar las NPs en el interior de las células de la monocapa. Así, una vez terminada la exposición con las NPs, se realizan lavados con PBS y se fijan las células para posteriormente hacer los cortes y observarlos en el TEM.

Las células se fijan en una solución al 2% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,2 y se guardan a 4 °C. Después de al menos dos horas, las células se lavan con PBS y se post-fijan durante 2 horas en una solución de tetróxido de osmio (w/v) con un 0,8% de hexoferrocianuro potásico en cacodilato. Seguidamente se realizan cuatro lavados en H₂O MiliQ y luego se deshidratan las muestras en concentraciones ascendentes de acetona. Una vez acaba todo el proceso, las células se embeben en resina Epon 812 polimerizada a 60 °C, durante 48 horas. Luego se obtienen secciones semifinas con un ultramicrotomo (*Leica ultracut microtome*) y se tiñen con 1% (w/v) de azul de toluidina, solución acuosa para determinar las zonas con mayor concentración celular. De éstas se realizan secciones ultrafinas con una cuchilla de diamante, se colocan en una rejilla de cobre de 200 MESH y se contrastan con acetato de uranilo durante 30 minutos y citrato de plomo de solución de Reynolds durante 5 minutos. A continuación se observaron las muestras en un TEM JEM 1400 operado a 80 kV. Estos cortes en TEM nos permiten valorar, no sólo la internalización de las NPs, sino también el estado de la monocapa.

b) Microscopía de láser confocal

Para observar la localización de las NPs en el interior de las células se ha usado también la microscopía de láser confocal. Este microscopio nos permite observar fluorescencia, ya sea producida por un marcaje como por autofluorescencia, o por reflexión del rayo láser. En nuestro caso, tres de las NPs usadas se pueden observar por reflexión: AgNPs, TiO₂NPs y CeO₂NPs. En el caso de las SiO₂NPs, no se pueden observar por reflexión, así que usamos otras NPs fluorescentes de sílice de un tamaño

de 50 nm y cargadas negativamente para observar qué podría estar ocurriendo con la internalización de las NPs de este elemento. La visualización de las NPs se realizó tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas.

Para ello 100.000 células Caco-2 no diferenciadas se siembran en una placa de petri *Glass Bottom Microwell Dishes* (MatTek, EUA) de 35 mm de diámetro que contiene un micropocillo de cristal de 14 mm que permite la visualización en el microscopio. Al día siguiente, se tratan las células durante 24 horas con 25 µg/mL de AgNPs, ó 100 µg/mL de CeO₂, TiO₂ y SiO₂-fluorescentes. Pasado este tiempo, se realizan lavados con medio de cultivo y se marcan, tanto la membrana como el núcleo. Para la membrana se usa un fluorocromo llamado *Cellmask* (Life Technologies) que se excita a una longitud de onda de 633 nm y emite a 650-785 nm, en el rojo lejano. Para el núcleo se usa un fluorocromo llamado *Hoechst 33342* que se excita a una longitud de 405 nm y emite en fluorescencia azul/cíjan con un máximo de emisión de alrededor de 425-475 nm. Ambos marcadores se usan a una concentración de 1/500. Después de 10 minutos de tinción se vuelven a hacer lavados con medio y se procede a la visualización en el microscopio confocal Leica TCS SP5 con objetivo de HC x PLAPO Lambda blue 63x x 1,40 *oil* UV. Los NMs AgNPs, CeO₂NPs y TiO₂NPs se observaron por reflexión usando una longitud de onda para la excitación de 488 nm y una de emisión de 480-495 nm. En el caso de las SiO₂-fluorescentes, se usó una longitud de onda de 488 nm y de emisión de 500-550 nm. Para el procesado de la imagen se usó el software *Huygens essential* 4.4.0p6 (Scientific Volume Imaging, Netherlands) y el software *Imaris* 7.2.1 (Bitplane, AG).

En el caso de las células diferenciadas, se trataron las células durante 24 horas con 50 µg/mL de AgNPs, ó 100 µg/mL de CeO₂NPs, TiO₂NPs y SiO₂NPs-fluorescentes. Para las células diferenciadas en *transwell* el marcaje es muy similar. Se usan los mismos marcadores y el mismo tiempo de tinción. Para el marcaje de la membrana se usa el *Cell Mask* (Life Technologies) y para el núcleo el *Hoechst 33342*, a una concentración de 2/500 y 1/500, respectivamente. Después de los lavados, se separa la superficie de PET, donde han crecido las células, del resto del soporte de plástico y se coloca boca abajo en la placa de petri *Glass Bottom Microwell Dishes* (MatTek, EUA) y se procede a su visualización y al procesado de las imágenes.

3.6.4. Translocación de las NPs

Para valorar, cualitativa y cuantitativamente, la presencia de NPs en el compartimento basolateral, es decir las NPs que han sido capaces de atravesar la monocapa de células, se usan las técnicas de TEM y la microscopía confocal para un análisis cualitativo, y el ICP-MS para un análisis cuantitativo.

a) *TEM*

El TEM tiene una resolución suficiente para permitir la observación de las NPs. No obstante, las aglomeraciones de las proteínas del medio y la gran cantidad de sales presentes en el mismo a menudo dificultan la visualización de éstas cuando se analiza el medio basolateral tras la exposición de las células durante 24 horas a las NPs. Para evitar estos problemas se decidió digerir las proteínas del medio con proteinasa K y después evaporar el medio basolateral de las muestras usando SpeedVac hasta los 100 μ L finales, concentrando así la muestra para facilitar el análisis. Para el análisis final, se depositan 8 μ L del medio basolateral concentrado en la rejilla de cobre, se deja secar y se procede a su visualización en el TEM JEM 1400.

b) *TEM-EDX*

Debido a la gran presencia de sales minerales y material orgánico que se encuentra en las muestras de medio basolateral para el TEM, y a pesar de las mejoras introducidas en el protocolo los resultados no resultaron muy concluyentes. Por ello se decidió usar el TEM acoplado al EDX (*Energy Dispersive X-Ray*) que nos permite detectar todos los elementos químicos presentes en un punto particular de la muestra. Así se podrán diferenciar las NPs de las sales por su composición química, aunque por la forma pueda haber confusión. Para ello se usa el microscopio JEOL 2011 con el EDX Oxford Instruments a 200 kV y 0,18 nm de resolución.

c) *Confocal*

Las muestras basolaterales, mejoran sustancialmente después del tratamiento con proteinasa K y de la evaporación y concentración de las mismas, pero aun así la visualización por TEM se hace complicada, y poder diferenciar las NPs de tamaño tan pequeño del resto de materia orgánica se hace realmente difícil. Por este motivo, se llevaron a cabo estudios utilizando microscopía confocal. Para ello, las preparaciones microscópicas se realizaron depositando 30 μ L de la muestra en un portaobjetos. Por reflexión o fluorescencia se ven únicamente las NPs y facilita la interpretación de los resultados.

d) *ICP-MS*

La ICP-MS es una técnica de análisis inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango ng/L-mg/L, además de poder llevar a cabo la determinación de los elementos en un análisis multi-elemental que provee la composición de la muestra analizada. En nuestro caso, nos puede permitir cuantificar la cantidad total de cerio, titanio y plata, aunque no

nos va a permitir diferenciar entre las formas NPs y el elemento en forma iónica. Para el análisis se recolectan los 0,5 mL de medio apical y los 1,5 mL de medio basolateral de los diferentes tratamientos.

Para el análisis se usa el ICP-MS Agilent, modelo 7500ce. Las muestras se conservan a 5 °C hasta su análisis. Las muestras de AgNPs y CeO₂NPs se digieren con HNO₃ concentrado (Merck, calidad suprapuro) en bloque calefactor Selecta a 150 °C durante 30 minutos. En el caso de las muestras de TiO₂NPs, éstas se digieren con HNO₃ y HF bajo condiciones similares.

3.6.5. Valoración del daño genotóxico/oxidativo: ensayo del cometa

Los niveles de daño genotóxico (roturas en el DNA) y de bases oxidadas en el DNA, producidos por la exposición a las distintas NPs, se estudiaron en las células diferenciadas de la monocapa mediante el ensayo del cometa. Para poder observar además del daño genotóxico producido, el daño oxidativo en el DNA se usó la enzima FPG, que es capaz de cortar el DNA por dónde se haya producido el daño oxidativo (eliminando la base dañada). De esta manera, al daño observado utilizando FPG (daño genotóxico+oxidativo) se le resta el valor obtenido en el ensayo sin FPG para obtener el denominado daño oxidativo neto, representativo del daño oxidativo de la muestra.

Para este estudio se utilizaron cuatro concentraciones de AgNPs, un control negativo (C-) y dos controles positivos (C+), el metil-metano sulfonato (MMS) para daño genotóxico, y el bromato de potasio (KBrO₃) para daño oxidativo.

Como en todos los ensayos de los estudios de interacción con la monocapa, los cultivos permanecieron 21 días diferenciándose en los *transwells* (ver apartado 3.1). Pasado este tiempo, se trataron las células con las diferentes concentraciones de AgNPs durante 24 horas. Pasadas las 24 horas se trataron los C+ durante 30 min a una concentración 5 mM de KBrO₃ y 0,5 mM de MMS. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento, se realizaron dos lavados de PBS y se procedió a la tripsinización de las células (1,5 X, 7 minutos) e inactivación de la tripsina, centrifugación durante 8 minutos a 1000 rpm y conteo de las células. Para este ensayo se necesita contar 100 células por réplica, así que se resuspendieron las células con PBS a la densidad celular a 10⁶ células/mL. Se añadieron 25 µL de esta dilución a 225 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 0,75% en PBS (sin Ca/Mg) con EDTA a 10 mM y un pH de 7,4, previamente preparado. Se depositaron tres gotas de 7 µL, por réplica y concentración, en un Gelbond® (GB, Lonza) para ver daño genotóxico y en otro para ver daño oxidativo. De esta forma se tienen unas 500 células por gota y resulta fácil el conteo. Los GB son láminas que tienen una superficie hidrofílica donde la agarosa se adhiere firmemente.

Una vez la agarosa se gelificó, se incubaron los dos GB en 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 de NaCl, 0,10 M de EDTA, 0,01 de Tris a pH 10) mantenidos a 4 °C durante toda la noche.

Se retiraron los dos GB de la solución de lisis y se realizaron dos lavados a 4 °C con el tampón de reacción enzimática (40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA a pH 8), el primero de 10 minutos y el segundo de 50 minutos. Después de los lavados, se incubaron los dos GB en tampón de enzimas previamente precalentado a 37 °C durante 30 min, uno sin la enzima FPG para observar daño genotóxico y la otra con la enzima, que detecta purinas oxidadas, por tanto daño oxidativo.

Para parar la reacción se realizó un lavado con la solución de electroforesis (0,3 M NaCl, 1 mM EDTA a pH 13,2) a 4 °C. Seguidamente se llevó a cabo un tratamiento alcalino, para producir fragmentos de DNA, sumergiendo los dos GB en la solución de electroforesis durante 35 minutos a 4 °C. Inmediatamente, se llevó a cabo la electroforesis a 4 °C a 20 voltios y 300 miliamperios durante 20 minutos, asegurándonos de que ambos GB están totalmente cubiertos.

Finalmente, para la neutralización de los GB se realizaron lavados con PBS a 4 °C seguido de un lavado con agua. Se fijaron los GB en etanol absoluto durante mínimo 1 hora a temperatura ambiente y se dejaron secar hasta su tinción.

Para la tinción se sumergieron los geles en TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA a pH 8) con SYBRGold 10x y se dejaron en agitación durante 20 minutos. Se aclararon las láminas con agua destilada para quitar el exceso de SybrGold y se dejaron secar al aire. Se marcaron los carriles y se procedió a la observación y análisis de las muestras.

El análisis se lleva a cabo utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 y el programa Komet 5.5 con un aumento de 20x. Se usa un filtro verde con una excitación a 460-500 nm y una emisión de 510-560 nm. Se cuentan 100 células por réplica, es decir, 200 células por tratamiento. El parámetro evaluado es el porcentaje de DNA en la cola de los cometas. A continuación se esquematiza el contenido de cada uno de los GB utilizados (Figura 16)

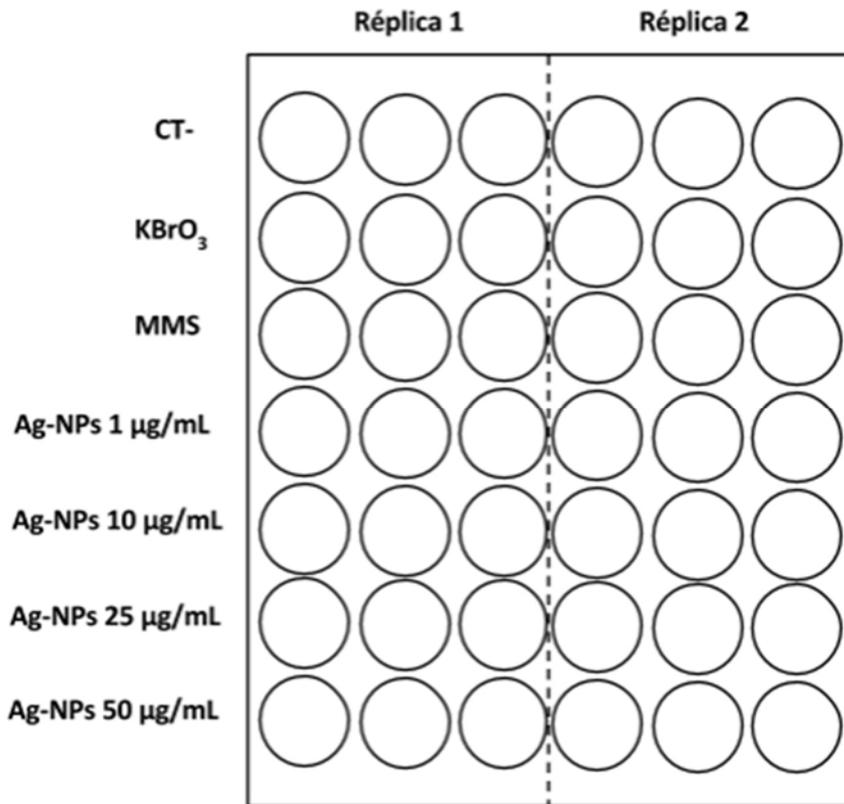


Figura 16. Esquema de la distribución de las distintas gotas/tratamientos depositados en los GB

3.6.6. Valoración de la monocapa a través de cambios en la expresión génica

Una forma indirecta de evaluar el estado de la monocapa es analizar la expresión de genes involucrados tanto en las uniones celulares (integridad de la monocapa) como en la diferenciación hacia intestino. Para ello se realizaron RT-PCR a tiempo real de los genes que codifican para las proteínas *claudinas* y *occludinas* involucradas en las uniones celulares estrechas, así como de los genes *SI* y *SLC15A1*, que básicamente codifican enzimas que se encuentran en la nueva zona apical que contiene las microvellosidades.

El proceso de la RT-PCR a tiempo real supone dos fases:

a) *Extracción del RNA*

Para la extracción del RNA se siguió el protocolo estándar del laboratorio en el cual se usa Trizol Reagent® (Invitrogen, USA, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El Trizol es un fenol modificado que se tiene que encontrar a temperatura ambiente para tener un pH de 6. Un pH diferente a 6 promueve la extracción de DNA en vez de RNA. El Trizol mantiene la integridad del RNA durante la homogenización y ayuda a la lisis celular. Hemos utilizado el protocolo estándar del laboratorio y recomendado por el

fabricante que incluye la extracción mediante el uso de trizol-cloroformo ó tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo. Después de ser extraído, el RNA total se trató con DNasa y se cuantificó mediante el *Nanodrop*.

b) *qRT-PCR*

Este proceso supone distintas etapas, a saber:

- *Diseño de cebadores*

Los cebadores para amplificar el RNA de los genes de interés (uniones estrechas y marcadores específicos de intestino) se diseñaron con el programa *Primer Designer* versión 1.01. Se eligieron secuencias de unos 20 pb, con un contenido en GC del 55-60%, con una Tm de alrededor de 60 °C, que fuesen poco complementarios entre ellos para evitar dímeros de cebadores, y que el producto amplificado se encontrara entre 150 y 300 pb de longitud. Se buscaron las secuencias de exones diferentes para evitar la amplificación de DNA contaminante de la extracción de mRNA que no se haya eliminado después del tratamiento con DNasa. Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, MO, USA) y a continuación se indican sus características (Tabla 4).

Tabla 4. Características de los cebadores utilizados.

Gen amplificado	Secuencia del cebador	Medida (pb)	Tm (°C)
<i>β-actina</i> (directo)	5'-GCATGGAGTCCTGTGGCATC-3'	217	60-62
<i>β-actina</i> (reverso)	5'-CCACACGGAGTACTTGCCT-3'		
<i>SLC15A1</i> (directo)	5'-CTTCGATGCTGTGCTGTACC-3'	241	60
<i>SLC15A1</i> (reverso)	5'-GGCCAAGTGTCACCATCTCT-3'		
<i>SI</i> (directo)	5'-TGGTGGCACTGTTATCCGAC-3'	256	60
<i>SI</i> (reverso)	5'-GACCACCACGGACATGTAGG-3'		
<i>CLAUDIN2</i> (directo)	5'-TACTCACCCTGGTGCCTGA-3'	183	60
<i>CLAUDIN2</i> (reverso)	5'-GAGAGCTCCTTGTGGCAAGA-3'		
<i>OCCLUDIN</i> (directo)	5'-ACAGACTACACAACCTGGCGG-3'	235	60
<i>OCCLUDIN</i> (reverso)	5'-GCAGCAGCCATGTACTCTTC-3'		

- *Retrotranscripción (RT)*

Ésta se realizó a partir de las muestras de RNA total. Por cada 20 µL de reacción se pueden usar hasta 2 µg de RNA total.

Para realizar la retrotranscripción se prepara una mezcla de reacción en hielo siguiendo las instrucciones de la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción utilizada en los experimentos de retrotranscripción

Componente	Volumen/Reacción (µL)
2X RT Buffer	10,0
20X RT Enzyme MIX	1,0
Nuclease-free H₂O	Hasta llegar a 20 µL
Muestra	Volumen necesario para poner 2 µg de RNA con un máximo de 9 µL
TOTAL por reacción	20 µL

A continuación se alicuotan 20 µL de la *mix* de reacción RT en cada pocillo o tubo y se centrifugan brevemente para hacer bajar todo el contenido y eliminar burbujas de aire. Se introducen las muestras en el termociclador (FlezyCycler, Analytik Jena AG, Alemania) y se empieza la retrotranscripción siguiendo los pasos de la Tabla 6.

Tabla 6. Pasos del experimento de retrotranscripción

	Paso 1	Paso 2	Paso 3
Temperatura (°C)	37	95	4
Tiempo (min)	60	5	Infinito

Finalmente las muestras de cDNA se guardan a -20 °C hasta su uso.

- *PCR a tiempo real*

Para llevar a cabo la PCR a tiempo real se utilizaron los cDNAs procedentes de la RT. Se utilizó el sistema LightCycler480® (Roche, Alemania). En este sistema de PCR a tiempo real, los ciclos típicos de una PCR (desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión) son más cortos ya que se utiliza un sistema de transferencia de calor por aire altamente eficaz. Esta técnica se utiliza para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación. Por eso se usa un fluorocromo del cual el LightCycler mide la fluorescencia, permitiendo así medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Estos datos son recogidos por el termociclador y se puede hacer un seguimiento de la reacción a tiempo real. El fluorocromo utilizado es el SYBR Green I, una molécula que se une al surco pequeño del DNA de doble cadena (dsDNA). Los niveles de fluorescencia aumentan en cada ciclo. Como el SYBR Green I se une a todas las moléculas de dsDNA, es recomendable hacer un gel de comprobación para descartar dímeros de cebadores y/o productos de amplificación inespecíficos, a pesar de que es posible obtener esta información mediante la curva de *melting*.

Se puede relacionar el ciclo lindar con la cantidad de DNA molde inicial. Ésta sigue una proporción lineal con el logaritmo del número de copias iniciales durante 6 ó más órdenes de magnitud.

$$N_f = N_0(1+Y)^n$$

Donde N_f = número de moléculas de DNA finales

N_0 = número de moléculas de DNA molde

Y = eficiencia o rendimiento del ciclo

n = Número de ciclos

El ciclo en el que la fluorescencia se eleva por encima del lindar depende de la cantidad de molde inicial (N_0), y el ciclo en que esto pasa recibe el nombre de punto de cruzamiento (C_p ; *crossing point*)

Los valores de los genes problema se normalizan con los genes de referencia, en nuestro caso la *B-ACTINA*, la expresión del cual se considera constante entre las células tratadas y las controles.

El proceso supone preparar una mezcla de cebadores, agua y el kit RNA Master SYBR Green I (Roche, Alemania). Este kit contiene una polimerasa *Hot start* con actividad retrotranscriptasa en presencia de RNA e iones de manganeso, y actividad DNA polimerasa dependiente de DNA.

Esta mezcla se prepara para cada gen y para tantas muestras como se carguen en la placa, según se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes de la mezcla mix utilizada en la PCR

	Cantidad	Concentración
Cebador directo (10 μM)	1 μ L	1 μ M
Cebador reverso (10 μM)	1 μ L	1 μ M
Agua	3 μ L	
Master Mix (2X)	10 μ L	2X

Finalmente se repartien 15 μ L de la mezcla en cada pocillo de la placa y se añaden 5 μ L de la muestra de cDNA procedente del tubo de la RT, quedando una cantidad final de 100 ng de cDNA. Se centrifuga la muestra 3 minutos a 3500 rpm y se carga la placa en el LightCycler®.

3.7. Estudios de larga duración

En esta parte de la Tesis, aunque independiente de los objetivos del proyecto europeo NANoREG, se usó una NP del mismo: AgNPs NM300K. En esta exposición de 6 semanas de duración, utilizando concentraciones subtóxicas de AgNPs, se pretende evaluar el efecto de las mismas en cuanto a su capacidad de inducir transformación celular. Para ello se analizaron distintos marcadores tales como (a) el tiempo de división de las células (*doubling time*), (b) crecimiento celular en *soft-agar* (tanto directo como indirecto), (c) secreción de MMPs mediante zimograma, (d) la capacidad de migración a través de pocillos, y (e) cambios en la expresión génica por qRT-PCR.

3.7.1. Proliferación celular

Las células, debido al tratamiento con NPs, pueden ver alterado su tiempo de división, ya sea tanto ralentizándolo como consecuencia de la internalización de las NPs, como acelerándolo por un mecanismo de transformación celular. El ensayo utilizado consiste en evaluar el tiempo de división celular en nuestra línea celular Caco-2 para cada uno de los tratamientos: CTA, CTB, 0,5A, 0,5B, 1A y 1B. El tiempo de división celular se midió contando el número de células a lo largo del tiempo, específicamente a las 24, 48, 72 y 96 horas. Para ello se sembraron 50.000 células en cada uno de los pocillos de placas de 12 pocillos, por duplicado, para cada uno de los tratamientos y para cada tiempo elegido.

3.7.2. Ensayo del *soft-agar*

Este ensayo nos permite evaluar la habilidad de las células para crecer en una matriz de agar sin necesitar la fijación a una superficie, característica habitual de las células transformadas y no de las normales. De este ensayo hemos realizado dos versiones distintas que denominamos directa e indirecta.

a) *Ensayo directo*

En este ensayo, además de los tratamientos, se ha usado un control negativo (sin células) para valorar las posibles contaminaciones bacterianas que podrían magnificar los resultados y darnos falsos positivos, y un control positivo, que en nuestro caso es la línea celular HCT116 que tiene la capacidad de crecer en el agar blando por ser tumoral.

Para la línea celular HCT116 se siembran 10.000 células por pocillo de placa de seis. Se usa el medio DMEM/F12 + 1% de NEEA + 10 FBS y una incubación de 15 días para visualizar las colonias.

El *soft-agar* está compuesto por dos capas de agar, la capa basal al 0,6% de agarosa y la capa superior que contiene agar al 0,4%, y es la que contendrá las células. Para la capa basal se necesita medio 2X DMEM suplementado con 20% FBS, 2% NEAA, 2% de L-glutamina y 2% de penicilina-streptomina, todo ello previamente calentado en el baño a 37 °C, y una solución de agar al 1,5% (Bacto-Agar, Difco). Se mezclan ambos componentes a igual volumen y se dispensan 1,5 mL en cada pocillo de placa de seis. Este paso hay que realizarlo rápidamente y sin burbujas, ya que el agar solidifica rápido. Las placas así obtenidas se guardan a 4 °C hasta su uso (hasta 1 semana).

Para montar la capa superior hace falta tripsinizar las células y suspenderlas en PBS 1X. Para asegurarnos que las células se siembran individualizadas, se pasan las células por un filtro de 30 µm y se cuentan con el método del contador Beckham Coulter® en una dilución 1/100. Mientras, se recuperan las placas con la capa basal de agar y se incuban unos 30 minutos a 37 °C como mínimo. Se deshace el agar al 1,2% y se deja en el baño a 40 °C hasta su utilización. Se prepara un volumen final de 1,75 mL de 1X DMEM + 10% FCS + 1% NEAA + 1% L-glutamina con el volumen de células necesarias para hacer triplicados, en nuestro caso 305.000 ya que sembraremos 100.000 por pocillo. En otro tubo se prepara una mezcla de 1,75 mL de 2X DMEM y 1,75 mL de agar 1,2% y se añade a la mezcla anterior con las células. Se mezclan de forma homogénea y rápidamente se dispensan 1,5 mL en cada pocillo sin hacer burbujas. Se dejan las placas a temperatura ambiente 45 minutos dentro de la campana de flujo y luego se colocan en el incubador a 37 °C y 5% de CO₂.

Pasados 15 días ya se pueden contar las colonias tanto de HCT116 como de Caco-2. Para ello se tiñen las colonias con INT (2-p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio clórico (Sigma, Cat. n USA. 1-8377). Un día antes de la tinción se prepara la solución INT a una concentración de 1 mg/mL. El INT se disuelve en agua estéril en una botella protegida de la luz, se autoclava durante 25 minutos y se guarda a 4 °C hasta su utilización. Para la tinción, se añade 1 mL de esta solución en cada pocillo y se incuba a 37 °C, como mínimo durante 12 horas. A continuación se escanean las placas, utilizando un escáner a una resolución mínima de 1200 ppp (píxeles por pulgada), y se analizan las imágenes utilizando el software OPENCFU 3.9 desarrollado por Quentin Geissmann (Geissmann, 2013).

b) Ensayo indirecto

Este ensayo es una modificación del *soft-agar* directo. En este caso se valora la promoción del crecimiento de unas células que ya poseen una capacidad innata de

crecer en el agar blando. Así, después del tratamiento con AgNPs, las células Caco-2 se cultivan en un medio sin suero durante 72 horas. De esta forma, las células secretan su medio factores de crecimiento y citoquinas que pueden ejercer de promotor de expansión en el crecimiento de un tumor. Este medio de cultivo se denomina medio condicionado (CM, *conditioned media*) y representa el secretoma de las células expuestas.

Se usa la línea celular HCT116, que es la que se ha usado como control positivo en el *soft-agar* directo. Del mismo modo, se siembran 10.000 células por pocillo de placa de seis. Se usa el medio DMEM/F12 + 1% de NEEA +10% FBS y una incubación de 15 días para visualizar las colonias resultantes.

El protocolo a seguir es similar al del *soft-agar* directo, con una modificación en el momento de la preparación de las células. Así, la capa basal de agar se prepara de la misma forma que en el *soft-agar* directo. Para montar la capa superior hace falta tripsinizar las células HCT116 y suspenderlas en PBS 1X; para ello se filtran para individualizarlas y se cuentan. Se recuperan las placas con la capa basal y se dejan 30 minutos a 37 °C como mínimo. Se deshace el agar al 1,2% y se deja en el baño térmico a 40 °C hasta su utilización. La diferencia es que se prepara un volumen final de 1.400 µL de CM, 175 µL de DMEM/F12 sin FBS y 175 µL de FBS 10% con el volumen de células necesarias para hacer triplicados. Los siguientes pasos son exactamente iguales: en otro tubo se prepara una mezcla de 1,75 mL de 2X DMEM y 1,75 mL de agar al 1,2% y se añade a la mezcla con las células. Se mezclan de forma homogénea y rápidamente se dispensan 1,5 mL en cada pocillo sin hacer burbujas y se dejan en el incubador durante 15 días hasta su tinción y recuento.

Para la realización de los controles positivos se utilizan 1,75 mL de medio DMEM/F12 + 10% FBS, y 1,75 mL de medio DMEM/F12 + 30% FBS, respectivamente, para la mezcla con las células y para la valoración del efecto del suero.

3.7.3. Ensayo del zimograma

En cualquier estudio de transformación celular es importante la evaluación de la potencialidad de producir angiogénesis y metástasis. Dado que en estos procesos las MMPs juegan un papel muy relevante, su detección y cuantificación son herramientas básicas en cualquier estudio de transformación celular *in vitro*.

Una de las técnicas utilizada para detectar estas MMPs es el zimograma, y más concretamente el zimograma dependiente de sustrato. En nuestro caso, como se ha evaluado la presencia de la MMP-2 y la MMP-9 se usa la gelatina como sustrato (Snoek-van Beurden y Von den Hoff, 2005; Wilkesman y Kurz, 2012). Para ello se recolecta el

CM tal y como se ha explicado en el apartado anterior. En algunos tipos celulares en que la secreción de MMPs –y, en general, de otros factores de crecimiento- es muy baja, es necesario concentrar la muestra de CM antes de utilizarla para la técnica del zimograma. Para ello, se centrifuga el medio condicionado en el SpeedVac a temperatura ambiente durante 3 horas, hasta que el volumen se reduce a 0,2 mL totales. Una vez concentrado el CM, se mezcla en tampón de carga y se cargan 30 µL de la muestra en un gel de SDS (dodecilsulfato sódico) con poliacrilamida al 10-12% que contiene gelatina. Este gel correrá mediante electroforesis en condiciones no reductoras durante 90 minutos a 100 V hasta que el azul de bromofenol desaparezca. El SDS provocará la transición de la forma pre-enzimática a la forma intermediaria, y la consecuente migración a través del gel según su peso molecular (Springman et al., 1990). Una vez acabada la electroforesis, se incuba el gel durante 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de renaturalización 1X que contiene Tritón® X-100 que permite la transformación a la forma enzimática activa final. Después se incuba el gel en una solución de revelado 1X, primero durante 30 minutos en agitación y luego durante toda la noche a 37 °C permitiendo la degradación de la gelatina por parte de las MMPs. Pasado este tiempo se realiza una contra-tinción con Comassie Blue® a una concentración 0,5% ó 0,1% durante 45 minutos y se realizan varios lavados hasta que se visualiza la banda en el gel correspondiente a la posición y cantidad de MMPs. El grosor y la intensidad de las bandas blancas serán directamente proporcionales a la cantidad de MMPs activas que han degradado la gelatina. Los geles se escanean y cuantifican utilizando el ImageJ (Ferreira y Rasband, 2012).

3.7.4. Ensayo de migración

Otra de las características que adquiere una célula transformada es la capacidad de migración. Así, estas células pueden migrar a otros tejidos para acabar invadiéndolos y formando otro tumor en una zona alejada del original.

Para evaluar la capacidad de migración de una línea celular, se usan *transwells* o insertos de un tamaño de poro de 8 µm. Se siembran 50.000 células en la parte apical del *transwell* en un medio sin suero. En la cámara basolateral se añade medio con un elevado contenido en FBS que actúa como químico-atrayente, en nuestro caso a una concentración del 40%. Las células que tengan la capacidad de migrar pasarán a la cámara basolateral y se contarán con el Cell Counter®.

3.6.5. RT-PCR a tiempo real

Con tal de evaluar algunos genes que se ven afectados con la transformación celular, se decidió evaluar mediante RT-PCR a tiempo real los niveles de mRNA durante las diferentes semanas de tratamiento. Siguiendo el protocolo previamente explicado en el apartado 3.5.6, se realizó la extracción de RNA y su retrotranscripción de las muestras CTA, CTB, 0,5A, 0,5B, 1A y 1B tratadas con AgNPs a las 24 horas de tratamiento, a las 2 semanas y a las 6 semanas. Después se realizó la PCR a tiempo real también tal y como se ha indicado con anterioridad.

De forma sintética, se resumen los genes analizados a continuación:

Genes de transición epitelio-mesénquima, involucrados en el reclutamiento de corepresores transcripcionales y moduladores epigenéticos de E-cadherina y otras proteínas de unión que codifican genes promotores (Pardali y Moustakas, 2007):

SNAIL1 → es un represor transcripcional con dedos de zinc que regula a la baja la expresión de genes ectodérmicos dentro del mesodermo.

SLUG → Este gen codifica un miembro de la familia Snail de factores de tipo C_2H_2 dedo de zinc de transcripción. La proteína actúa como un represor transcripcional que se une a motivos E-box. Esta proteína está implicada en EMT y tiene actividad antiapoptótica.

PTEN → Este gen fue identificado como un supresor tumoral que está mutado en un gran número de tipos de cáncer. La proteína codificada por este gen es un fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa. Contiene una tensina como dominio, así como un dominio catalítico similar al de los productos de doble especificidad proteína tirosina-fosfatasas. A diferencia de la mayoría de las proteínas tirosina-fosfatasas, esta proteína regula negativamente los niveles intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato en las células y funciona como un supresor de tumores, regulando negativamente la vía de señalización AKT / PKB.

VEGFA → Este gen es un miembro de la familia del factor de crecimiento *PDGF / VEGF*. Codifica una proteína de unión a la heparina, que existe como un homodímero unido por enlaces disulfuro. Este factor de crecimiento induce la proliferación y migración de células endoteliales vasculares, y es esencial tanto para la angiogénesis fisiológica como patológica. Este gen está regulado positivamente en muchos tumores conocidos y su expresión se correlaciona con el estadio del tumor y la progresión.

EPCAM → Este gen codifica un antígeno asociado a carcinoma. Este antígeno se expresa en la mayoría de las células epiteliales normales y en carcinomas gastrointestinales, funcionando como una molécula de adhesión celular independiente del calcio.

Genes de unión entre células:

CDH1 → Este gen codifica una cadherina clásica de la superfamilia de cadherina. Esta proteína de adhesión célula-célula, dependiente de calcio, se compone de cinco repeticiones de cadherina extracelulares, una región transmembrana y una cola citoplásmica muy conservadas. La pérdida de la función de este gen se cree que contribuyen a la progresión del cáncer mediante el aumento de la proliferación, invasión y/o metástasis.

ZO-1 → Este gen codifica una proteína que se encuentra en la superficie de la membrana citoplasmática de las uniones estrechas intercelulares. La proteína codificada puede estar implicada en la transducción de señales en las uniones célula-célula.

Genes que controlan la morfología a la célula:

ACTA2 → El producto codificado por este gen pertenece a la familia de proteínas de la actina, que son proteínas altamente conservadas que desempeñan un papel en la motilidad celular, la estructura y la integridad.

VIM → Este gen codifica un miembro de la familia de filamentos intermedios. Los filamentos intermedios, junto con los microtúbulos y microfilamentos de actina, conforman el citoesqueleto. La proteína codificada por este gen es responsable del mantenimiento de la forma celular, la integridad del citoplasma, y la estabilización de las interacciones del citoesqueleto. Funciona como un organizador de una serie de proteínas implicadas en la unión, la migración y la señalización celular.

A continuación se indican las características de los cebadores utilizados en los estudios de expresión de estos genes (Tabla 8):

Tabla 8. Características de los cebadores utilizados.

Gen amplificado	Secuencia del cebador	Tm (°C)
<i>β-actina (directo)</i>	5'-GAGAAAATCTGGCACACACC-3'	60-65
<i>β-actina (reverso)</i>	5'-GGATAGCACAGCCTGGATAGCA-3'	
<i>SLUG (directo)</i>	5'-CAACGCCTCCAAAAAGCCAA-3'	60
<i>SLUG (reverso)</i>	5'-ACTCACTCGCCCCAAAGATG-3'	
<i>SNAIL1 (directo)</i>	5'-TCTCTGAGGCCAAGGATCTC-3'	65
<i>SNAIL1 (reverso)</i>	5'-CCTGGCACTGGTACTTCTTG-3'	
<i>PTEN (directo)</i>	5'-CAGTCAGAGGCGCTATGTGT-3'	65
<i>PTEN (reverso)</i>	5'-CACACACAGGTAACGGCTGA-3'	
<i>VEGFA (directo)</i>	5'-GCAGCTACTGCCATCCAATC-3'	65
<i>VEGFA (reverso)</i>	5'-TCTCTCCTATGTGCTGGCCT-3'	
<i>EpCAM (directo)</i>	5'-GAACACTGCTGGGGTCAGAA-3'	60
<i>EpCAM (reverso)</i>	5'-AGCCACATCAGCTATGTCCAC-3'	
<i>CDH1 (directo)</i>	5'-GCCTCTGGATAGAGAACGCA-3'	65
<i>CDH1 (reverso)</i>	5'-GAGGATGGTGTAAAGCGATGG-3'	
<i>ZO1 (directo)</i>	5'-GAGAGGTGTTCCGTGTTGTG-3'	65
<i>ZO1 (reverso)</i>	5'-GCTGCGAAGACCTCTGAATC-3'	
<i>VIM (directo)</i>	5'-GTGGACCAGCTAACCAACGA-3'	60
<i>VIM (reverso)</i>	5'-AAGGTCAAGACGTGCCAGAG-3'	
<i>ACTA2 (directo)</i>	5'-AGCGTGGCTATTCTTCGTT-3'	60
<i>ACTA2 (reverso)</i>	5'-TGAAGGATGGCTGGAACAGG-3'	

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de los NMs

Los NMs usados en esta Tesis se han caracterizado siguiendo las instrucciones del proyecto NANoREG, como bien se ha descrito en el apartado 3.3 de la sección de Materiales y Métodos.

4.1.1. Caracterización usando TEM

En las imágenes obtenidas por el TEM se observa la morfología de cada uno de los NMs utilizados. Como se observa en la Figura 17, las TiO₂NPs NM100 muestran una morfología más o menos esférica (A), mientras que las NM101 son más pequeñas y crean agregados irregulares, sin observar NPs individuales (B). La morfología de las ZnONPs NM110 es muy variada y se observan múltiples formas: varillas, esferas, óvalos, etc. que además tienden a formar agregados (C). En el caso de las SiO₂NPs NM200 y NM203, no se observó una morfología clara sino más bien amorfa y con fuerte agregación, parecido a escamas (D, E). Aunque la NM203 tiene una morfología muy similar a la NM200 se aprecian de forma más evidente las NPs individuales. En cambio, en el caso de las SiO₂NPs fluorescentes cargadas negativamente [SiO₂@IIT (-)], éstas muestran una morfología esférica muy definida (F). Las CeO₂NPs NM212 muestran una morfología geométrica variada incluyendo estructuras cúbicas, aunque también se muestran agregadas (G). Las AgNPs NM300K tienen una morfología esférica (H) mientras que los MWCNT NM401 presentan una morfología fibrilar (I), ya que son nanotubos.

Los tamaños medios y las desviaciones estándar de cada uno de los NMs se indican en la Tabla 9. En orden creciente se observa la siguiente relación de tamaño: NM300K < NM200 < NM203 < NM101 < NM212 < SiO₂@IIT(-) < NM100 < NM110 < NM401.

La distribución del tamaño sigue una distribución normal para todos los NMs (Figura 18), por lo que las células estarán expuestas en su mayor medida a NMs del tamaño medio pero también, aunque en menor medida, a NMs de tamaños más grandes y más pequeños.

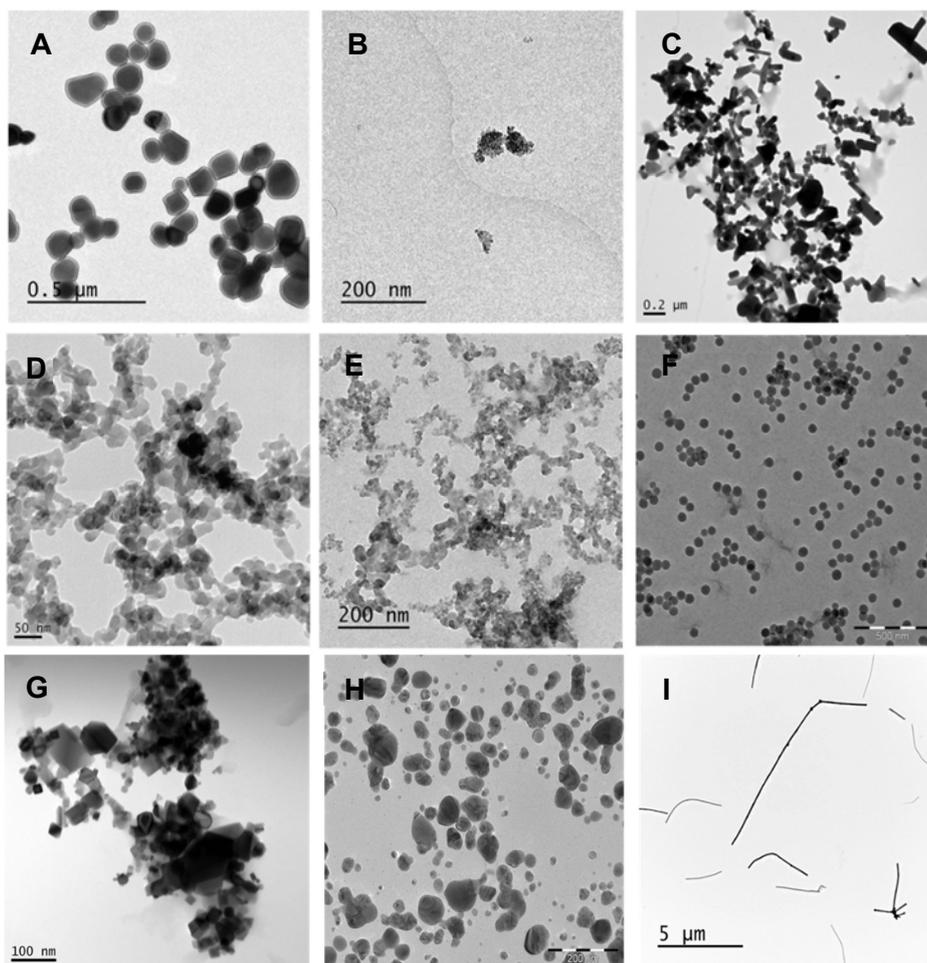


Figura 17. Imágenes obtenidas por TEM de las TiO₂NPs NM100 (A), TiO₂NPs NM101 (B), ZnONPs NM110 (C), SiO₂NPs NM200 (D), SiO₂NPs NM203 (E), SiO₂@IIT(-) (F), CeO₂NPs NM212 (G), AgNPs NM300K(H), y MWCNT NM401(I).

Tabla 9. Tamaño en nm de los NMs usados. Estas medidas se han calculado a partir de 100 imágenes individualizadas obtenidas por el TEM.

	NM código ID	Tamaño TEM (nm) ± SD
TiO₂	NM100	104.01 ± 39.42
	NM101	54.69 ± 35.39
ZnO	NM110	132.37 ± 69.53
SiO₂	NM200	16.53 ± 4.18
	NM203	24.26 ± 9.38
	SiO ₂ @IIT(-)	73.206±11.611
CeO₂	NM212	70.33 ± 49.61
Ag	NM300K	7.75 ± 2.48
MWCNT	NM401	6012.093 ± 4091.45

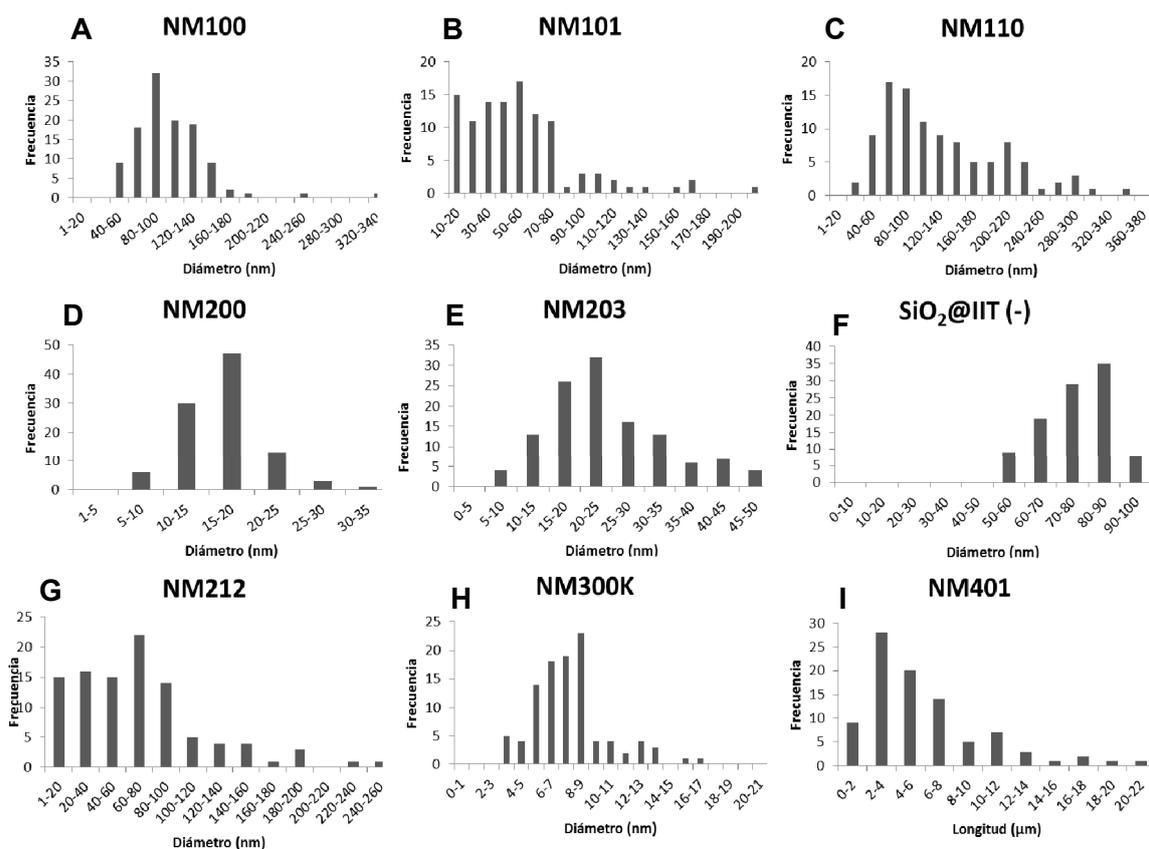


Figura 18. Distribución del tamaño de los NMs TiO₂NPs NM100 (A), TiO₂NPs NM101 (B), ZnONPs NM110 (C), SiO₂NPs NM200 (D), SiO₂NPs NM203 (E), SiO₂@IIT(-) (F), CeO₂NPs NM212 (G), AgNPs NM300K(H) y MWCNT NM401(I).

4.1.2. Caracterización usando Zetasizer

El tamaño de todos los NMs en dispersión se evaluó mediante su valor de DLS. En la Tabla 10 se observan los resultados de este análisis.

Se evaluaron los dos tipos de TiO₂NPs, el NM100 y el NM101. Para el NM100 no se observaron diferencias en el tamaño en dispersión entre las diferentes concentraciones y tampoco entre los diferentes tiempos de incubación en el medio de cultivo. Respecto el NM101, se encontró bastante variabilidad entre los valores obtenidos por los distintos grupos del proyecto europeo. Aun así, nosotros observamos, en líneas generales, una mayor agregación cuando se aumentaba la concentración.

Para el ZnONPs, se analizó únicamente el NM110. Se observó un mayor tamaño de este NM cuando se encontraba en medio de cultivo, que en estado seco (TEM). En la concentración más baja, además, se observó un decrecimiento del tamaño, posiblemente explicado con la capacidad de este NM de disolverse en iones.

Para las SiO₂NPs se analizaron 3 tipos: 2 sílicas normales (NM200 y NM203) y una fluorescente [SiO₂@IIT (-)]. En el caso del NM200, se observó mucha variabilidad y, sorprendentemente, más agregación en la concentración de 10 µg/mL que, además, aumenta con el tiempo de incubación. En el caso de NM203, ocurrió a la inversa, se observó un tamaño menor de sílica en la concentración más baja aunque también aumentó el tamaño con el tiempo de incubación. Para la SiO₂@IIT(-), se observó mayor agregación cuanto más alta era la concentración de NM.

Para las CeO₂NPs NM212, también se observó incremento del tamaño con la concentración pero no con el tiempo de incubación.

Por lo que respecta a las AgNPs NM300K también incrementan su tamaño con la concentración, y sólo en la concentración de 10 µg/mL se observó un aumento del tamaño con el tiempo de incubación.

Finalmente, para los MWCNT NM401 se observó un tamaño muy superior en el stock que en el medio de cultivo. Aun así, habría que señalar que el DLS no es una manera muy fiable de caracterizarlos debido a su forma de tubo.

Cuando se calculó el índice de polidispersión (PDI), todos los NMs a todas las concentraciones y tiempos de incubación se encontraron monodispersos (PDI<0,5), es decir, que no se observaron dos tipos de poblaciones de agregados con medidas diferentes (Tabla 10).

4.2. Viabilidad celular/ensayo de toxicidad

Para decidir las concentraciones con las que realizar los estudios de transporte y los de larga duración, se realiza un ensayo de viabilidad celular o de toxicidad. En los estudios de transporte, en el proyecto NANoREG se decidió realizar la toxicidad solamente en las células indiferenciadas (Figura 19), a pesar de que los estudios se realicen con las Caco-2 diferenciadas, ya que en su estado indiferenciado las células son más sensibles y así las concentraciones subtóxicas lo serán para el estado diferenciado. Sin embargo, ya que ésta ha sido la primera vez que se usaba esta línea diferenciada en nuestro laboratorio y se quiere usar como modelo de barrera en futuros estudios, quisimos comprobar que realmente las células diferenciadas son más resistentes, así que realizamos igualmente la toxicidad en células diferenciadas (Figura 20).

Tabla 10. Tamaño y valores de PDI de los NMs analizados por DLS.

Compuesto	NM	Institución	Tamaño (d.nm)												PDI												
			2,56 mg/mL			100 µg/mL			10 µg/mL			2,56 mg/mL			100 µg/mL			10 µg/mL			10 µg/mL						
			0h	Media	SD	0h	Media	SD	0h	Media	SD	0h	Media	SD	0h	Media	SD	0h	Media	SD	0h	Media	SD	0h	Media	SD	
TiO ₂	NM100	UAB	244,70	271,90	28,09	345,13	7,85	311,53	3,84	316,43	10,88	0,36	0,36	0,04	0,14	0,03	0,11	0,04	0,23	0,02	0,35	0,01	0,23	0,02	0,35	0,01	
			397,97	241,07	1,22	262,27	4,25	140,77	23,93	177,27	1,75	0,27	0,01	0,16	0,02	0,14	0,01	0,14	0,01	0,79	0,18	0,28	0,01	0,79	0,18	0,28	0,01
ZnO	NM110	UAB	244,70	463,00	1,21	440,27	9,94	352,53	10,75	186,33	3,69	0,10	0,03	0,35	0,01	0,43	0,02	0,48	0,03	0,48	0,03	0,24	0,00	0,48	0,03	0,24	0,00
			183,60	151,67	0,71	177,60	106,78	349,13	24,52	444,50	28,62	0,32	0,03	0,34	0,06	0,60	0,21	0,46	0,01	0,46	0,01	0,48	0,04	0,46	0,01	0,48	0,04
SiO ₂	NM200	UAB	135,53	141,40	5,04	170,90	1,68	41,15	1,04	141,20	2,86	0,17	0,01	0,44	0,09	0,28	0,01	1,00	0,00	1,00	0,00	0,26	0,01	1,00	0,00	0,26	0,01
			1275,00	432,30	43,78	281,70	7,53	71,25	25,57	281,30	10,30	0,23	0,13	0,43	0,04	0,36	0,03	0,41	0,08	0,41	0,08	0,30	0,03	0,41	0,08	0,30	0,03
CeO	NM212	UAB	302,77	278,50	1,18	289,37	4,62	240,10	0,60	244,50	2,36	0,18	0,03	0,17	0,01	0,18	0,02	0,26	0,01	0,26	0,01	0,26	0,00	0,26	0,01	0,26	0,00
			102,38	99,97	1,05	94,47	0,34	68,96	1,96	92,06	2,88	0,27	0,01	0,40	0,01	0,39	0,01	0,39	0,01	0,52	0,04	0,43	0,02	0,52	0,04	0,43	0,02
Ag	NM300K	UAB	6934,67	955,70	5,24	934,97	19,37	968,83	47,31	867,73	111,68	0,36	0,05	0,35	0,05	0,31	0,04	0,47	0,04	0,47	0,04	0,52	0,16	0,47	0,04	0,52	0,16
			118,49	955,70	5,24	934,97	19,37	968,83	47,31	867,73	111,68	0,36	0,05	0,35	0,05	0,31	0,04	0,47	0,04	0,47	0,04	0,52	0,16	0,47	0,04	0,52	0,16
MWCNT	NM401	UAB	6934,67	955,70	5,24	934,97	19,37	968,83	47,31	867,73	111,68	0,36	0,05	0,35	0,05	0,31	0,04	0,47	0,04	0,47	0,04	0,52	0,16	0,47	0,04	0,52	0,16

Los resultados indican que no se han observado toxicidades superiores al 80% en prácticamente ningún tratamiento en las células indiferenciadas; tan sólo tras la exposición a 24 horas de ZnONPs (Figura 19.C) y AgNPs (Figura 19.H) se supera dicho límite. En ambos casos se observa un decrecimiento exponencial de la supervivencia de las células, siendo las AgNPs más tóxicas que las ZnONPs. Los valores de IC_{50} obtenidos fueron de 12,23 $\mu\text{g/mL}$ para las AgNPs y de 49,83 $\mu\text{g/mL}$ para las ZnONPs. Efectivamente, como se esperaba, las células diferenciadas son más resistentes. Las NPs que no resultaron tóxicas en el ensayo con células indiferenciadas tampoco lo han sido en las células diferenciadas y las dos NPs que sí lo fueron, AgNPs y ZnONPs, han resultado tener una IC_{50} mayor, siendo de 129,37 $\mu\text{g/mL}$ y de 232,85 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Las concentraciones finales con las que llevar a cabo los estudios de transporte fueron elegidas conjuntamente por todos los miembros del NANoREG. Se buscaron concentraciones subtóxicas que no comprometieran la supervivencia de las células de la monocapa. Para las NPs que no resultaron ser tóxicas en el rango analizado, se decidió usar las concentraciones de 10, 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$, todas en el rango de subtóxicas. Hay que indicar que la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ es una concentración muy alta a pesar de no ser tóxica, pero se decidió usarla para forzar el sistema. Para las ZnONPs se decidió usar las concentraciones de 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y para las AgNPs las concentraciones de 1, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Del mismo modo, se usaron concentraciones subtóxicas y concentraciones que forzaran el sistema de barrera Caco-2.

Para los estudios de larga duración se decidió trabajar con las AgNPs por su toxicidad y por su relevancia en la exposición gastrointestinal al ser usada en aditivos alimentarios y en envoltorios de comida, dadas sus propiedades antibacterianas. Se decidió usar las concentraciones subtóxicas de 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$. Estas concentraciones se eligieron a partir de la curva de toxicidad, ya que no hay valores de la exposición humana real a estas NPs.

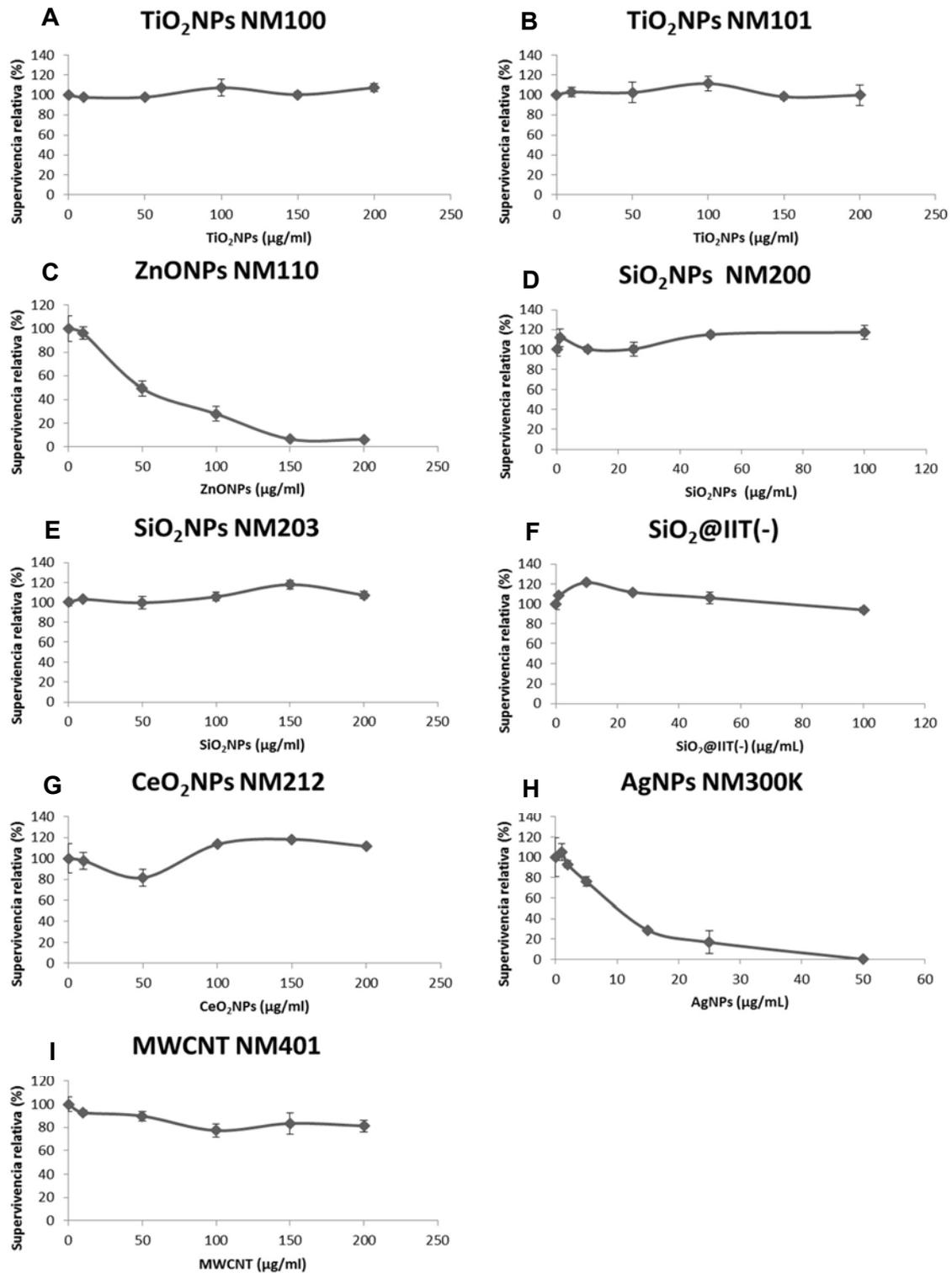


Figura 19. Curvas de supervivencia de las Caco-2 indiferenciadas tras la exposición a los diferentes NMs durante 24 horas: TiO₂NPs NM100 (A), TiO₂NPs NM101 (B), ZnONPs NM110 (C), SiO₂NPs NM200 (D), SiO₂NPs NM203 (E), SiO₂@IIT(-) (F), CeO₂NPs NM212 (G), AgNPs NM300K (H), y MWCNT NM401 (I).

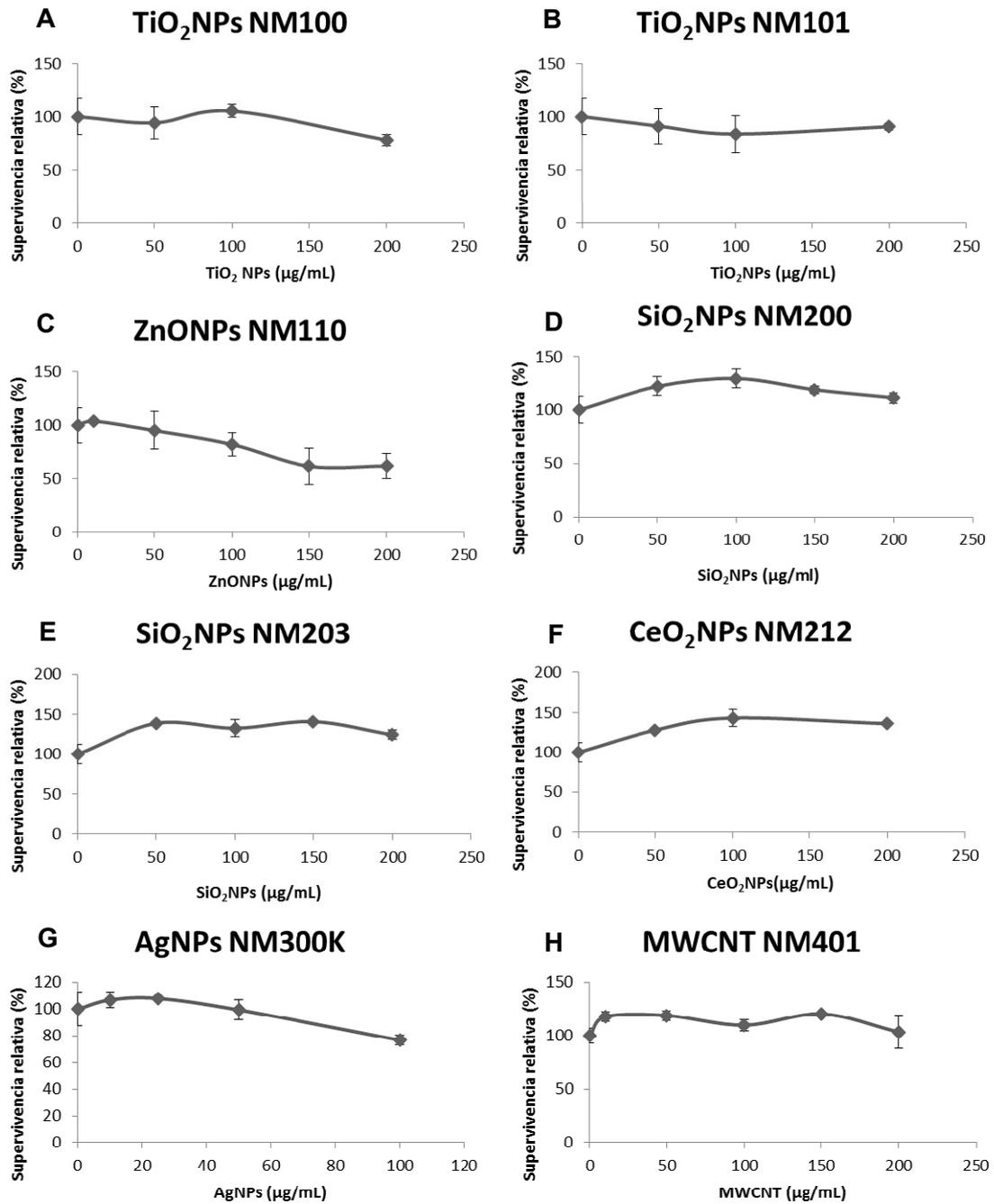


Figura 20. Curvas de supervivencia de las Caco-2 diferenciadas tras la exposición a los diferentes NMs durante 24 horas: TiO₂NPs NM100 (A), TiO₂NPs NM101 (B), ZnONPs NM110 (C), SiO₂NPs NM200 (D), SiO₂NPs NM203 (E), CeO-NPs NM212 (F), AgNPs NM300K (G), y MWCNT NM401 (H).

4.3. Estudios de transporte

4.3.1. Puesta a punto del protocolo

El objetivo principal de esta Tesis era el de poner a punto y evaluar el uso de las Caco-2 diferenciadas como modelo *in vitro* de barrera intestinal. Siguiendo el protocolo proporcionado por el proyecto europeo NANoREG, se sembraron las células sin ningún tipo de tratamiento y se evaluó la integridad de la monocapa, mediante los valores de TEER, y la morfología de la misma mediante TEM. Éste fue un análisis previo del estado de nuestras células una vez diferenciadas, ya que nunca se había trabajado con estas células diferenciadas en el laboratorio.

En la Figura 21 se observa el incremento muy significativo de los valores de TEER de los *transwells* con células respecto los *transwells* sin células. Además de esta diferencia, también se observa que los valores de TEER aumentan progresivamente con los días posteriores a la siembra, llegando a un *plateau* el día 14 post-siembra.

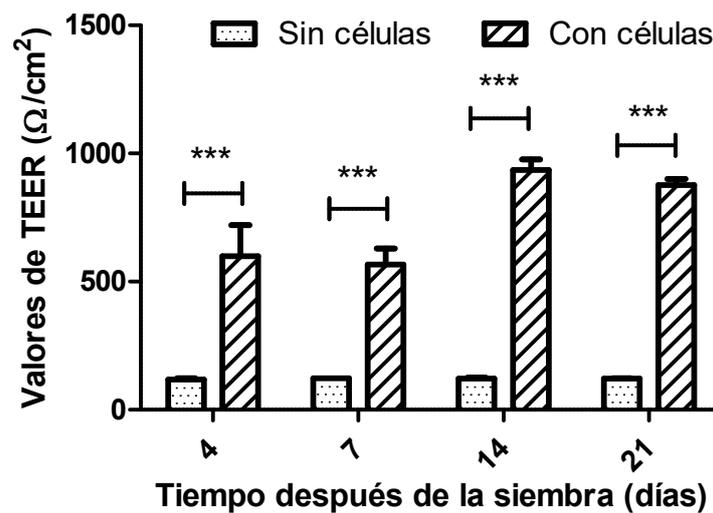


Figura 21. Valores de TEER en *transwells* sin células y en *transwells* con células Caco-2. Se expresan los valores medios y el SEM. *** $P < 0,001$.

En cuanto a la morfología, las imágenes del TEM nos permiten observar las células diferenciadas tanto individualizadas como en el *transwell* intactas. En la Figura 22 se observan las células (C) en monocapa una al lado de la otra, polarizadas, con microvellosidades (MV) sólo en la parte apical y uniones entre células (TJ) tal y como se describe en la bibliografía.

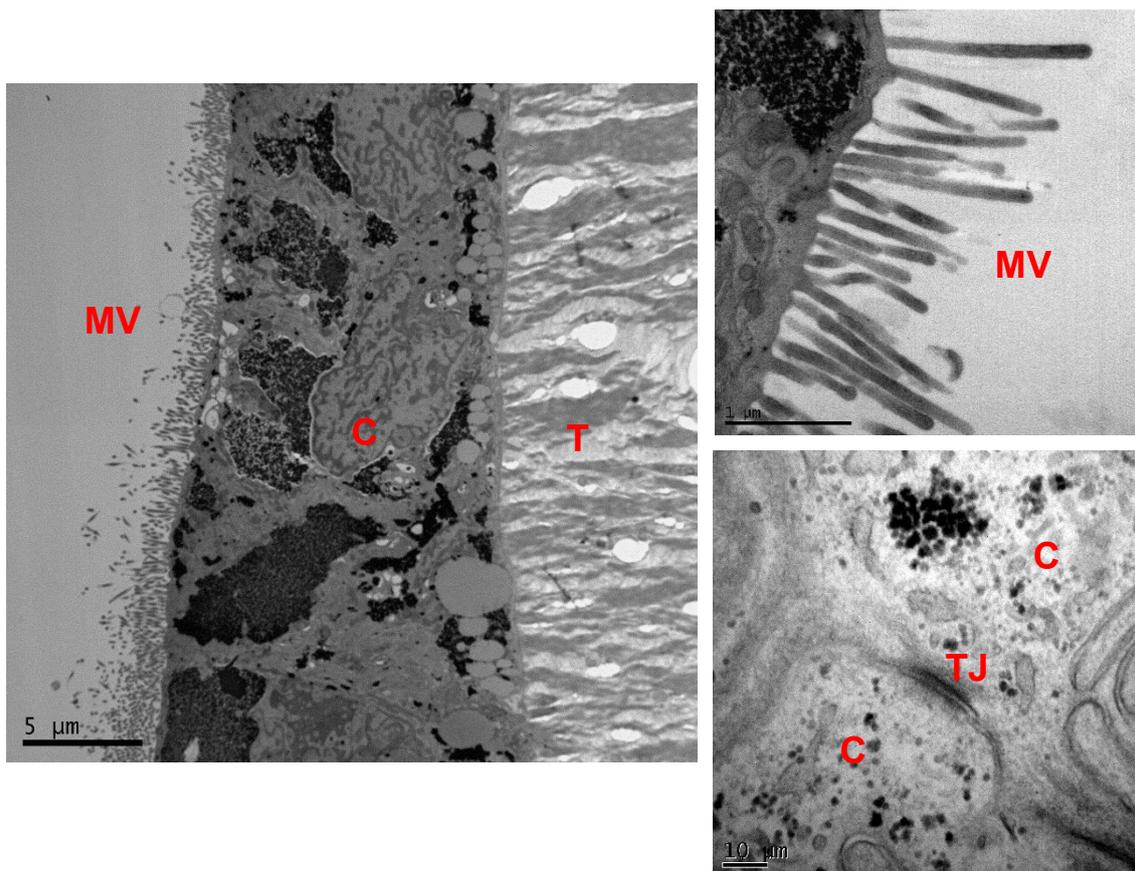


Figura 22. Imágenes del TEM de la monocapa de células diferenciadas. Se observan las células en monocapa (C), las microvellosidades (MV) y las uniones estrechas (TJ) encima del soporte del *transwell* (T).

4.3.2. Evaluación de la integridad y de la permeabilidad

Las NPs pueden dañar la monocapa, independientemente de su capacidad para internalizarse en ella o cruzarla. La alteración de la integridad de la monocapa puede afectar la permeabilidad a otros compuestos, así, compuestos que no son capaces de cruzar la monocapa en condiciones normales, pueden cruzarla, si está alterada, y afectar a otros tejidos diana.

a) TEER

Los valores de TEER aumentan progresivamente durante la diferenciación de las células Caco-2, como se ha descrito en la bibliografía, y como se demostró en la puesta a punto de la técnica (Figura 21). Sin embargo, antes de iniciar los experimentos con las NPs debemos asegurarnos de que esto es así. Por esto hemos medido los valores de TEER durante la diferenciación, justo antes de tratar las células y, finalmente, 24 horas después del tratamiento con las NPs. Si la integridad de la monocapa no es la correcta, se suspende el experimento. En el proyecto europeo NANoREG se consideró como valor aceptable un TEER $> 150 \Omega/\text{cm}^2$. En nuestro caso, este valor lo hemos encontrado

insuficiente y, aunque no nos marca un determinado valor como el aceptable, el TEER pre-tratamiento (21 días post-siembra) debía ser superior o igual al día 14 post-siembra, nunca disminuir de manera significativa. La Figura 23 muestra como los valores de TEER al finalizar la diferenciación, es decir, el día 21 post-siembra, varían entre 350 y 650 Ω/cm^2 entre los diferentes experimentos. Esta diferencia se debe al número de pases que lleva la célula en cultivo ya que esta línea celular aumenta su número de divisiones con el número de pases. De esta misma forma, se ha visto que los valores de TEER post-diferenciación son más elevados con el número de pases. Desde el proyecto NANoREG se acordó descartar las células Caco-2 cuando llegan a los 15 pases, intentando evitar que se acumule mayor variabilidad.

En ninguno de los tratamientos con las diferentes NPs (TiO_2 , ZnO , SiO_2 , CeO_2 , Ag y MWCNT) se observó disminución de los valores de TEER; por tanto, no se observó alteración de la integridad de la monocapa tras la exposición durante 24 horas a las diferentes NPs utilizadas en nuestro estudio (Figura 23).

b) Lucifer Yellow

Una vez medido el TEER después de la exposición a las distintas NPs, se realizó el ensayo con el compuesto LY. Como es un compuesto de transporte paracelular, la presencia de este compuesto en la cámara basolateral nos indicará que la membrana es más permeable a los compuestos y que éstos pueden pasar entre las células debido a que las uniones entre ellas se han desestabilizado después de la exposición a las distintas NPs. En la Figura 24 se observa que no hay diferencias significativas en la permeabilidad frente a LY tras la exposición con las distintas NPs utilizadas, al comparar los valores observados con los obtenidos en el control sin tratamiento.

Como conclusión, nuestros resultados indican que ninguna de las NPs utilizadas altera ni la integridad ni la permeabilidad de la monocapa de células Caco-2 tras la exposición a éstas durante 24 horas.

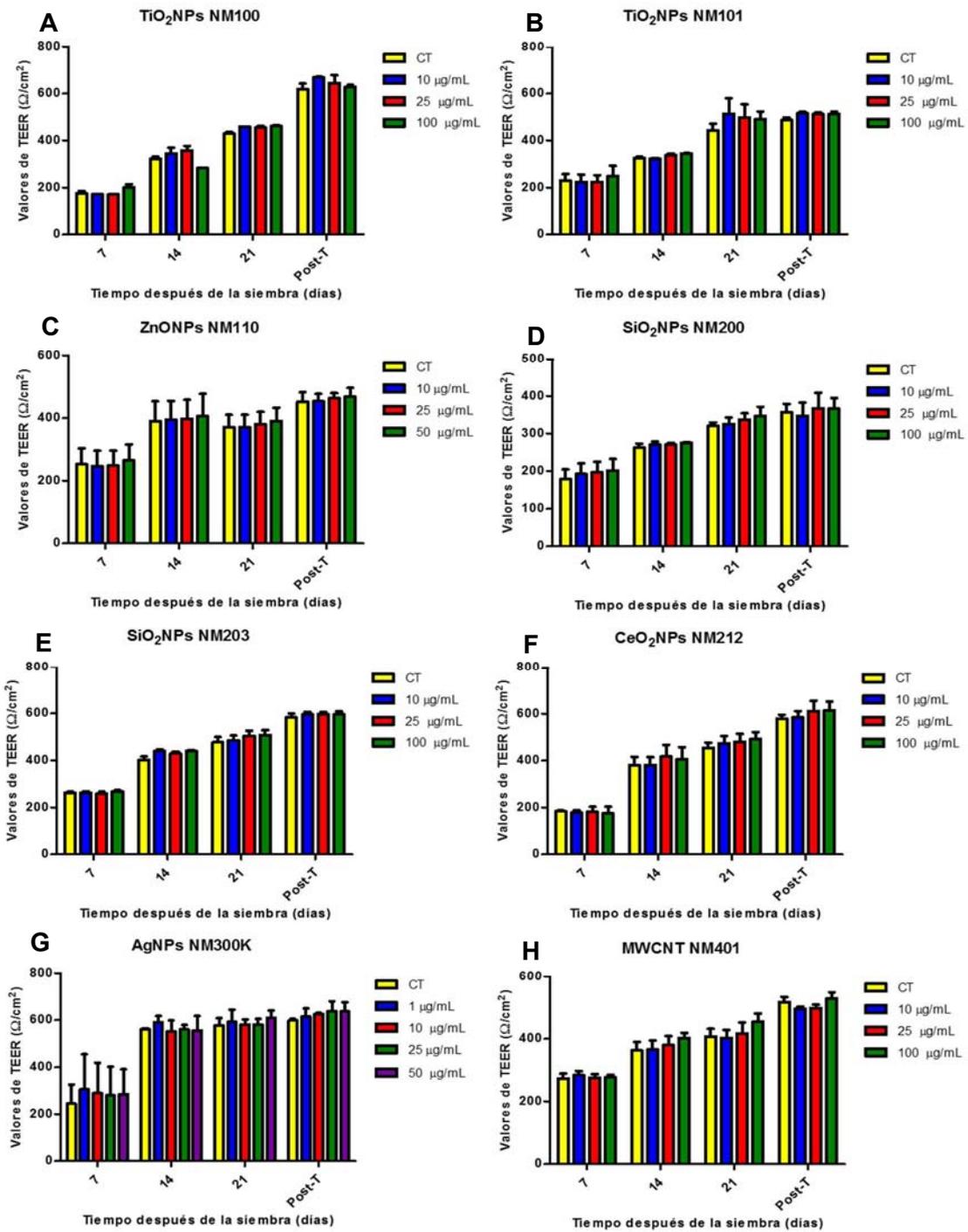


Figura 23. Valores de TEER durante la diferenciación y después del tratamiento con cada NM: TiO_2NPs NM100 (A), TiO_2NPs NM101 (B), ZnONPs NM110 (C), SiO_2NPs NM200 (D), SiO_2NPs NM203 (E), CeO_2NPs NM212 (F), AgNPs NM300K (G) y MWCNT NM401 (H). Se expresan los valores medios y el SEM.

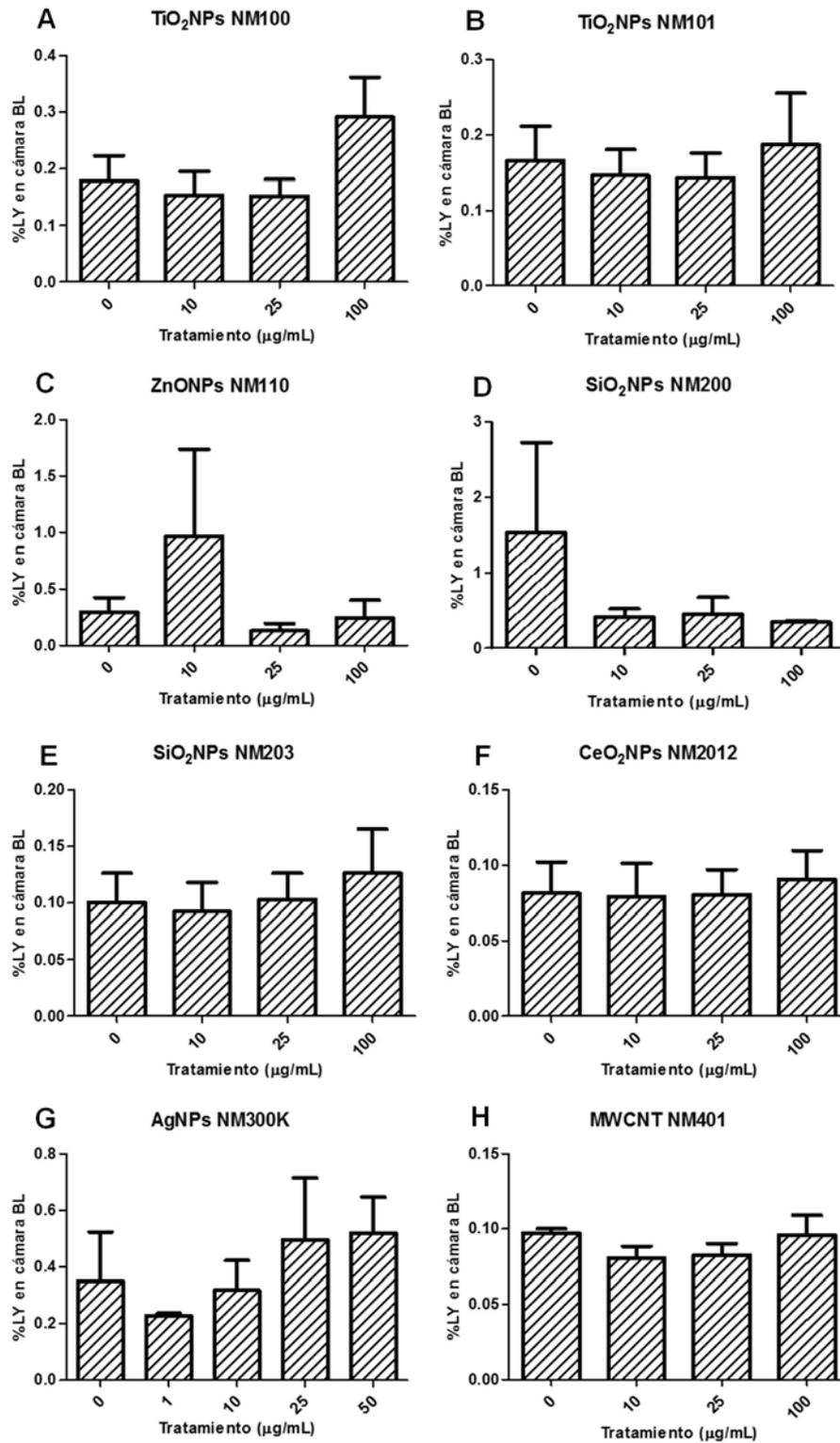


Figura 24. Porcentaje de LY en la cámara BL tras la exposición durante 24 horas a cada NM: TiO₂NPs NM100 (A), TiO₂NPs NM101 (B), ZnONPs NM110 (C), SiO₂NPs NM200 (D), SiO₂NPs NM203 (E), CeO₂NPs NM2012 (F), AgNPs NM300K (G), y MWCNT NM401 (H). Se expresan los valores medios y el SEM.

4.3.3. Internalización

a) TEM

El TEM nos permite observar estructuras celulares a muy alta resolución. Esto nos ha sido muy útil en el laboratorio a la hora de valorar cualitativamente la internalización de las NPs. Por otro lado, al valorar la monocapa de células Caco-2 diferenciadas nos dimos cuenta de que estas células diferenciadas son muy granuladas. Estas ultraestructuras celulares suponen un problema dado que no nos permiten distinguir de manera clara las NPs internalizadas, especialmente aquellas que tienen un tamaño muy pequeño (Figura 25). Muchas de las estructuras celulares se confunden con posibles NPs y hacen que una observación relativamente rápida y sobretodo fiable, se convierta en una observación muy lenta y lleve a dudas y confusión. De este modo se descartó la opción de análisis por TEM para la internalización de las NPs en las Caco-2 diferenciadas.

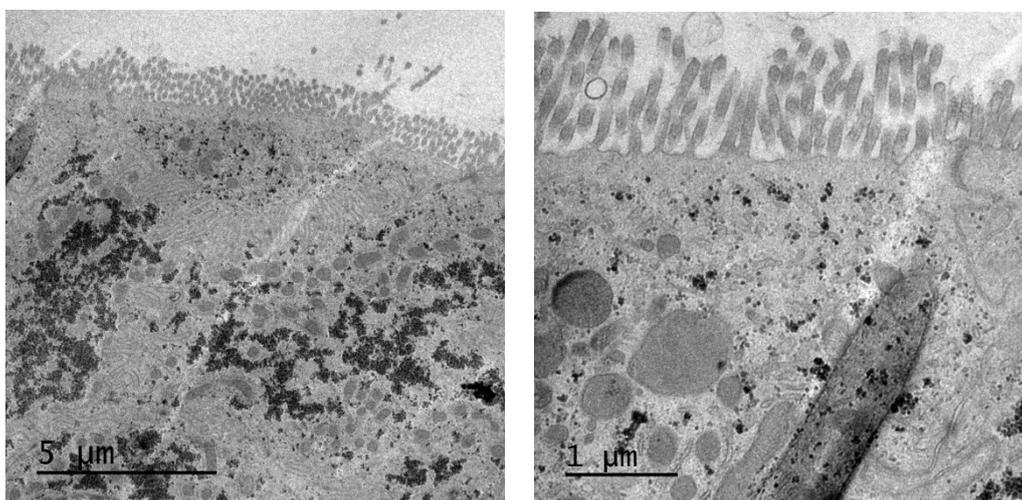


Figura 25. Corte de la monocapa de células Caco-2 diferenciadas donde se observa la estructura muy granulada de estas células sin tratamiento con NPs. Imágenes obtenidas por TEM.

b) Microscopía confocal

La microscopía confocal nos ofrece una alternativa para la observación cualitativa de la internalización de las NPs fluorescentes y de las NPs metálicas por reflexión. Ésta podría ser un buen complemento a la información obtenida por TEM, aunque no nos permite la distinción entre las NPs individualizadas y los agregados de NPs. Para evaluar la bondad de esta técnica como alternativa al TEM, y evaluar también la internalización de las NPs elegidas para el proyecto europeo NANoREG, se decidió trabajar con algunas de ellas tanto en células diferenciadas como en células sin diferenciar, es decir, en *transwell* en monocapa o crecidas en frascos de cultivo, a la concentración mayor analizada para facilitar la observación de las NPs.

Se eligió una NP para cada compuesto químico de entre las NPs metálicas: TiO₂NPs NM100, CeO₂NPs NM212 y AgNPs NM300K. Se descartó el uso de ZnONPs debido a su alta capacidad para disolverse en iones, ya que no se observaría la forma de NP en el interior tras las 24 horas de exposición. Se descartó también el uso de los MWCNT ya que no es viable su observación por microscopía confocal debido a su composición química. En cuanto a las NPs de sílica, el proyecto europeo nos facilitó una NP fluorescente de 50 nm de diámetro y carga negativa: SiO₂@IIT(-) que emite en el rojo cercano. Para estas NPs la membrana celular se observa en rojo lejano y el núcleo, en azul.

Para las NPs, tanto si reflejan la luz polarizada como si emiten en el rojo cercano, se les da color verde para la fácil distinción en las imágenes. Esta técnica, además, nos permite recubrir los núcleos y las NPs en un software con una máscara que nos permite localizar en el espacio tridimensional las estructuras. Así, nos permite diferenciar si las NPs están dentro de la célula, del núcleo o unidas a las membranas celulares o nucleares.

En la Figura 26 se observan las Caco-2 indiferenciadas (A, B) y las diferenciadas (C, D) expuestas a las TiO₂NPs NM100 a una concentración de 100 µg/mL. Las células indiferenciadas son células con un grosor mucho menor, que no están polarizadas y no expresan las microvellosidades en la parte apical, y que tampoco expresan las uniones estrechas entre células ni muchos transportadores de membrana. Las diferencias, como se han visto, entre las mismas células en un estado y en otro son significativas, por lo que la internalización dentro de éstas puede ser también diferente. Este es el caso de las TiO₂NPs. Las TiO₂NPs, en verde, son capaces de internalizar dentro de las células indiferenciadas Caco-2 (A, B) y además también se pueden encontrar unidas a la membrana nuclear y dentro del núcleo (B). Así, en estas condiciones, las NPs podrían interactuar directamente con el DNA. En cambio, la situación con las Caco-2 diferenciadas en *transwell* es muy diferente. Las TiO₂NPs se encuentran unidas a la membrana celular apical y no se encuentran internalizadas en las células ni tampoco en su núcleo (C, D). Podría ser que las TiO₂NPs no fueran capaces de internalizar en las células Caco-2 o, bien, que las células, a través de los distintos transportadores celulares, promovieran el transporte hacia la cámara basolateral o el retorno a la cámara apical.

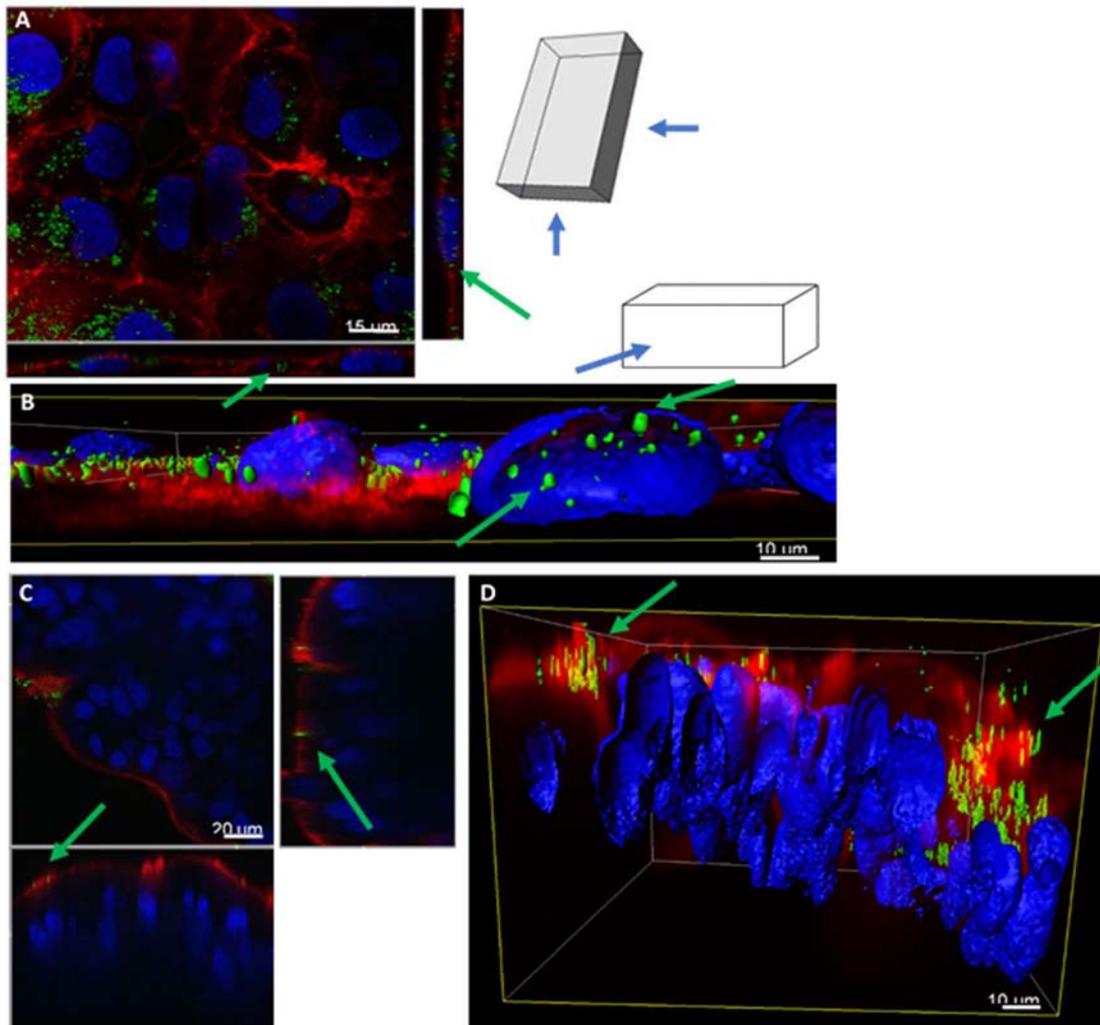


Figura 26. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. Internalización de las TiO_2NPs en células Caco-2 indiferenciadas (A, B) y diferenciadas (C, D). Se observan los núcleos marcados en azul, las membranas celulares en rojo y las NPs en verde. Las flechas verdes señalizan la localización de las NPs en las células.

Lo mismo ocurre con la exposición a las CeO_2NPs (Figura 27). Después de la exposición de las Caco-2 indiferenciadas (A, B) y diferenciadas (C, D) a $100 \mu\text{g/mL}$ de CeO_2NPs , se observó internalización celular y también nuclear en las células indiferenciadas (A, B). Sin embargo, no se observaron NPs dentro de las células diferenciadas (C, D), sólo en su membrana apical.

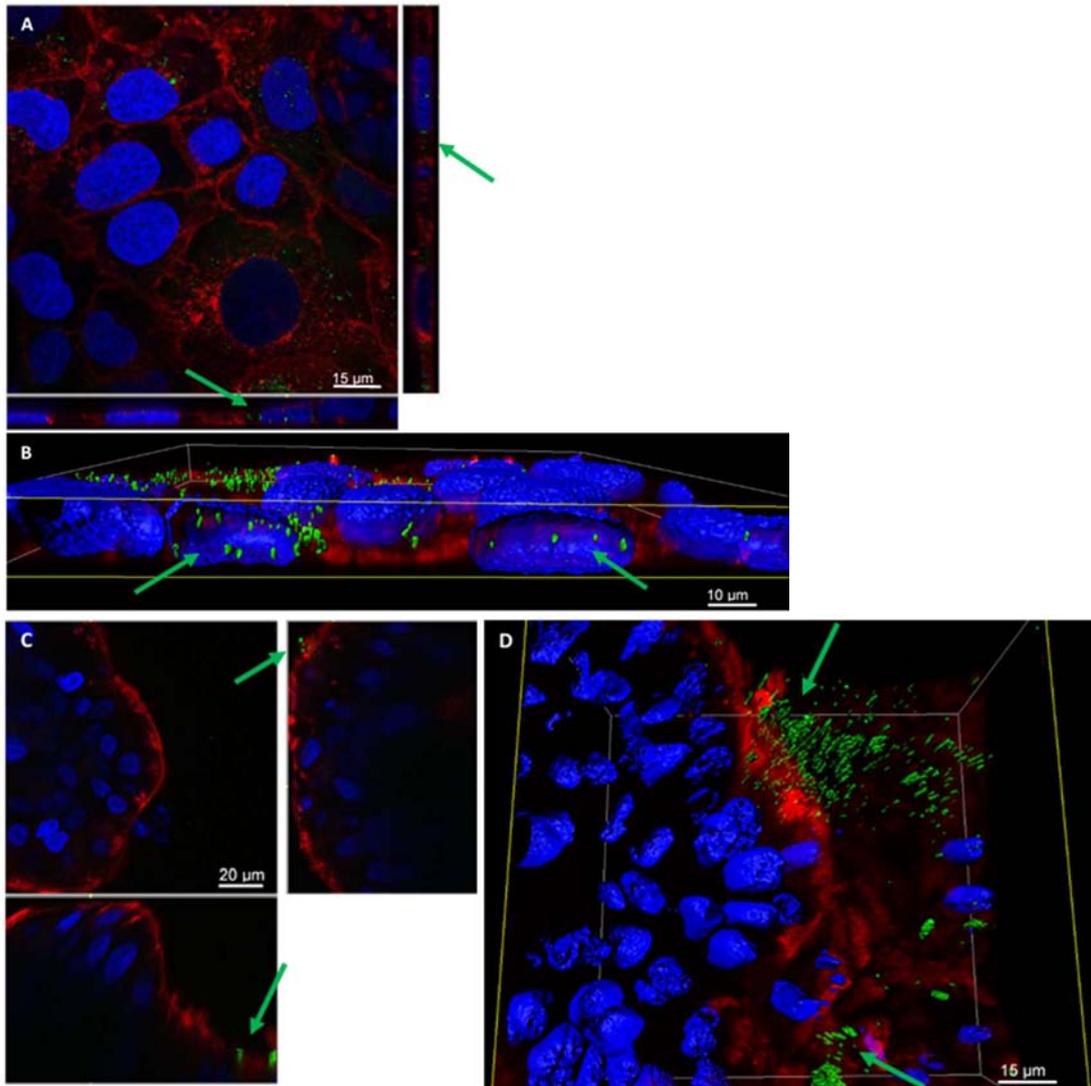


Figura 27. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. Internalización de las CeO_2 NPs en células Caco-2 indiferenciadas (A, B), y diferenciadas (C, D). Se observan los núcleos marcados en azul, las membranas celulares en rojo y las NPs en verde. Las flechas verdes señalizan la localización de las NPs en las células.

Las NPs de Ag, que son NPs mucho más pequeñas que las de TiO_2 o CeO_2 , sí que son capaces de internalizar dentro de la célula y del núcleo (Figura 28) tanto en células indiferenciadas (A, B) a una concentración de $25 \mu\text{g/mL}$ (debido a su alta toxicidad) como en diferenciadas (C, D, E) a una concentración de $50 \mu\text{g/mL}$.

Las AgNPs son NPs muy pequeñas (de menos de 15 nm) que podrían tener un transporte pasivo. Debido a su pequeño tamaño, serían capaces de internalizar en la célula por difusión pasiva y en el núcleo a través de los poros de la membrana nuclear. También se puede observar una internalización desigual en los núcleos de las diferentes células diferenciadas (E). Como consecuencia, no todos los núcleos contienen NPs ni

todos los núcleos que las contienen, tienen el mismo número de ellas. Esto hará que haya aún más variabilidad a nivel de expresión génica o de daño genotóxico.

Por último, hemos observado que las NPs fluorescentes de sílica SiO₂@IIT(-) son también capaces de internalizarse en las células tanto en su estado indiferenciado (A, B) como en el diferenciado (C, D; Figura 29). No obstante, sólo en el caso de las células indiferenciadas, se encuentran NPs de sílica en el núcleo. Así, en el caso de las células diferenciadas, aunque las SiO₂@IIT(-) se encuentran unidas a la membrana nuclear, no se observan NPs en su interior (D).

4.3.4. Translocación de las NPs

a) TEM/ TEM-EDX

El medio basolateral fue analizado mediante TEM y TEM-EDX tras la exposición durante 24 horas de las Caco-2 diferenciadas para todos los NMs en su concentración más alta. La observación por TEM mostró una gran cantidad de materia orgánica y sales minerales que enmascaran las NPs e impiden su observación. Además, si las NPs son capaces de atravesar la monocapa de células diferenciadas, lo harán a una concentración muy baja, con lo que quedarán tan diluidas en el medio basolateral que será muy difícil visualizarlas.

Intentando mejorar estos dos problemas, se trataron las células con proteinasa K y se concentraron las muestras con evaporación como se detalla en el apartado 3.5.4.a). Como se observa en la Figura 30, este tratamiento con proteinasa K y la siguiente evaporación no mejoró las muestras para la observación por TEM (A). Aun así, los medios basolaterales fueron analizados con EDX con la finalidad de poder distinguir la composición química de los agregados que se observaban por TEM, por si alguno correspondía a agregados de NPs.

A pesar de analizar todas las muestras con EDX (Figura 31), tan sólo se encontró titanio en la muestra NM100 (A, B). En el caso del silicio, se encontró el elemento en la muestra NM203 (I, J) pero también se encontró este elemento en algunas otras muestras como las del ZnONPs (F), CeO₂NPs (L) y AgNPs (N). Hay que señalar que el silicio es muy ubicuo así que no se puede afirmar que este pico de Si encontrado por EDX en la muestra NM203 corresponda a NPs o a problemas de contaminación del medio de cultivo. Así que, sólo se puede afirmar la presencia de NPs de titanio en el caso del NM100 en la cámara basolateral. Estos resultados nos indican que esta técnica debe mejorarse para poder detectar NPs en el medio basolateral.

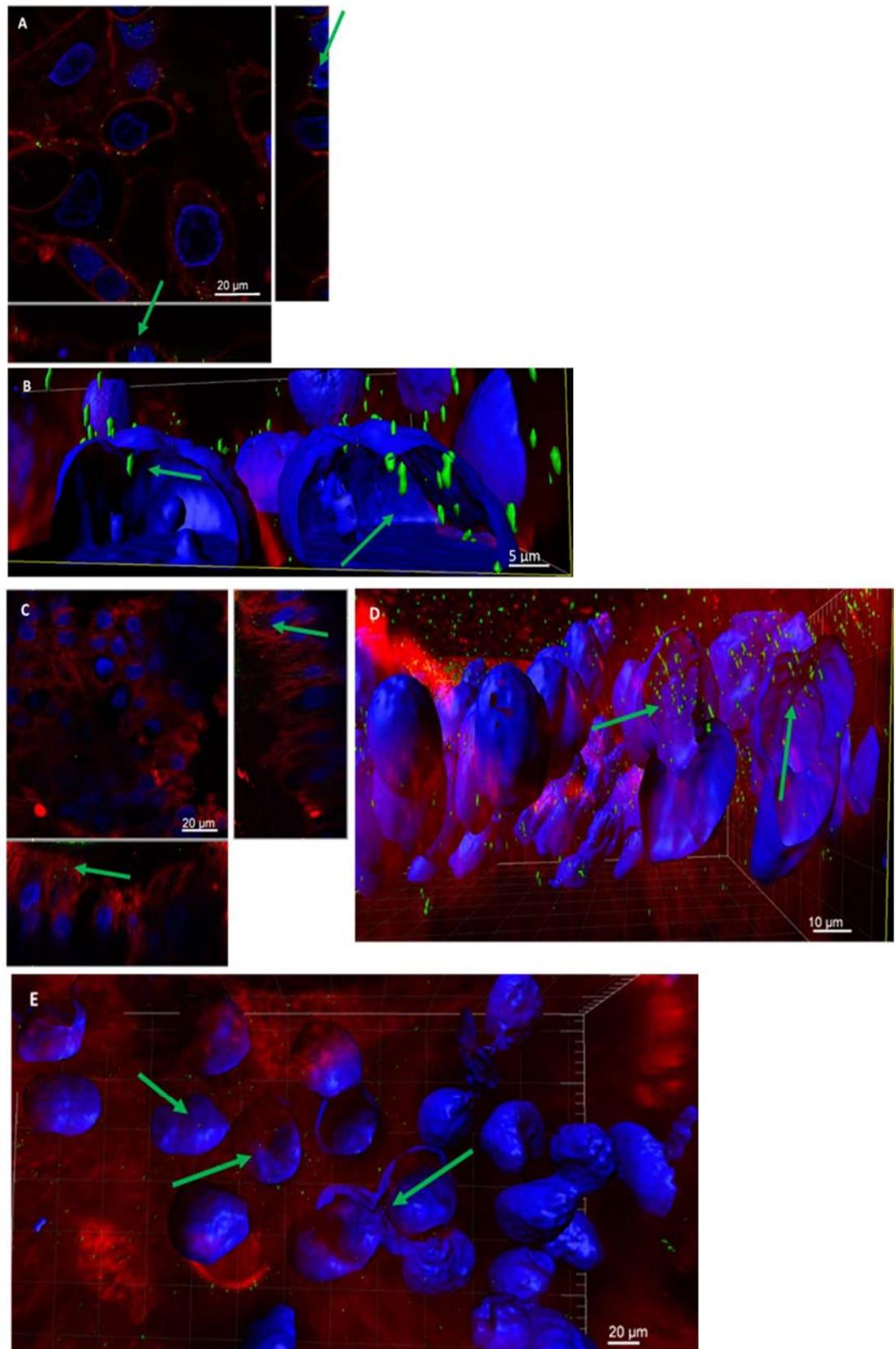


Figura 28. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. Internalización de las AgNPs en células Caco-2 indiferenciadas (A, B) y diferenciadas (C, D, E). Se observan los núcleos marcados en azul, las membranas celulares en rojo y las NPs en verde. Las flechas verdes señalizan la localización de las NPs en las células.

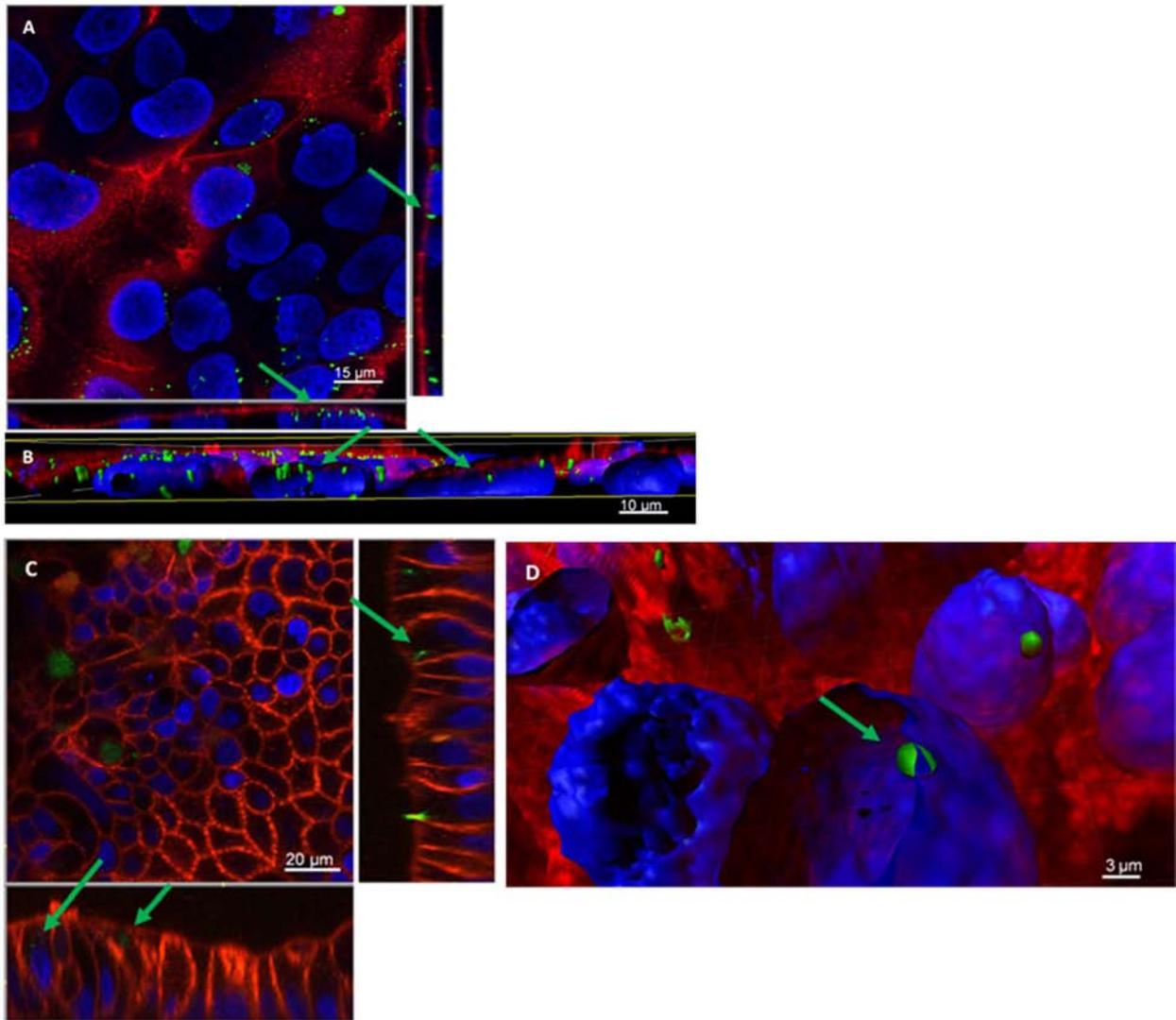


Figura 29. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. Internalización de las $\text{SiO}_2\text{@IIT(-)}$ en células Caco-2 indiferenciadas (A, B) y diferenciadas (C, D). Se observan los núcleos marcados en azul, las membranas celulares en rojo y las NPs en verde. Las flechas verdes señalizan la localización de las NPs en las células.

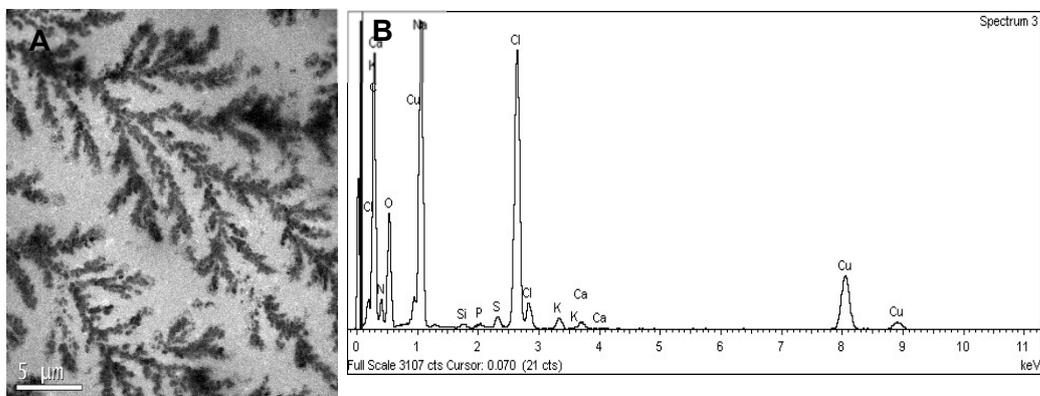
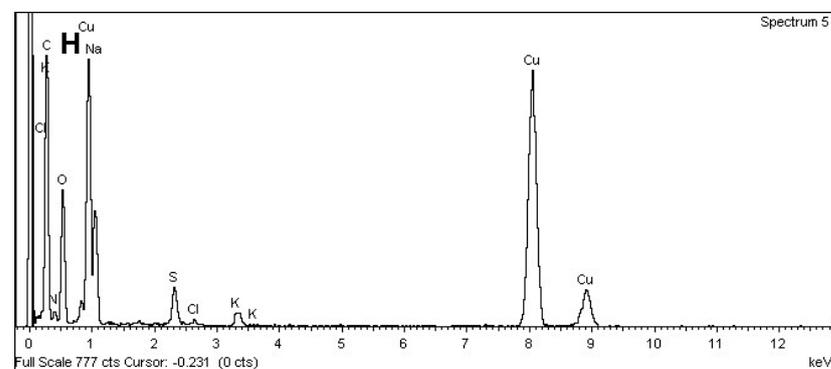
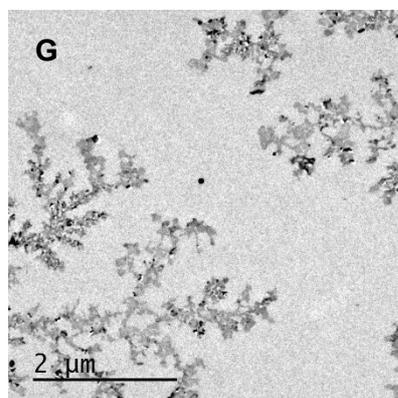
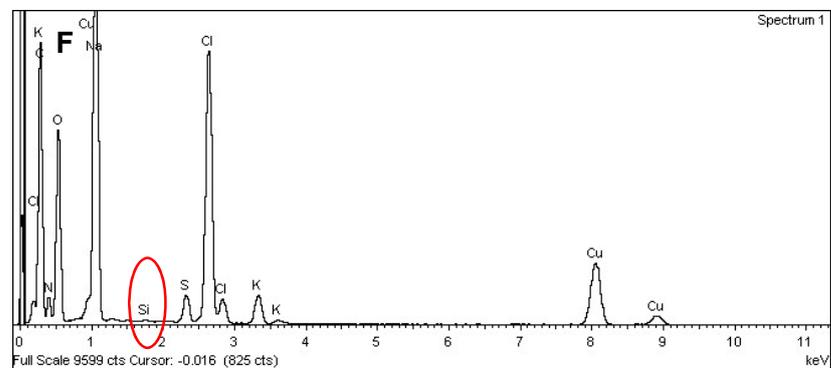
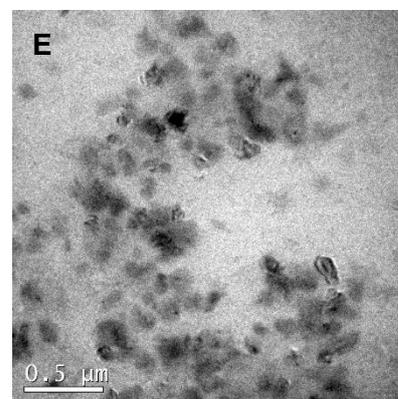
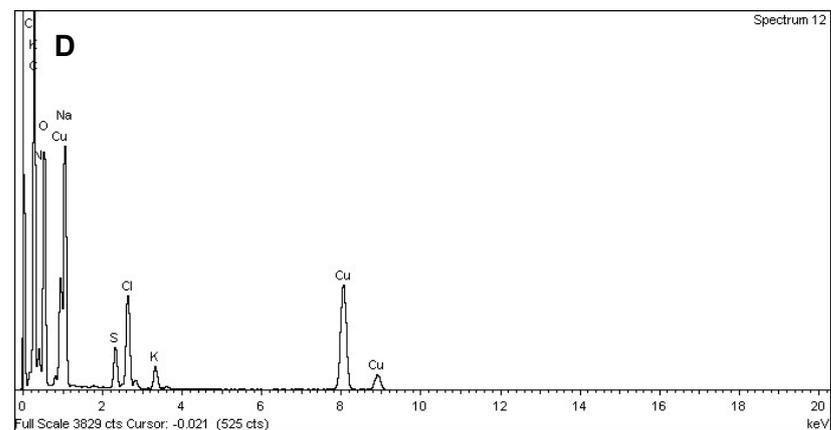
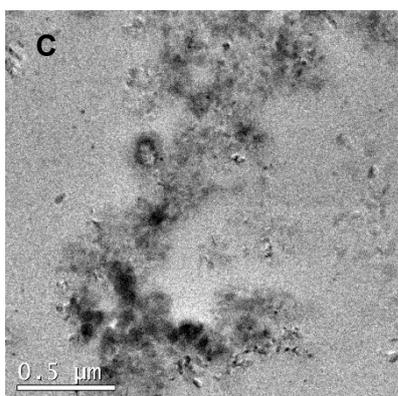
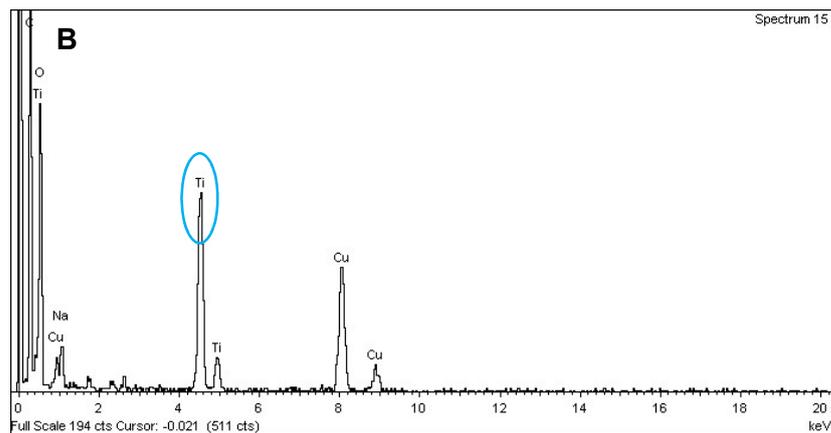
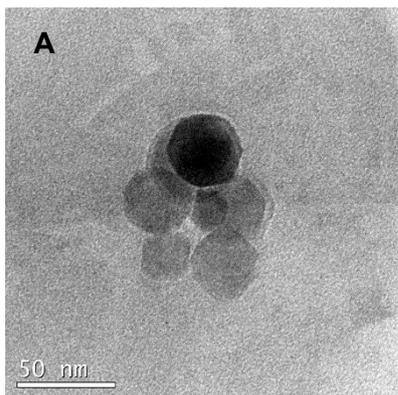


Figura 30. Imagen con TEM (A) y análisis por EDX (B) del medio basolateral en células sin tratar (CT).



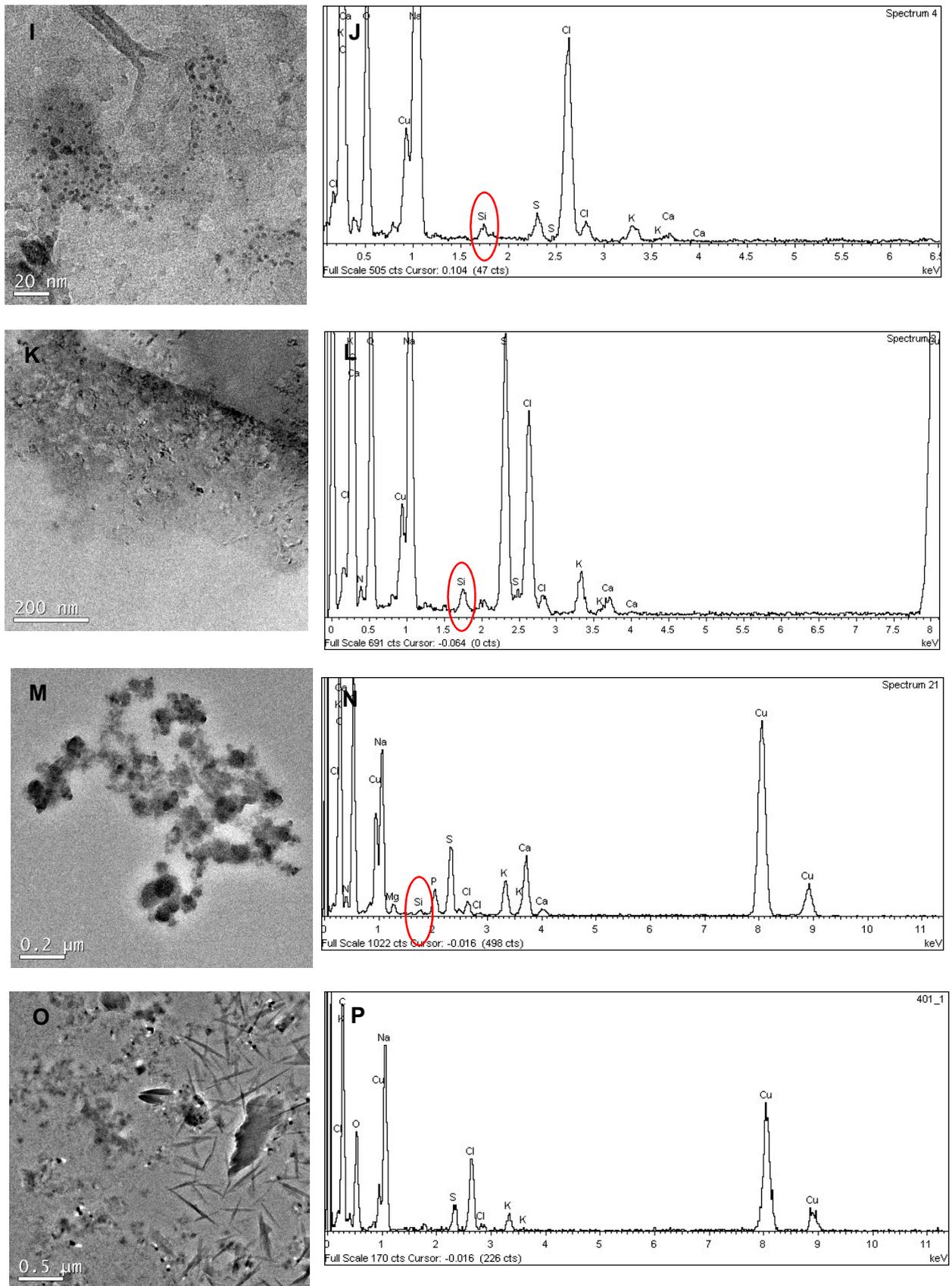


Figura 31. Imágenes con TEM (A,C,E,G,I,K,M,O) y análisis por EDX (B,D,F,H,J,L,N,P) del medio basolateral en células tratadas con TiO_2NPs NM100 (A,B), TiO_2NPs NM101 (C,D), ZnONPs NM110 (E,F), SiO_2NPs NM200 (G,H), SiO_2NPs NM203 (I,J), CeO_2NPs NM212 (K,L), AgNPs NM300K (M,N), y MWCNT NM401 (O,P).

b) Confocal

Aprovechando la capacidad de las NPs metálicas de reflejar la luz polarizada, también se analizó el medio basolateral mediante microscopía confocal (Figura 32) para todas las NPs metálicas (TiO₂NPs NM100, TiO₂NPs NM101, ZnONPs NM110, CeO₂NPs NM212, AgNPs NM300K).

El medio basolateral de las células sin tratar también fue analizado (A). En él se observó algún atisbo de reflexión, por lo que las concentraciones muy bajas de NPs que hayan cruzado la monocapa de células podrían pasar desapercibidas al confundirse con los niveles basales de reflexión. Aun así, esta técnica nos da la ventaja de la observación microscópica evitando toda la materia orgánica y las sales minerales que quedan en el medio. Nuestros resultados muestran la translocación de NPs mediante microscopía confocal en el caso de las TiO₂NPs NM100 (B), TiO₂NPs NM101 (C), ZnONPs NM110 (D), y CeO₂NPs NM212 (E), ya que muestran un alto incremento de la fluorescencia respecto del control. Asimismo, aunque se observan algunos puntos verdes fluorescentes, correspondientes a las AgNPs NM300K (F), este incremento no llega a ser significativo, por lo que parece que la translocación de estas NPs no es relevante. Esta técnica, hasta que se mejore la observación por TEM del medio basolateral, puede servir como alternativa para hacer un análisis cualitativo de la translocación de las NPs metálicas.

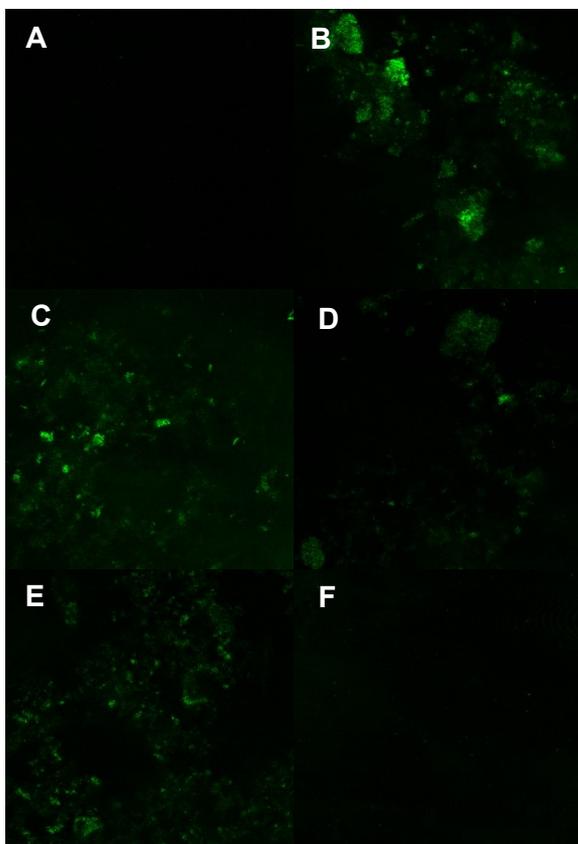


Figura 32. Imágenes observadas con microscopía confocal. Análisis del medio basolateral en células CT (A) y células tratadas con TiO₂NPs NM100 (B), TiO₂NPs NM101 (C), ZnONPs NM110 (D), CeO₂NPs NM212 (E) y AgNPs NM300K (F).

c) ICP-MS

La translocación de las NPs se analizó químicamente mediante ICP-MS, tanto del medio apical como del medio basolateral después de las 24 horas de incubación con TiO₂NPs, CeO₂NPs y AgNPs. Se eligió una NP de cada tipo metálico por la capacidad de análisis del espectrómetro de masas.

Las ZnONP se descartaron dada su elevada capacidad de disolución generando iones. Por otra parte, dado que la sílica es muy ubicua, supusimos que nos generaría problemas a la hora de diferenciar entre la presente en el ambiente y la resultante de nuestro experimento. Finalmente, los MWCNTs, por sus características, no se pueden detectar por espectrometría de masas.

Hay que señalar que la técnica del ICP-MS no permite distinguir entre la forma iónica y la NP, sólo detecta el elemento en cuestión. Nuestros resultados indican que para ninguna de las tres NPs elegidas se observaron incrementos significativos de dichos elementos en el medio basolateral (Figura 33). Hay que señalar que el límite de detección del espectrómetro de masas es de 0,01 µg, que es una cantidad mayor a la cantidad de los distintos elementos observados en nuestras muestras, lo que indica que la translocación de NPs o iones es tan pequeña que los valores observados no son estadísticamente significativos. Desde este punto de vista, los aparentes incrementos de TiO₂NPs y AgNPs serían ficticios dado que nos encontramos con valores que están por debajo del límite de detección.

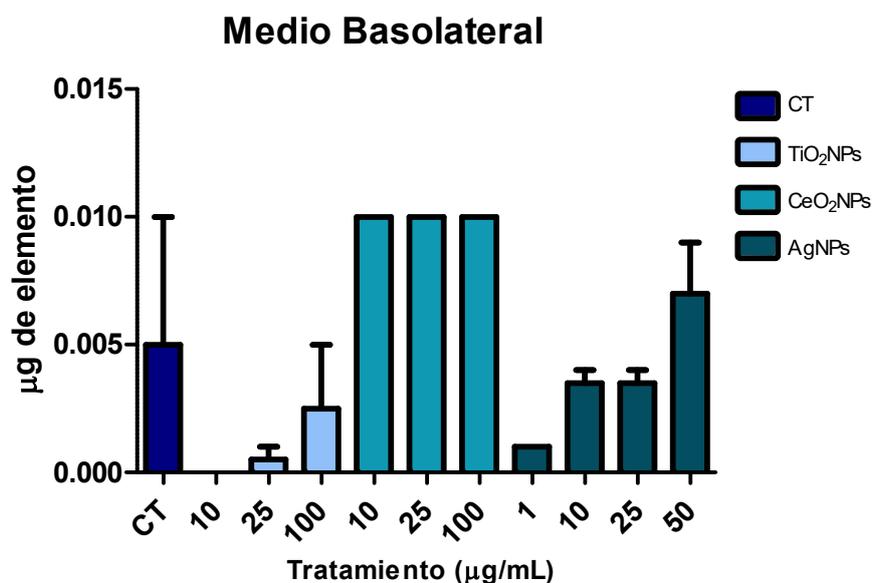


Figura 33. Análisis de la cantidad de elemento en la cámara basolateral mediante ICP-MS después de la exposición a TiO₂NPs, CeO₂NPs y AgNPs. Los valores se expresan mediante la media y su SEM.

Viendo que no fuimos capaces de detectar translocación relevante de NPs mediante ICP-MS, medimos la cantidad del elemento en el medio apical. Como era de esperar los μg absolutos de los distintos elementos en la cámara apical fueron elevados, observándose mayores valores cuanto mayor era la concentración inicialmente aplicada (Figura 34). Si en vez de analizar los valores absolutos, se analiza el % de elemento en el medio apical respecto a la concentración inicial, los resultados son distintos. En cuanto a TiO_2NPs , se observó un 15%, 9,2% y 12% de titanio en el medio apical después de las exposiciones a 10, 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Esto quiere decir que el resto de material internaliza o se queda sedimentado en la monocapa de células. Además, se observa que la capacidad de sedimentación o de internalización es constante respecto a la concentración inicial. En el caso de las CeO_2NPs , un 9,65%, 8,4% y 4,65% de cerio se observó en la cámara apical después de las exposiciones a 10, 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, con lo que cuanto más NPs hay en el medio, más se internalizan o sedimentan encima de la monocapa de Caco-2 y menos cantidad queda disuelta en el medio. Lo mismo ocurre con las AgNPs, encontrándose un 3,8%, 1,45%, 0,84% y 0,36% de plata después de la exposición a 1, 10, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNPs, respectivamente. Aunque la concentración inicial de AgNPs fue menor, también se observa una menor disposición de plata en el medio apical.

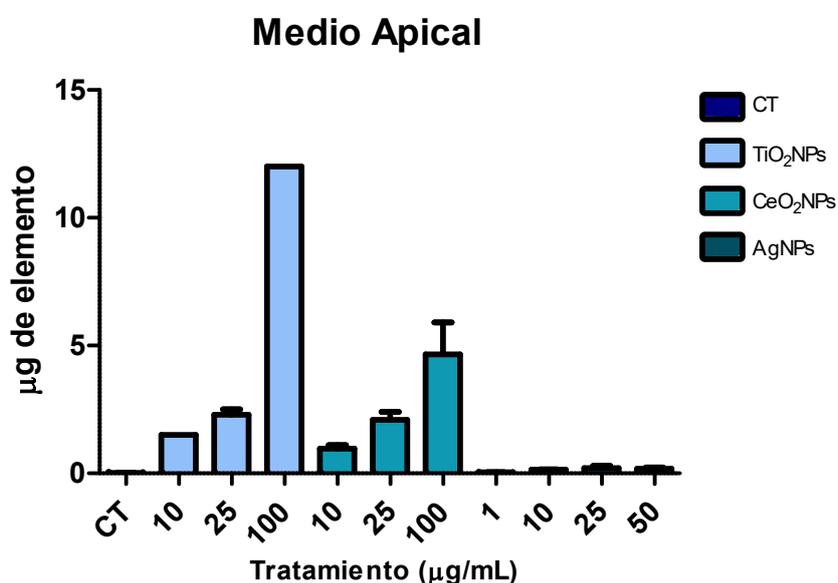


Figura 34. Análisis de la cantidad de elemento en la cámara apical mediante ICP-MS después de la exposición a TiO_2NPs , CeO_2NPs y AgNPs. Los valores se expresan como la media y su SEM.

4.3.5. Valoración del daño genotóxico/oxidativo: ensayo del cometa

El ensayo del cometa se llevó a cabo complementado con FPG por lo que, además de poder medir el daño genotóxico general, resultado de las roturas en el DNA, también podemos evaluar el daño oxidativo inducido en las bases del DNA. En este ensayo, hemos estudiado los efectos de TiO₂NPs NM100, CeO₂NPs NM212 y AgNPs NM300K a diferentes concentraciones después de los 21 días de diferenciación.

En cuanto al daño genotóxico inducido por las NPs seleccionadas, no se observó incremento en ningún tratamiento con ninguna de las NPs nombradas (Figura 35). En el caso del daño oxidativo, se encontró que las AgNPs producen un aumento dosis-dependiente de este tipo de daño tras la exposición a 24 horas (Figura 36). Las otras dos NPs no incrementan el daño oxidativo en el DNA tras la exposición. Esto podría estar relacionado con la capacidad de las AgNPs de internalizarse tanto en la célula como en el núcleo.

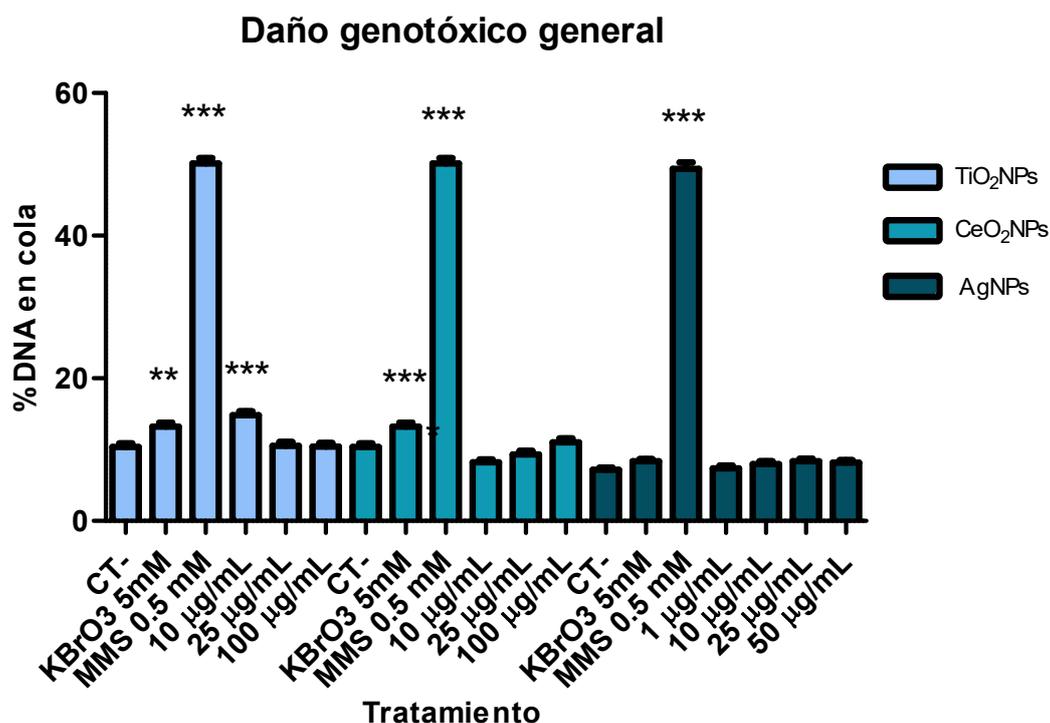


Figura 35. Análisis del daño genotóxico general mediante el ensayo del cometa. Se expresan los valores medios y el SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

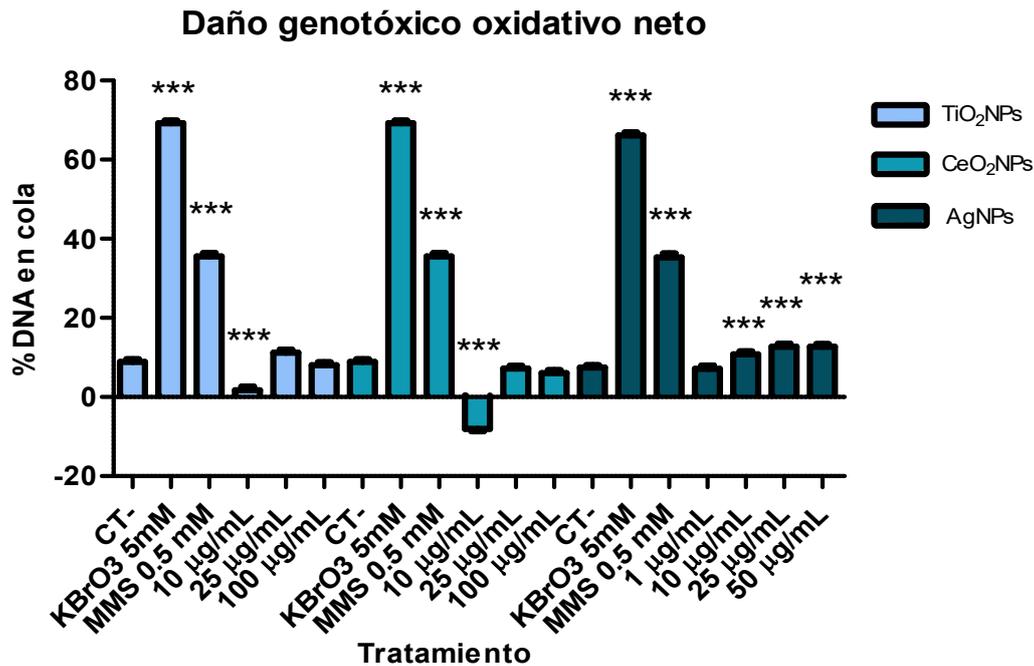


Figura 36. Análisis del daño oxidativo en el DNA mediante el ensayo del cometa. Se expresan los valores medios y el SEM. *** $P < 0,001$.

4.3.6. Valoración de la monocapa a través de la expresión génica.

La valoración de cambios en la expresión génica en la monocapa de células Caco-2 solamente se realizó en las células expuestas a AgNPs, dado que estas NPs mostraron ser capaces de internalizarse en las células y en los núcleos.

Por lo que hace referencia a los genes seleccionados, *SI* y *SCL15A1*, regulan la expresión de transportadores que se expresan en el borde en cepillo de las células diferenciadas. Los resultados obtenidos indican una tendencia general a aumentar su expresión, aunque ésta no llega a ser significativa (Figura 37 A y B). En cuanto a los genes de unión celular *CLAUDIN2* y *OCCLUDIN*, los resultados de expresión indican también incrementos, aunque éstos no llegan a ser significativos. Es interesante resaltar que los niveles de expresión son dosis-dependiente hasta la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, observándose, a partir de entonces, una disminución hasta alcanzar niveles similares a los de la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 37 C y D). La falta de significación estadística puede ser debida a la amplia heterogeneidad y variabilidad en cuanto a la internalización de las NPs en las células y en los núcleos. Esto explicaría la alta variabilidad observada en los cambios de expresión génica.

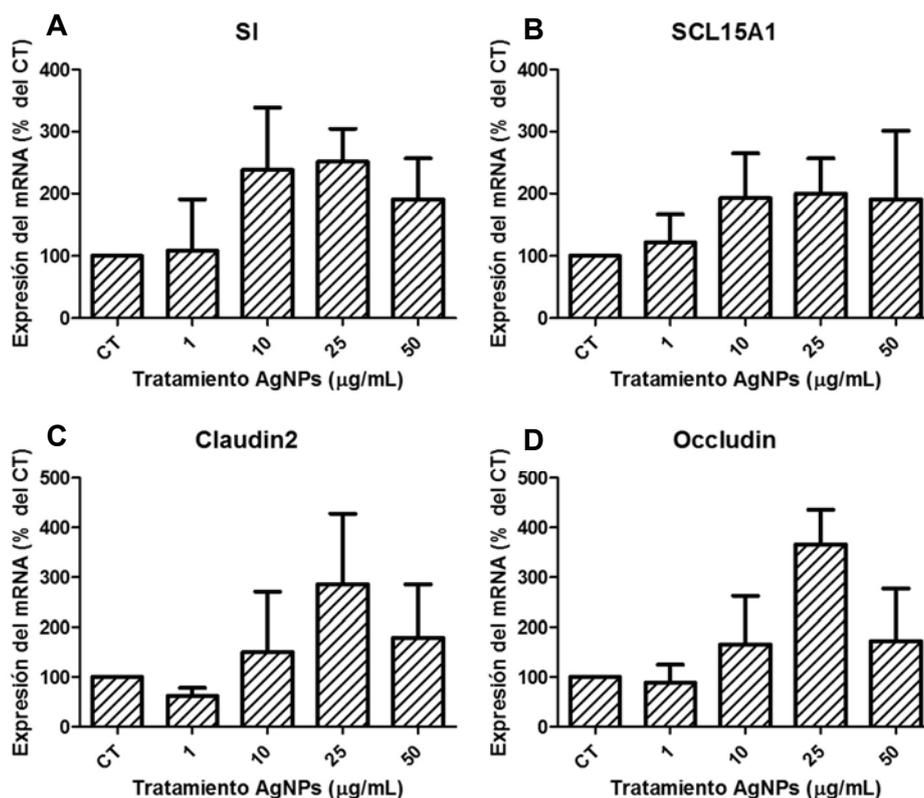


Figura 37. Análisis de la expresión de mRNA de los genes transportadores de membrana *SI* (A) y *SCL15A1* (B), así como de los genes de uniones celulares *CLAUDIN2* (C) y *OCCLUDIN* (D). Se indican los valores medios y su SEM.

4.4. Estudios de larga duración

En los estudios de exposiciones prolongadas a lo largo del tiempo, las células Caco-2 en su estado indiferenciado fueron expuestas a concentraciones subtóxicas (0,5 y 1 µg/mL) de AgNPs.

4.4.1. Proliferación celular

La evaluación de la tasa de división celular tras el tratamiento con AgNPs durante 24 horas, 3 y 6 semanas nos permitió observar las variaciones de este parámetro a lo largo del tiempo. Así, mientras el control mantuvo su tasa de división celular durante el periodo evaluado, las células tratadas con AgNPs modificaron sus tasas de división celular a lo largo del tiempo. A las 24 horas de tratamiento no se llegan a observar diferencias significativas entre el control y los tratamientos, aunque ya se observa una tendencia a aumentar el tiempo de división, es decir, que a las células les cuesta más dividirse (Figura 38). A las 3 semanas, ambas exposiciones inducen un tiempo de división significativamente más alto respecto el control, como consecuencia de su exposición a las AgNPs; sin embargo, tratamientos más prolongados producen un

fenómeno de adaptación, y a las 6 semanas estas células no muestran diferencias significativas entre los tratamientos y el control, sino más bien una tendencia a dividirse más rápido (Figura 38).

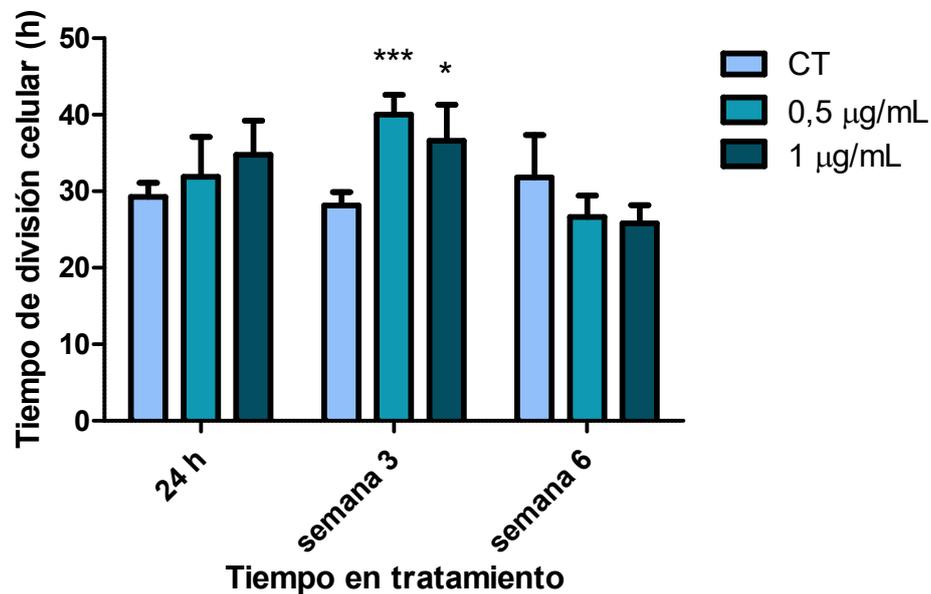


Figura 38. Análisis de la tasa de división de las células Caco-2 en su estado indiferenciado tras la exposición a las AgNPs durante los estudios de larga duración. Se indican los valores medios y su SEM. Se comparan los resultados con el control de cada tiempo de tratamiento. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Si se analizan los distintos tratamientos a lo largo del tiempo de exposición se observa como el control se mantiene constante en el tiempo, mientras que las células tratadas sufren modificaciones en su tasa de división, que en algunos casos llegan a ser significativos (Figura 39). Así, en el caso del tratamiento con 0,5 µg/mL se observa un incremento del tiempo de división en la semana 3, que resulta ser significativo, seguido de una disminución a la semana 6 de tratamiento. En el tratamiento con 1 µg/mL se observa un ligero incremento del tiempo de división, comparado con el tiempo a las 24 horas, que no llega a ser significativo, seguido de una disminución significativa en la semana 6.

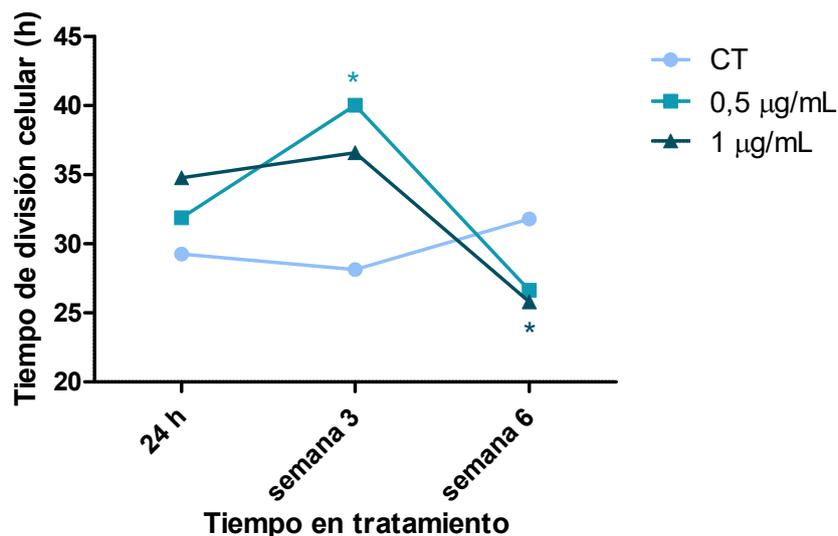


Figura 39. Análisis de la división celular de las células Caco-2 en su estado indiferenciado a lo largo del tiempo de exposición prolongada a las AgNPs. Se indican los valores medios y su SEM. Se comparan los resultados de cada tratamiento con sus valores a las 24 horas. * $P < 0,05$.

4.4.2. Ensayo del *soft-agar*

a) *Directo*

La línea celular Caco-2 es una línea tumoral que tiene la capacidad de crecer en agar blando o *soft-agar*; es por esto que los resultados de los distintos tratamientos siempre se comparan con las colonias crecidas en el tratamiento control. En nuestros experimentos hemos evaluado la capacidad de incrementar o disminuir el número de colonias que crecen en el *soft-agar* tras el tratamiento a lo largo de las semanas de exposición. En la Figura 40 A y B se observa que el número de colonias observado se mantiene similar a lo observado en el control a lo largo de las cuatro primeras semanas. Al llegar a la semana 6, se produce un aumento muy significativo del número de colonias en ambas concentraciones de AgNPs, aunque este efecto se hace más evidente en la concentración más alta.

b) *Indirecto*

El fenotipo tumoral de una línea celular se asocia en muchos casos con la aparición de un secretoma capaz de promover el fenotipo tumoral en células adyacentes. Por lo tanto, analizar la capacidad del secretoma de nuestras células expuestas de promover el crecimiento tumoral en otra línea celular es interesante en términos de evaluación de la capacidad carcinogénica de las AgNPs. La modificación del *soft-agar* tradicional nos permite hacer esta evaluación, para lo cual será necesario coleccionar el secretoma a evaluar, que en este caso consiste en el medio de cultivo condicionado obtenido de las

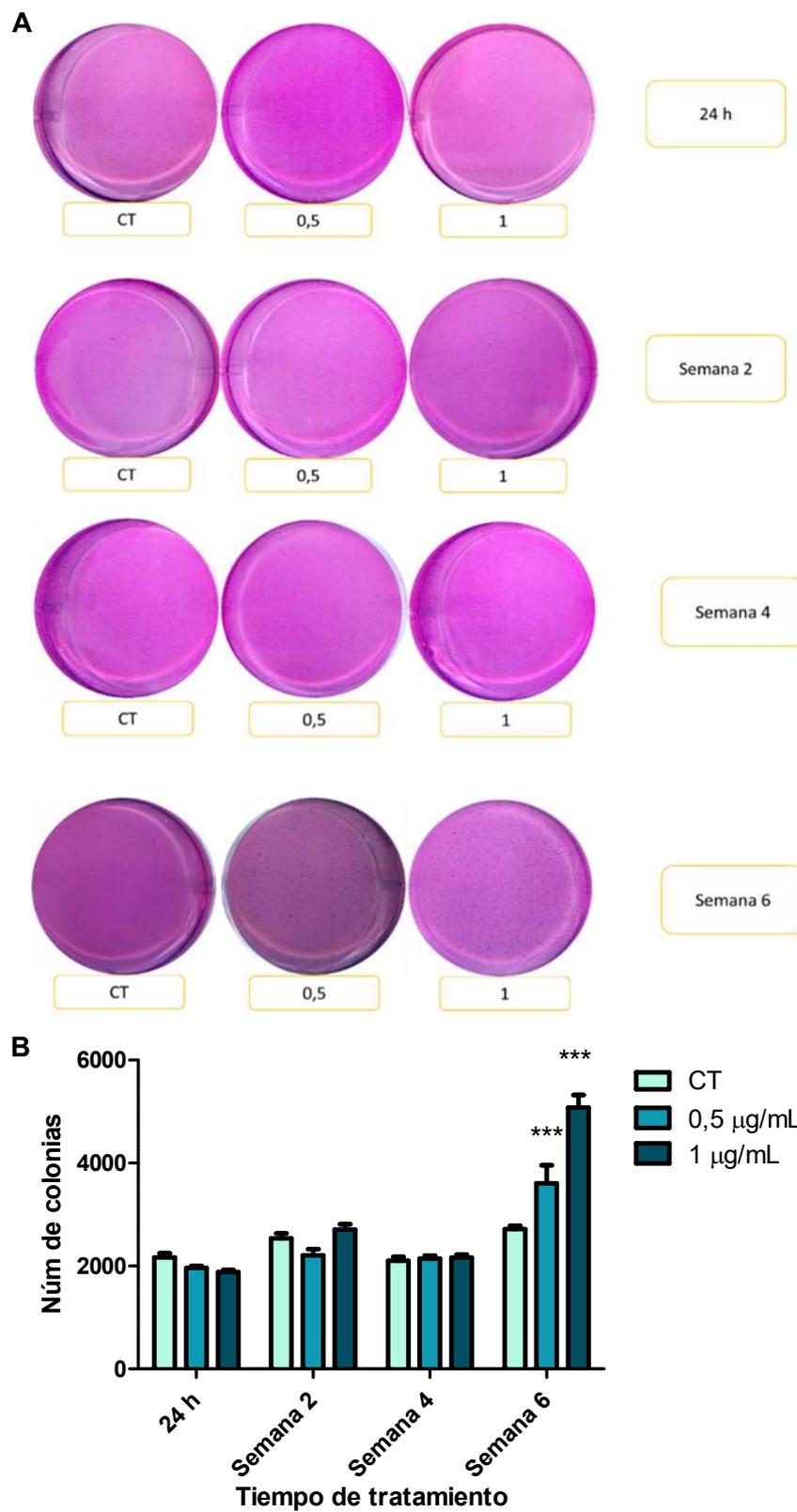


Figura 40. *Soft-agar* directo. Observación de las colonias en el agar blando (A) y contaje de las colonias (B) tras la exposición a AgNP. Se indican los valores medios y su SEM. Se comparan los resultados con el control para cada tiempo de tratamiento. *** $P < 0,001$.

Caco-2 expuestas a AgNPs. La línea celular que hemos utilizado para este ensayo es la HCT116, que tiene una conocida capacidad de crecer en agar semi-sólido, y cuyos cambios en esta capacidad inducidos por el medio condicionado son en general fácilmente evaluables. En nuestro caso, hemos analizado tanto el número total de colonias (Figura 41 B) como el número de colonias mayores a 255 μm (Figura 41 C). Los resultados indican la presencia de un número significativamente menor tanto de colonias grandes como de colonias totales tras tratar la línea HCT116 con el medio condicionado proveniente de cultivos de Caco-2 expuestos a 1 $\mu\text{g/mL}$ de AgNP durante 24 horas, respecto al control. La situación tras la exposición prolongada, sin embargo, es bien distinta. Así, aunque en las muestras tomadas a las 4 semanas de exposición no se observan diferencias significativas entre los tratamientos y el control, en las muestras de la semana 6 ya se observa un incremento significativo del número total de colonias, así como de colonias grandes, en la concentración más alta de AgNPs (Figura 41).

4.4.3. Zimograma

Con este estudio se ha valorado si la exposición a AgNPs es capaz de incrementar la secreción de MMP2+9 en el secretoma de las células Caco-2, estando estas proteínas relacionadas con el fenotipo tumoral, la invasión y la metástasis. La línea tumoral Caco-2 es capaz de secretar MMPs, pero lo hace en una concentración muy baja, por lo que, para una buena visualización de las MMPs fue necesario concentrar las muestras. Una vez corridas las muestras en el gel de gelatina y analizadas las bandas, se observó un incremento de las MMPs en ambas concentraciones de AgNPs tras las 6 semanas de exposición respecto del control, hecho que no se observa tras la exposición a 24 horas (Figura 42). Sin embargo, este incremento no llega a ser significativo, probablemente debido a las diferencias entre la réplica A y B del tratamiento. A pesar de eso, la tendencia a aumentar la secreción de MMPs en las Caco-2 expuestas respalda los resultados obtenidos con el *soft-agar* indirecto, ya que indicaría un secretoma con más riqueza de factores capaces de promover el fenotipo tumoral.

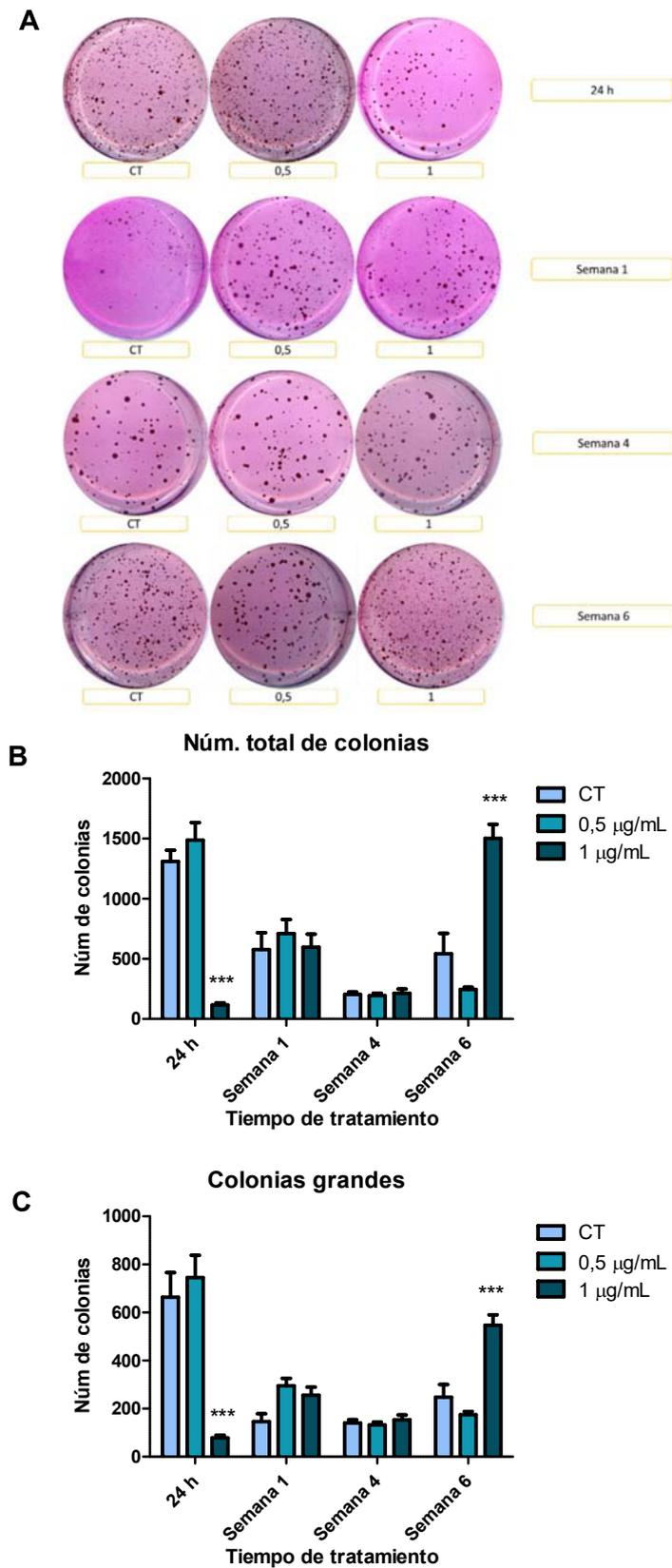


Figura 41. *Soft-agar* indirecto. Observación de las colonias en el agar blando (A) y conteo de las colonias totales (B) y grandes (C) de la línea HCT116 expuesta a medio condicionado de Caco-2 tras la exposición a AgNP. Se indican los valores medios y su SEM. Se comparan los resultados con el control para cada tiempo de tratamiento. *** $P < 0.0001$.

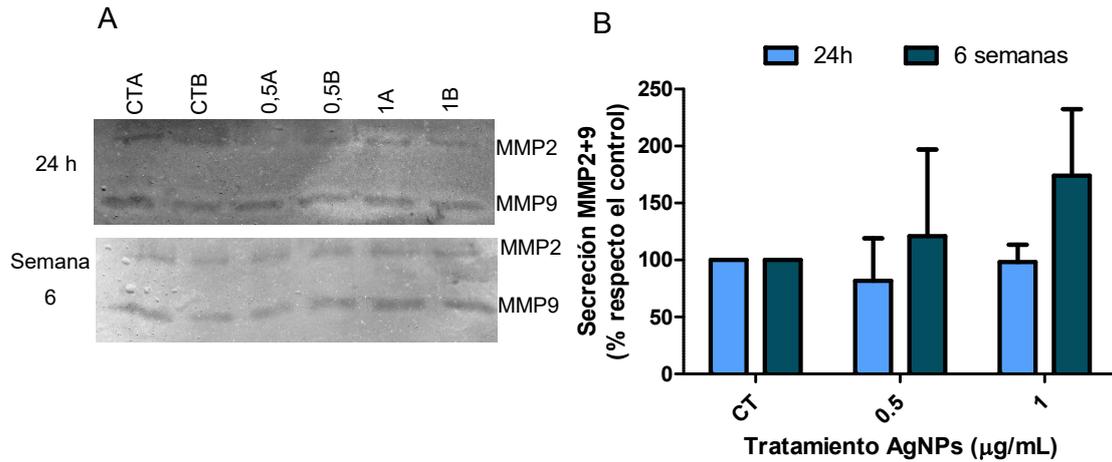


Figura 42. Gel de zimograma (A) y análisis de la secreción de las MMP2+9 tras la exposición a AgNPs (B). Se indican los valores en % respecto el control.

4.4.4. Migración

Las células Caco-2 tienen muy poca capacidad de migración. A las 24 horas y a las 2 semanas de exposición a AgNPs, las células tratadas no adquieren mayor capacidad de migración que las controles (Figura 43). En esos puntos temporales, tan sólo las células HCT116, utilizadas como control positivo, fueron capaces de migrar significativamente. En cambio, después de 6 semanas de tratamiento, las células Caco-2 aumentaron significativamente su capacidad de migración en las dos concentraciones de AgNPs evaluadas, llegando a los valores del control positivo.

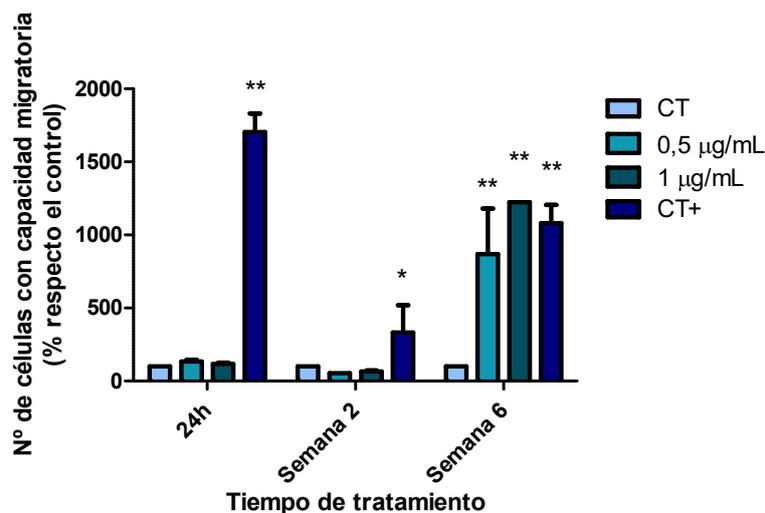


Figura 43. Contaje de las células con capacidad migratoria después del tratamiento con AgNP a lo largo de 6 semanas. Se indican los valores medios y su SEM. Se comparan los resultados con el control para cada tiempo de tratamiento. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

4.4.5. Cambios en la expresión génica

En el análisis de los cambios experimentados en los niveles de expresión génica de determinados genes se observa mucha variabilidad. Esto parece ser debido tanto al tratamiento con AgNPs como a la heterogeneidad intrínseca de la línea celular Caco-2. Así, en cuanto a los genes de EMT *SLUG* y *SNAIL1*, no se observaron diferencias significativas tras los tratamientos (Figura 44). En el caso de *SLUG*, se observó un incremento significativo en la semana 2 de tratamiento (a la concentración de 0,5 µg/mL) pero no se mantuvo en el tiempo, reestableciéndose los valores del control a las 6 semanas. Para *PTEN*, se observó un incremento significativo desde el inicio del tratamiento en la concentración más alta (de 1 µg/mL), mientras que para el gen *VEGFA* se observó mucha variabilidad pero ninguna diferencia significativa respecto al control. Esta variabilidad también se observó en *EPCAM*, observándose una disminución del mRNA en la concentración de 0,5 µg/mL a las 24 horas de tratamiento y en la concentración de 1 µg/mL a las 2 semanas de tratamiento, pero esta disminución no se mantiene en ninguno de los casos. En cuanto a los genes de uniones celulares, no se observaron cambios en *CDH1*, pero en *ZO-1* se observó una desregulación, viéndose incrementada la expresión en la concentración más alta durante todo el tiempo de exposición. Por lo que hace referencia a *VIM* y *ACTA2*, se observó desregulación en ambos casos, con incrementos de la expresión en la semana 2 de tratamiento que no se mantuvieron en el tiempo.

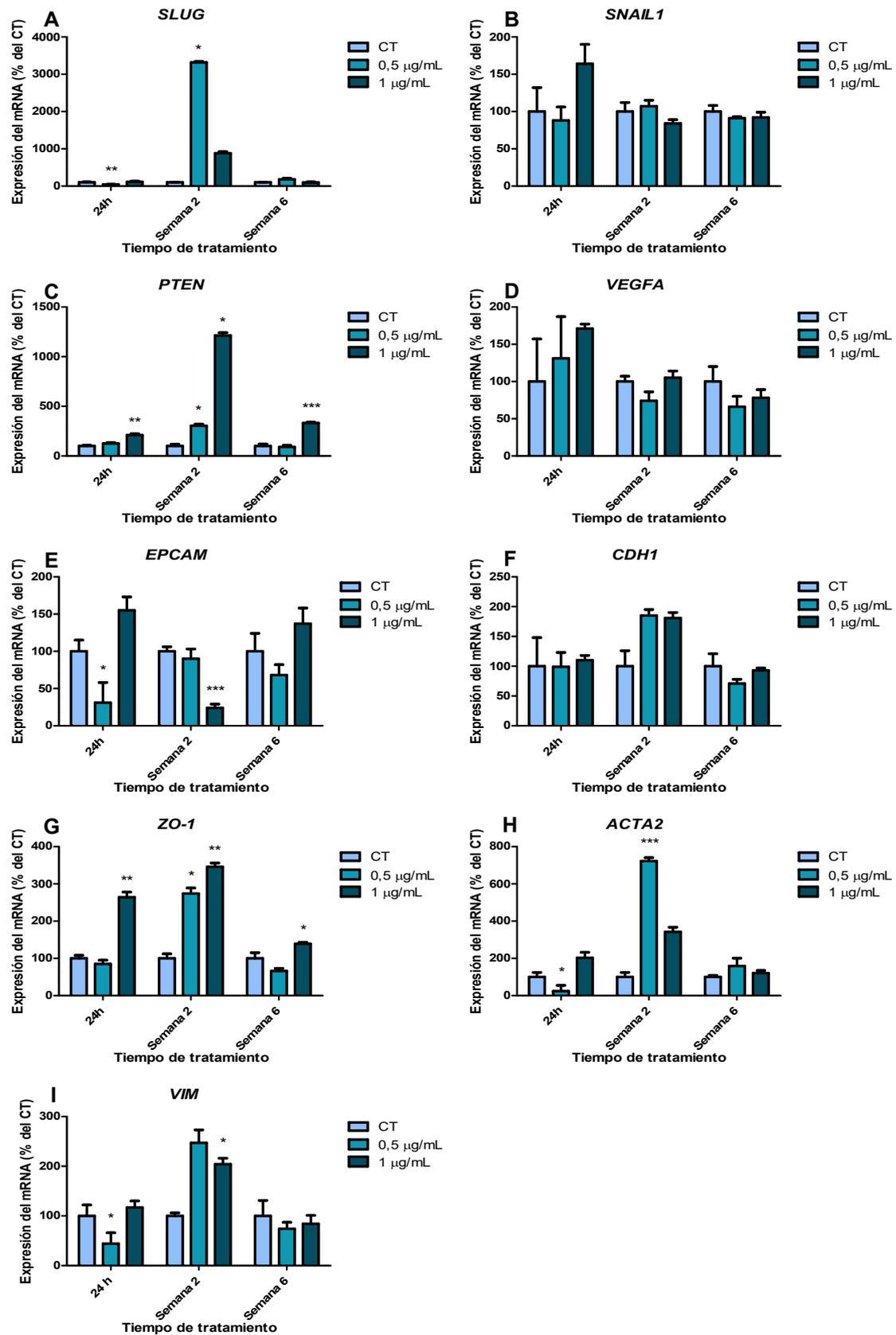


Figura 44. Análisis de la expresión del mRNA para los genes *SLUG* (A), *SNAIL1* (B), *PTEN* (C), *VEGFA* (D), *EPCAM* (E), *CDH1* (F), *ZO-1* (G), *VIM* (H) y *ACTA2* (I). Se indican los valores medios y su SEM. Se comparan los resultados con el control para cada tiempo de tratamiento. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

5. DISCUSIÓN

Ante todo hay que recordar que el objetivo principal de esta Tesis, como parte del proyecto europeo NANoREG, era el de poner a punto la línea celular Caco-2 como modelo *in vitro* de barrera intestinal para los estudios sobre los riesgos asociados con la exposición a los NMs. Esto ha supuesto establecer las condiciones que llevan a una correcta formación de la barrera Caco-2 y hacer que ésta sea reproducible, evaluar la posible afectación de los NMs en la integridad y permeabilidad de la monocapa, evaluar la internalización de los NMs en el sistema, y valorar el daño genotóxico y/o oxidativo producido por los NMs.

Estos estudios se han complementado con la valoración del estado de la monocapa a través de la expresión de diversos genes y, fundamentalmente, evaluando los efectos en la línea Caco-2 de la exposición subcrónica, a concentraciones subtóxicas de AgNPs, para determinar la existencia de transformación celular, mediante el uso de una amplia batería de ensayos.

5.1. Dispersión y caracterización de los NMs

Uno de los problemas del uso de los NMs en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* es establecer una buena dispersión de los mismos, ya que hay que asegurar que al menos una buena proporción de éstos se encuentren en su nivel nanométrico. En la actualidad no existe un protocolo estándar de dispersión de los materiales, igual que tampoco existe una forma biológicamente interesante de mantenerlos estables en dispersión. Por eso, desde el proyecto NANoREG, en su apartado puramente químico, se ha establecido un protocolo de dispersión y un protocolo de caracterización de los NMs, a utilizar por todos los grupos participantes. Antes de cualquier tratamiento de las células con los NMs es necesario caracterizarlos correctamente para asegurarnos que trabajamos con una buena dispersión, y que no se están añadiendo más variables al estudio. Nuestros resultados sobre la caracterización de los NMs se han comparado con los obtenidos por otros miembros de nuestra tarea (WP5) dentro del proyecto. Tanto los valores medios del tamaño de las NPs como su distribución del tamaño evaluados por TEM concuerdan con los resultados globales del proyecto, lo que indica tanto la bondad del protocolo como la manera en que lo hemos llevado a cabo. Del mismo modo, se compararon los resultados de DLS obtenidos, tanto en la solución stock como en las diferentes concentraciones en medio de cultivo. En este caso se observó mucha variabilidad entre grupos en el caso de los NMs TiO₂NPs NM101 y SiO₂NPs NM203. Hay que señalar que estos dos NMs son de tamaño pequeño y se encuentran muy

agregados, formando incluso escamas en las imágenes del TEM. Otro caso particular es el de los MWCNT NM401, en los que se observó una mala dispersión usando la misma técnica. Los agregados se observan ya a simple vista, y eso a la hora de pipetear y diluir puede ocasionar mucha variabilidad en las dispersiones. Es asumible que la técnica DLS no sea en este caso una buena técnica de análisis del tamaño en dispersión, ya que los nanotubos no se comportan como el resto de NPs más o menos esféricas. Estas dificultades aún no se han solucionado en el paquete de trabajo de análisis químico de los NMs (WP2); por lo que hasta el momento no hay ninguna propuesta de metodología alternativa. De todo esto tan sólo se puede asegurar que, con estos protocolos, todos los miembros del proyecto han trabajado bajo las mismas características de dispersión.

5.2. Citotoxicidad de los NMs

Las diferencias observadas en la toxicidad de las NPs dependen de múltiples factores incluyendo: el fabricante, la composición de las mismas, su forma y tamaño, su capacidad para formar agregados, el método de preparación, y el protocolo de dispersión (Cho et al., 2011; Cohen et al., 2013), así como las células usadas en el estudio o incluso sus clones, como sucede en el caso de la línea celular Caco-2 (Sambuy et al., 2005). Gracias a la estandarización del proyecto NANoREG, fijando muchos de estos factores hemos podido disminuir esta variabilidad. Ante todo hay que señalar que los estudios preliminares de toxicidad son sólo un método aproximado, ya que ningún método es 100% fiable, y es por esto que existen distintas metodologías para medir la toxicidad de un compuesto. Nosotros hemos usado la técnica del conteo de células con el *Cell Counter* y, con dicha técnica, sólo hemos detectado efectos tóxicos con AgNPs NM300K y ZnONPs NM110, con valores de IC_{50} de 12,23 $\mu\text{g/mL}$ y 49,83 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, en células Caco-2 no diferenciadas. Esto se corresponde con los valores de IC_{50} (de 16,24 $\mu\text{g/mL}$ y 45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) calculadas a partir del ensayo MTS por otros grupos participantes en el proyecto NANoREG (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Además, Song et al. (2014) también observaron toxicidad en esta misma línea celular con NPs compuestas por plata y zinc, aunque éstas difieren en tamaño y forma con respecto a las utilizadas por nosotros, demostrando que las NPs de esta composición son reactivas y tienden a producir citotoxicidad. Las demás NPs no mostraron toxicidad o una toxicidad muy leve. Combinando ambas metodologías los resultados para las distintas NPs indican que la toxicidad decrece en el siguiente orden: Ag NM300K > ZnO NM110 > CNT NM401 > SiO₂ fluorescentes cargadas negativamente de 50 nm [SiO₂@IIT (-)] > SiO₂ (NM200, NM203) = CeO₂ NM212 = TiO₂ (NM100, NM101).

Por otra parte, nuestros resultados indican que la toxicidad en las células diferenciadas es menor que en las células no diferenciadas. Esto nos lleva a pensar que el estado de diferenciación puede modular la sensibilidad de las células Caco-2 a los distintos agentes tóxicos, incluidas las NPs. Después de la diferenciación, las células Caco-2 adquieren varias características tales como la polaridad celular, la formación de microvellosidades, presencia de uniones estrechas, la expresión de enzimas digestivas en el borde en cepillo de la membrana, la secreción y ensamblaje de una matriz extracelular (Pinto et al., 1983), que podrían ser en parte responsables de la protección frente a los efectos citotóxicos de los NMs, observados en las células no diferenciadas. Además, la densidad celular y el grado de confluencia también pueden influir en la sensibilidad de las células a la toxicidad de los NMs, haciendo que las células más confluentes sean más resistentes a los efectos de los NMs (Heng et al., 2011; Gerloff et al., 2013). Hay que tener en cuenta que en estas condiciones de confluencia se aumenta muchísimo el número de células por cm^2 y, por lo tanto, la cantidad de NMs por célula también disminuye. En conjunto, estos datos subrayan la importancia del estado de diferenciación para evaluar el efecto tóxico de los NMs. De esta manera el uso de células no diferenciadas en la estima de la toxicidad podría dar lugar a una sobreestimación de la toxicidad de los NMs al aplicarse a células diferenciadas.

Los ensayos de viabilidad celular/toxicidad son también una herramienta básica que nos permiten elegir las concentraciones subtóxicas con las que se va a trabajar en los estudios de larga duración. Según lo comentado anteriormente, si nuestro interés es trabajar con concentraciones subtóxicas, analizando la toxicidad en células indiferenciadas nos aseguraríamos esta subtoxicidad en las células diferenciadas.

5.3. Estudios de transporte

El epitelio de la barrera intestinal está formado por una monocapa celular principalmente compuesta de enterocitos mezclados con células caliciformes secretoras de mucus que actúan como una barrera eficaz, evitando la translocación de compuestos potencialmente nocivos tales como microorganismos, antígenos o partículas (Pelaseyed et al., 2014).

En algunos casos los NMs pueden alcanzar el tracto gastrointestinal después de la depuración mucociliar de las vías respiratorias (Oberdörster et al., 2004), a través de la región nasal; mientras que en otros pueden ser ingeridos directamente si éstos están presentes en los productos de consumo como alimentos, cosméticos, y etc. (Vance et al., 2015). Por otra parte, algunas NPs, en particular las NPs metálicas, se pueden

acumular en las plantas y en la cadena alimentaria, incrementando así las probabilidades de su ingestión (Rico et al., 2011).

Las células Caco-2, establecidas originalmente a partir de un adenocarcinoma colorrectal epitelial humano, son capaces de diferenciarse y polarizarse de manera espontánea en estructuras similares a los enterocitos, y se han utilizado ampliamente en estudios preclínicos en la industria farmacéutica (Shah et al., 2006). Algunas de las estructuras subcelulares más representativas de los enterocitos, tales como las microvellosidades y las uniones estrechas entre células, los transportadores de fármacos y proteínas de eflujo (por ejemplo, *PGP*, *BCRP* o *MRP2*), así como diversas enzimas metabólicas, aparecen después de la polarización y la diferenciación de las células Caco-2, en particular cuando éstas se mantienen en cultivo en un sistema bidimensional en insertos semipermeables (Sambuy et al., 2005).

Este modelo Caco-2 ha sido previamente pre-validado por el ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) para determinar los efectos de toxicidad aguda y para la valoración del transporte activo de los medicamentos y productos químicos (Prieto et al., 2010; Prieto et al., 2013); pero no para evaluar el cruce pasivo de las NPs. Se cree que las uniones entre las células Caco-2 son más estrictas que las observadas entre los enterocitos *in vivo*; lo que significaría que el transporte paracelular, determinado mediante este modelo, podría ser subestimado, al menos para ciertos tamaños de partículas.

Para obtener un epitelio intestinal bien diferenciado, las células Caco-2 se cultivaron en insertos semipermeables, hasta que se alcanzó la diferenciación celular completa y se formó la barrera intestinal funcional (alrededor de tres semanas de cultivo). Con el fin de estandarizar y comparar los resultados generados por los participantes del proyecto NANoREG, se establecieron los SOPs tanto para el cultivo de células Caco-2, como para su diferenciación, y la evaluación de los niveles de translocación de los NMs a través de la barrera celular. Estos procedimientos normalizados de trabajo se elaboraron, en parte, a partir de protocolo ECVAM DB-ALM n. 142 (*Permeability assay on Caco-2 cells*), que incluye varias modificaciones para adaptarlas a la evaluación de la translocación de los NMs. Así, los *transwells* propuestos por ECVAM (0,4 micras de poro) se han sustituido por insertos con 1 micra de poro, con el fin de reducir la interferencia de la membrana en la translocación de las NPs, debido al pequeño tamaño de los poros. Vista la variabilidad entre clones, se distribuyó un clon Caco-2 común para todos los miembros (distribuido por el co-líder ISS), y se usó también el mismo lote de suero. Después de 21 días de diferenciación, todos los grupos consiguieron monocapas, perfectamente construidas, compuestas por enterocitos cilíndricos.

La determinación de la integridad de la barrera celular es un requisito previo esencial para los experimentos de transporte/absorción, y ésta se alcanza sólo si la monocapa no se ha dañado durante el tiempo de cultivo. Así, se requiere que los valores de TEER se vayan midiendo durante todo el proceso de diferenciación para vigilar la evolución de la monocapa celular. De acuerdo con los criterios de aceptación de la ECVAM, se consideraron adecuados para este tipo de experimentos valores de TEER, después de 21 días de cultivo, que excedieran de $150 \Omega/\text{cm}^2$, aunque estos valores pueden depender del clon de células Caco-2 del que se disponga. Todos los grupos del proyecto europeo obtuvieron valores de TEER elevados durante el proceso de diferenciación. A partir de los distintos valores se calculó el valor medio todas las mediciones de TEER, obteniéndose un valor de TEER de $468 \pm 69 \Omega/\text{cm}^2$ al final de los 21 días de diferenciación (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Este valor es similar a los valores de TEER citados por distintos autores (Ouzilou et al., 2002; des Rieux et al., 2007; Piret et al., 2012).

Por otra parte, la permeabilidad de la monocapa de Caco-2 se evaluó mediante la medición del cruce pasivo de pequeñas moléculas hidrofílicas, principalmente a través del espacio paracelular; es decir, a través de las uniones estrechas. El uso de LY constituye uno de los marcadores establecidos para dicho fin, ya que su paso es fácilmente detectable y proporciona una técnica sensible y fiable para determinar la integridad de la barrera (Hidalgo et al., 1989). Dentro del proyecto europeo hemos desarrollado un protocolo para detectar y valorar el paso de LY, para usarlo al final del periodo de exposición, y así verificar los efectos de las NPs en la integridad de la monocapa. Los resultados obtenidos indican que no se observó ninguna interferencia de los NMs seleccionados con LY en los insertos libres de células, lo que indicaría que este ensayo es adecuado para evaluar el impacto de los NMs en la integridad del epitelio intestinal (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016).

Así, después de 24 h de incubación, se evaluó el impacto de los distintos NMs seleccionados sobre la integridad del epitelio intestinal y la permeabilidad, utilizando los valores de TEER y del marcador paracelular LY, respectivamente. Hay que señalar que ninguno de los NMs analizados alteró la integridad o la permeabilidad del epitelio intestinal. De manera particular, ninguno de los dos compuestos de TiO_2NPs (NM100 y NM101) provocaron disminución de los valores de TEER, ni se observó la presencia del compuesto LY en la cámara basolateral después del periodo de exposición con las distintas concentraciones ensayadas (10, 25 y $100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Estos resultados negativos también se observaron por aquellos grupos del proyecto que compartían estos NMs: ISS para los dos titanios, y Leitaf para el NM101 (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016).

Aunque no se han encontrado estudios con el mismo NM, Koeneman et al. (2010) tampoco observaron ningún efecto sobre el TEER en células Caco-2 después de estar expuestas a TiO₂NPs en una mezcla de rutilo y anatasa durante 24 horas a concentraciones de 1-1000 µg/mL. Los efectos de ZnONPs NM110 a la concentración de 10, 25 y 50 µg/mL sobre la integridad del epitelio intestinal, después de 24 horas de incubación, produjo resultados negativos tanto para los valores de TEER como para los niveles de LY en la cámara basolateral. Aunque los grupos de ANSES y UNamur observaron una tendencia a incrementar el porcentaje de LY en la cámara basolateral con la concentración, esta tendencia no llegó a ser significativa (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Por lo que hace referencia a los NMs de sílice NM200 y NM203, ninguno de ellos causaron alteración en la integridad ni en la permeabilidad de la monocapa de células a las concentraciones analizadas. Lo mismo observaron los grupos de Leitat, ISS y UNamur, que evaluaron ambos compuestos (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Nuestros resultados en cuanto a la capacidad del CeO₂NPs NM212 de afectar a la integridad y permeabilidad de la membrana volvieron a estar en armonía con los obtenidos por Leitat, ya que ninguno de los dos grupos observó incremento en el cruce de LY a las concentraciones utilizadas (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Tampoco se observó tal incremento después de la exposición a AgNPs NM300K, independientemente de la concentración, ni en nuestros resultados ni en los de UNamur (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Finalmente, nuestro grupo fue el único que analizó los efectos de los MWCNT NM401 sobre la integridad y permeabilidad de la monocapa. Tampoco con este NM se observaron variaciones en los valores de TEER en ninguna de las concentraciones ensayadas, ni incrementos en los niveles de LY en la cámara basolateral. Una conclusión que se puede extraer de estos estudios es que ninguno de los NMs evaluados, bajo las condiciones de estudio utilizadas, es capaz de producir alteraciones significativas en la estructura y funcionalidad de la monocapa de Caco-2 diferenciadas.

A pesar de la falta de afectación de la estructura y función de la monocapa generada, hay que demostrar si los NMs internalizan en las células de dicha capa o, incluso, si son capaces de atravesarla. Para la evaluación de la internalización de los NMs se usaron dos técnicas: TEM y microscopía confocal. Aunque en otras líneas celulares la técnica de TEM es una técnica excelente para la visualización de las NPs en el interior de las células, las células Caco-2 presentan un citoplasma muy granulado, lo que dificulta la observación de las NPs que se encuentran en concentraciones muy bajas y, sobre todo, de aquellas que tienen un tamaño muy pequeño. Es por esto que exploramos el uso de la microscopía confocal como alternativa. La microscopía confocal

permite la detección de algunos NMs metálicos (por ejemplo, la plata, el cerio, el titanio y el zinc) debido a su capacidad de reflejar la luz polarizada, aunque no distingue entre los agregados y los NMs individuales (Higgins et al., 2015). Gracias al marcaje diferencial entre los diferentes componentes celulares (núcleo y membrana plasmática), esta técnica permite investigar si los NMs se localizan en la superficie de los epitelios o se encuentran internalizados, ya sea en la célula como en sus núcleos (Joshi et al., 2016; Tariq et al., 2016); además, nos permite crear imágenes 3D de la monocapa de células. En nuestro estudio, TiO_2NPs NM100, CeO_2NPs NM212 y AgNPs NM300K se analizaron mediante microscopía confocal en las células Caco-2, tanto indiferenciadas como diferenciadas. Los resultados indican que las tres NPs son capaces de internalizarse dentro de las células indiferenciadas y, no sólo eso, sino que también pudieron internalizarse en el núcleo. En el caso de las células diferenciadas, el comportamiento no fue el mismo, observándose la localización intracelular e intranuclear de las AgNPs NM300K, mientras que las CeO_2NPs NM212 y TiO_2NPs NM100 aparecieron asociadas a las células fuera de la membrana celular plasmática. Esta técnica también ha mostrado ser adecuada para investigar la internalización de los NMs fluorescentes (Joshi et al., 2016) tales como las SiO_2NPs cargadas negativamente. En este caso, en las células Caco-2 indiferenciadas se observaron $\text{SiO}_2\text{NPs}(-)$ en el interior de las células y núcleos, mientras que en las células diferenciadas se observaron sólo en la superficie del epitelio intestinal y en el interior celular. Aunque algunas NPs se observaron adheridas a la membrana nuclear, en ningún caso se observaron en su interior. Nuestra conclusión es que la microscopía confocal es una herramienta muy adecuada para evaluar la internalización de las NPs metálicas y fluorescentes, como se ha observado por otros autores (Vanhecke et al., 2014; Higgins et al., 2015). Sin embargo, esta técnica no nos da información acerca de la composición química y/o la morfología de los NMs; por lo tanto, se recomienda el uso de técnicas adicionales tales como TEM o Raman, etc., que permitirán la identificación de estructuras. En este contexto también es recomendable el análisis por EDX de las estructuras internalizadas, para asegurar su composición y confirmar la presencia de los NMs intracelulares.

En el proyecto NANoREG se consideró la metodología TEM como la herramienta básica para medir la internalización de los NMs. De hecho, los distintos grupos utilizaron el análisis con TEM para detectar la penetración intracelular de AgNPs NM300K, SiO_2NPs NM200 y ZnONPs NM110 (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Con esta técnica se visualizó la localización intracelular de AgNPs NM300K y de SiO_2 NM200, lo que sugiere que estos NMs podrían ser internalizados por los enterocitos intestinales. Para ZnONPs NM110, la presencia de estos NMs dentro de células Caco-2 diferenciadas fue controvertida. Así, aunque se observaron estructuras como el NM110

en el citoplasma de los enterocitos, estas estructuras no estaban internalizadas sino que más bien aparecían superpuestas en las células (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016), por lo que podría ser un artefacto debido al corte de la monocapa al hacer las preparaciones del TEM. Aunque el TEM siempre ha parecido ser una buena técnica para estudiar la captación e internalización de los NMs por las células, la línea celular Caco-2 ha mostrado las limitaciones de la técnica. De hecho, esta técnica es costosa y consume mucho tiempo en su desarrollo, al tiempo que se ha de tener cuidado antes de sacar conclusiones definitivas sobre la internalización de los NMs si éstos no se observan en las células. La ausencia dentro de células en las áreas seleccionadas podría ser simplemente el resultado de una frecuencia muy baja de los NMs y, por lo tanto, una baja probabilidad de observación. Esta conclusión también es válida para la microscopía confocal. Por otro lado, las observaciones realizadas con NM110 indican que hay que prestar una especial atención en el análisis de las figuras obtenidas por TEM para determinar si en realidad los NMs han penetrado en las células o están depositados en su superficie.

Dada la dificultad que existe a veces para determinar si una inclusión intracelular es o no una NP, para confirmar la translocación de los NMs se han usado técnicas cualitativas, como el TEM acoplado a EDX o la microscopía confocal, y técnicas cuantitativas, como el ICP-MS. Lo mismo sucede cuando se quiere demostrar que las NPs han sido capaces de “atravesar” la barrera epitelial y translocarse en el interior del organismo. Teniendo en cuenta los datos cualitativos obtenidos, se podría concluir que la mayoría de los NMs evaluados fueron capaces de atravesar, aunque de forma muy limitada, el epitelio intestinal. Sin embargo, estos datos tienen que ser tomados con precaución ya que no todas las técnicas usadas son capaces de demostrarlo de una manera fehaciente.

En el caso del análisis de la translocación de los NMs a través del epitelio intestinal, el reto consistió en la detección de una pequeña cantidad de NMs en un gran volumen de medio basolateral (1,5 mL). Además, la observación de los NMs después de su incubación en medio de cultivo celular por TEM o SEM no es fácil debido a la presencia de gran cantidad de componentes orgánicos. Por lo tanto, se evaluó si la evaporación del medio y el tratamiento del medio de cultivo celular con proteinasa K podría mejorar la observación de los NMs. Los resultados mostraron que, aun tratando el medio basolateral con proteinasa K, para reducir ligeramente el halo formado por componentes orgánicos que rodeaban los NMs, todavía era difícil distinguir las estructuras cristalinas de los NMs debido al secado del medio; es decir, a las sales y proteínas del medio. Este hecho podría explicar la variabilidad observada en los resultados obtenidos entre

laboratorios para algunos NMs tales como SiO₂NPs NM200 y NM203 y las TiO₂NPs NM100 y NM101 (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Así, aunque algunos de los participantes del proyecto NANoREG detectaron la presencia de NMs en el medio basolateral, otros no lo hicieron. En ese contexto, consideramos que se requiere un análisis de la composición elemental mediante EDX con el fin de confirmar la presencia o no de los NMs estudiados en el medio basolateral del cultivo celular. De hecho, nuestra propuesta va más allá indicando que el análisis por EDX debería llevarse a cabo de forma sistemática para excluir posibles falsos positivos. En nuestro caso, aunque todos los NMs del proyecto NANoREG fueron analizados por TEM-EDX, sólo fuimos capaces de afirmar la presencia de NPs de titanio NM100 en la cámara basolateral, después de la incubación. Otros miembros, usando TEM o SEM acoplado a EDX, también observaron NPs en la cámara basolateral tras la exposición a este NM. Así, UNamur fue capaz de detectar una ligera presencia de SiO₂NPs NM200, aunque fue el único miembro capaz de hacerlo, ya que ni Leitat ni nosotros fuimos capaces de detectarlo (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). También fue capaz el mismo laboratorio de observar ZnONPs, aunque con niveles muy bajos. La incapacidad de encontrar los NMs SiO₂NPs NM203 y TiO₂NPs NM100 por parte del grupo del ISS está en concordancia con nuestros resultados, aunque ellos sí que fueron capaces de observar TiO₂NPs NM101 en la cámara basolateral por SEM. Por lo que hace referencia a las AgNPs NM300K, ni UNamur ni nosotros observamos NPs en el medio basolateral (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Utilizando esta técnica nos encontramos con varias limitaciones, ya que al usar bajas concentraciones de NMs se disminuye la probabilidad de encontrar NPs en las áreas seleccionadas. Además, el tratamiento con proteinasa K no mejoró la visualización de los NMs, así que, el bajo número de NPs junto al pequeño tamaño de algunas de ellas, como es el caso de las AgNPs, hace realmente difícil la observación de NPs individualizadas. De hecho, UNamur trató de confirmar la presencia de AgNPs NM300K de 15 nm en el medio basolateral de las células Caco-2 con EDX, pero se enfrentó a la dificultad de requerir una alta cantidad de NMs (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016).

Para intentar solventar el problema de la visualización de los NMs en el medio basolateral, en nuestro laboratorio analizamos la translocación de algunas NPs metálicas (TiO₂NPs NM100 y NM101, ZnONPs NM110, CeO₂NPs NM212 y AgNPs NM300K) mediante microscopía confocal. Se observaron aumentos de la reflexión en todos los casos excepto en las AgNPs, donde no parece haber un aumento de señal respecto al control. Sin embargo, no se pudieron evaluar las SiO₂NPs ni los MWCNT por no ser NMs metálicos. Así, la presencia de TiO₂NPs NM100 mediante microscopía confocal respaldaría nuestros resultados obtenidos por TEM-EDX. Para los otros casos,

se confirmaría la variabilidad observada entre laboratorios y la necesidad de la mejora de la observación por TEM-EDX.

Dado el bajo número de NPs observables en el medio basolateral se debería apostar por métodos cuantitativos por su mayor sensibilidad y fiabilidad en la detección de una pequeña cantidad de NMs. Así, con el fin de cuantificar la cantidad de NMs que pueden cruzar el epitelio intestinal, nosotros utilizamos ICP-MS. El método PIXE, usado por UNamur, no mostró ser lo suficientemente sensible para detectar concentraciones bajas (inferiores a 1 g/mL) de SiO₂ NM200, ZnO NM110, Ag NM300K y NM302 (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016). Por otra parte, los análisis de ICP-MS llevados a cabo por Leitat mostraron algunos valores de Ce²⁺ por encima del límite de cuantificación (0,01 mg/mL) en el medio basolateral del epitelio intestinal expuesto a CeO₂NPs NM212, lo que confirmaría nuestros datos cualitativos obtenidos por microscopía confocal. Sin embargo, nuestro análisis de ICP-MS dio valores por debajo del límite de detección, lo que concordaría con los resultados negativos obtenidos por TEM-EDX. Todos juntos, estos datos sugieren una translocación limitada a través del epitelio intestinal por parte de las CeO₂NPs NM212, que son capaces de cruzar la barrera intestinal. El análisis del contenido de titanio por ICP-MS no mostró translocación ni del TiO₂NPs NM100, llevado a cabo por nuestro grupo, ni de NM101, llevado a cabo por Leitat (Deliverable D-5.03 NANoREG, 2016), ya que en ambos casos los valores observados se encontraban por debajo del límite de cuantificación, después de analizar el medio basolateral de las células expuestas a dichos NMs durante 24 horas. En conjunto, estos resultados sugieren un cruce limitado de TiO₂NPs NM100 y NM101 a través de la barrera. Por otra parte, el análisis del contenido de Ag por ICP-MS no mostró translocación de AgNPs NM300K a través del epitelio intestinal, hecho que respalda la ausencia de NPs en el medio basolateral observada con TEM-EDX y con microscopía confocal, lo que sugiere que no hay translocación significativa de las AgNPs a través de la monocapa de células diferenciadas Caco-2.

Los datos obtenidos por TEM-EDX que sugerían el cruce de SiO₂NPs NM200 no pudieron ser confirmados por ICP-MS debido a su limitada sensibilidad. Dado el elevado contenido de Si en el medio de cultivo celular, esta técnica no parece ser adecuada para cuantificar concentraciones bajas de SiO₂NPs, en el caso de que estas NPs pudieran cruzar el epitelio. Así pues, la idoneidad de la cuantificación mediante ICP-MS depende de la sensibilidad analítica del método, pudiendo estar limitada por los niveles basales de dichos elementos en los medios de cultivo utilizados.

Por lo que respecta a la translocación de SiO₂NPs NM203, su presencia en el medio basolateral se observó de manera ocasional por el grupo del ISS (Deliverable D-5.03

NANoREG, 2016) lo que, juntamente con nuestros resultados negativos, indicaría un cruce limitado de estas NPs a través del epitelio intestinal. Dentro del proyecto NANoREG el WP 4.5.5 realizó un estudio de toxicidad oral con NM203 de dosis repetidas durante 90 días en ratas. El objetivo del estudio fue identificar y caracterizar los peligros de estos NMs, particularmente relevantes para la seguridad alimentaria, ya que se presenta en el aditivo alimentario E551. La administración de NM203 en ratas a través de una sonda nasogástrica (2, 5 10, 20 y 50 mg/kg de peso corporal por día) no causó ningún signo de toxicidad manifiesta en ambos sexos, durante todo el período de tratamiento. Para los distintos blancos evaluados (análisis histopatológico, biomarcadores séricos, genotoxicidad, toxicidad reproductiva e inmunotoxicidad) no se observaron relaciones dosis-respuesta claras. Curiosamente, las ratas macho mostraron un espectro más amplio de efectos tóxicos que las ratas hembra. La biodistribución y la deposición en los tejidos diana en el día 90 también se determinaron mediante ICP-MS después de la disolución de los tejidos. Se utilizó material no NP (ácido silícico, 50 mg/kg de peso corporal al día) para la evaluación comparativa de la biodistribución tisular. No se encontró una biodistribución significativa en los tejidos diana investigados (hígado, cerebro e intestino delgado) ni en ratas macho ni en hembras. Sólo en el bazo, en la concentración más alta probada (50 mg/kg de peso corporal), se encontró un ligero aumento significativo de NM203 en ambos sexos, lo que sugeriría una bioacumulación limitada de estas NPs en los órganos estudiados (datos no publicados).

5.4. Estudios de genotoxicidad

Después de la observación/detección de las NPs en el sistema Caco-2 diferenciado, uno de los objetivos del proyecto ha sido evaluar el daño genotóxico que estas NPs podrían estar ejerciendo en el sistema.

Hay que recordar que uno de los mecanismos comunes de toxicidad mediada por las partículas ultrafinas dentro de las células es mediante la inducción de estrés oxidativo, a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Oberdörster et al., 2004; Drake y Hazelwood., 2005; Ayres et al., 2008). La composición química de los NMs, más que el tamaño, se ha considerado que es el factor más determinante que influye en la formación de ROS en las células expuestas (Limbach et al., 2008). Así, distintos estudios indican que las ZnONPs inducen más daño oxidativo que las formadas por TiO₂, SiO₂ y ZrO₂ y carbono (Landsiedel et al., 2010). Del mismo modo, se conoce que las AgNP se caracterizan por inducir elevados niveles de estrés oxidativo en el interior de las células (Carlson et al., 2008; Kawata et al., 2009; Eom y Choi, 2010).

El DNA es probablemente el blanco más importante, desde el punto de vista biológico, del ataque oxidativo. Varios estudios han demostrado genotoxicidad o daño en el DNA inducida por AgNP en células en cultivo. Las AgNPs aumentan los niveles de roturas en el DNA (de simple y de doble cadena) tal como se puede detectar con el ensayo del cometa (AshaRani et al., 2008; Liu et al., 2010; Piao et al., 2011), al tiempo que son capaces de formar aductos en el DNA y generar micronúcleos tras la división celular (Kawata et al., 2009; Asharani et al., 2009; Foldbjerg et al., 2011). A pesar de que Nguyen y Mège (2016) demostraron la formación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), que es un marcador ubicuo de daño oxidativo del DNA, en los macrófagos J774A.1 tras la exposición a AgNPs, no obtuvieron efectos cuando utilizaron células HT29, lo que indicaría que las características celulares pueden suponer un factor importante al evaluar los efectos de las AgNPs.

En el presente estudio hemos observado un aumento del daño genotóxico oxidativo al exponer las células Caco-2 diferenciadas a AgNPs NM300K durante 24 horas. Este efecto fue dosis-dependiente, y observable mediante el ensayo del cometa. Conociendo la potencialidad de los NMs de producir ROS, nuestros resultados positivos encajan con estudios previos llevados a cabo en otras líneas celulares. No obstante, los estudios llevados a cabo por Song et al. (2014) muestran una ausencia de inducción de ROS después de 24 horas de exposición a AgNPs (hasta 200 µg/mL) en células Caco-2 no diferenciadas. Estos resultados negativos, contrarios a los obtenidos por nosotros, pueden ser debidos a distintos factores. Así, aunque la composición química de las NPs sea la misma, pueden haber múltiples características físico-químicas que difieran entre ellas, así como diferencias entre clones, tal y como hemos indicado anteriormente. Dado que el daño oxidativo puede ser reparado de manera muy eficiente por distintas líneas celulares, es posible que dependiendo de la NP usada y de la línea celular seleccionada, la célula sea capaz de eliminar las ROS producidas a las 24 horas. Ante esta situación, quizá es recomendable hacer estudios con exposiciones más cortas (como 3 horas), donde la célula aún no haya sido capaz de eliminar de manera eficiente gran parte de las ROS inducidas.

Estudios en ratones con dos tipos de AgNP (AgNP de 200 nm y de 20 nm) muestran que la Ag200, pero no la Ag20, aumenta los niveles de roturas de simple cadena en el DNA a los 7 días de exposición, mientras que no se observaron cambios después de un día de exposición (inyección de 5 mg/kg de peso corporal de NP) en ratones WT (*wild-type*) y *OGG1^{-/-}* (Asare et al., 2015). La respuesta observada depende del tejido analizado, siendo más pronunciada en los pulmones y en los testículos. Cuando estos estudios se repitieron para TiO₂NPs, se observó un aumento en los niveles de daño

oxidativo en el DNA en testículos de ratones WT, al igual que en los tejidos del pulmón. Ya que no se observaron cambios aparentes en el hígado, los autores concluyeron que el hígado parece responder de manera diferente en comparación con los otros tejidos. Sin embargo, tanto las partículas de plata como las de TiO₂ mostraron causar daño en el DNA en diferentes tejidos, incluyendo la médula ósea, sangre periférica e hígado (Tiwari et al., 2011; Kovvuru et al., 2014; Magdolenova et al., 2014).

A pesar de estar descrita en múltiples estudios la capacidad de las NPs de inducir ROS como mecanismo general de toxicidad y de genotoxicidad, no todos los estudios observan esta producción de ROS. En estudios llevados a cabo por nuestro grupo se estudió la producción de ROS en células BEAS-2B tras ser expuestas durante 24 horas a TiO₂NPs, CeO₂NPs, ZnONPs, AgNPs y MWCNT. Los resultados indican que tan sólo las ZnONPs, y tan sólo a la concentración más alta analizada (30 µg/mL) fueron capaces de inducir niveles significativos de ROS (Vila et al., en revisiones). Estos resultados negativos en cuanto a la producción de ROS por parte de TiO₂NPs y CeO₂NPs, en la línea BEAS-2B encajan con los obtenidos en nuestros estudios con células Caco-2 diferenciadas, donde no se ha encontrado incrementos en los niveles de daño genotóxico ni oxidativo por parte de estas dos NPs. Como ya hemos comentado, el tamaño de las partículas, así como otras características físico-químicas (Oberdörster et al., 2005; Buzea et al., 2007), al igual que el tipo celular u organismo usado en el estudio, influyen en la aglomeración y distribución de las NPs en los tejidos y células diana y, por tanto, modularan su capacidad para producir ROS y, en consecuencia, daño oxidativo en el DNA (Ferin et al., 1992; Heyder y Takenaka, 1996; Baggs et al., 1997; Zhang et al., 1998; Stone et al., 2000; Stearns et al., 2001; Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2003; Brown et al., 2004; Hetland et al., 2004; Ramage y Guy, 2004; Warheit et al., 2004; Barlow et al., 2005; Cui et al., 2005).

La diferenciación de las células Caco-2 conlleva la aparición de nuevas funciones propias de su estructura polarizada y su papel de barrera. De hecho, el perfil de expresión génica de las células Caco-2/ATCC mantenidas en cultivo en *transwell* durante 21 días muestra una coordinada disminución en la expresión de los genes implicados en la progresión del ciclo celular, la síntesis de DNA, el procesado del RNA y la traducción de proteínas. Asimismo, se observa un aumento en la expresión de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos y en la deposición de matriz extracelular. Otros genes propios del fenotipo enterocítico como son las proteínas del borde en cepillo IV dipeptidil peptidasa y villina, la proteína de unión adherente E-cadherina y la proteína de unión estrecha *CLAUDIN 7* también sufren un aumento en su expresión (Mariadason et al., 2002). Dada la función de los enterocitos se ha analizado

la expresión de los genes *SLC15A1*, *HPT1* y *PGP* en células Caco-2 diferenciadas (Behrens y Kissel, 2003) y los resultados indican que mientras los niveles de mRNA de los transportadores de péptidos *SLC15A1* y *HPT1* aumentaban de manera continua, alcanzando un máximo entre la tercera y cuarta semana de cultivo, la expresión de *PGP* llegaba a un pico de expresión el día 21 y decrecía hasta alcanzar los valores del día 7 el día 28. Aunque los incrementos más grandes en la expresión de los transportadores se encontraron siempre entre la primera y segunda semana otros autores observaron un pico de *SLC15A1* el día 14 post-siembra (Matsumoto et al., 1995). Estas diferencias pueden ser debidas al uso de un distinto clon de células Caco-2, al número de pases, o a las condiciones de cultivo. Otros estudios también han observado que la actividad sacarasa empieza a aumentar el día 6 post-siembra y llega a su máximo valor, después de un incremento gradual, el día 21 post siembra (Van Beers et al., 1995). Del mismo modo, otros estudios muestran que la monocapa Caco-2 presenta una unión continua y circunferencial con *ZO-1*, *CLAUDIN1*, *OCCLUDIN* y E-cadherina en las fronteras intercelulares apicales formando una manera de cinta, que rodea y delimita las fronteras celulares, al visualizarse mediante microscopía de fluorescencia (Yu et al., 2013)

Hay que señalar que la población Caco-2 en cultivo, incluso en la fase estacionaria de crecimiento, se caracteriza por la presencia de subpoblaciones con diferentes morfologías. El mosaico de la expresión de las enzimas del borde en cepillo en las células Caco-2 confluentes ya se ha descrito, al igual que la actividad sacarasa-isomaltasa (Beaulieu y Quaroni, 1991). También se han descrito los patrones transitorios en mosaico de los marcadores intestinales funcionales específicos, así como la falta de coordinación entre la diferenciación y los genes relacionados con la proliferación (Vachon y Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996). Esto sugiere que las diferenciaciones morfológicas y funcionales no se encuentran acopladas en las células parentales Caco-2. Se ha observado que la expresión de la actividad sacarasa-isomaltasa aumenta con el número de pases, mientras que, al mismo tiempo, la actividad fosfatasa alcalina disminuye (Chantret et al., 1994; Briske-Anderson et al., 1997; Yu et al., 1997). La explicación para estas diferencias en la expresión de los parámetros de diferenciación con un número creciente de pases se ha propuesto que es debida a la heterogeneidad intrínseca de la población de células Caco-2 parental, lo que lleva a la selección durante los pases repetidos de cultivo, al crecimiento más rápido de subpoblaciones que expresan diferentes características (Walter y Kissel, 1994, 1995; Briske-Anderson et al., 1997; Yu et al., 1997).

Viendo toda esta heterogeneidad en los niveles de expresión génica en las células Caco-2 diferenciadas, hemos seleccionado genes que nos proporcionaran unas

diferencias más claras y estables respecto a las Caco-2 no diferenciadas en nuestro clon celular, nuestro número de pases y en las características de cultivo utilizadas. Así pues, analizando los genes transportadores del borde en cepillo *SLC15A1* y *SI* y los de uniones celulares *CLAUDIN* y *OCCLUDIN*, se esperó ver un posible efecto de las AgNPs NM300K sobre las Caco-2 diferenciadas tras 24 horas de exposición. Aunque ni los valores de TEER ni la permeabilidad de las células se vieron modificados tras la exposición, podía ser posible que la exposición indujera cambios más sutiles, identificables a nivel de variaciones en la expresión génica de aquellos genes asociados con la nueva funcionalidad de las Caco-2, una vez diferenciadas. En general no hemos observado cambios significativos en los niveles de expresión génica; sin embargo, en el caso de los transportadores del borde en cepillo, se observaron aumentos en los niveles de mRNA, que podrían ser consecuencia de la internalización de las NPs. Respecto a los genes involucrados en la regulación de las uniones celulares, en ambos casos también se observaron incrementos en los niveles de mRNA, pero seguidos de una disminución en la concentración más alta. La presencia de subpoblaciones celulares en diferentes estadios de diferenciación y la internalización desigual de las NPs en las células, podría suponer una gran variabilidad en los niveles de expresión génica, lo que se traduciría en una falta de significación de los valores obtenidos.

Es importante destacar que en estos estudios se utilizó un modelo de monocultivo formado solamente por células Caco-2 diferenciadas. Este modelo, a pesar de ser ampliamente aceptado como un adecuado modelo *in vitro* de absorción a través del epitelio intestinal para el transporte de fármacos/xenobióticos y para estudios de metabolismo, representa una simplificación en comparación con la complejidad de la barrera intestinal *in vivo*. De hecho, aunque el epitelio intestinal está constituido principalmente por enterocitos, también están presentes otros tipos de células como las células secretoras de mucus (compuesto de proteínas fuertemente glicosiladas -mucina) en el lumen intestinal (Pelaseyed et al., 2014). Las células caliciformes se pueden imitar *in vitro* utilizando líneas celulares secretoras de mucus tales como la HT29 (Lesuffleur et al., 1993). Así, se podrían establecer modelos 3D a partir del co-cultivo de células Caco-2 y células HT29-MTX (Mahler et al., 2009) a fin de tener en consideración el impacto del mucus en la interacción de los NMs con la barrera intestinal. Como constituyente normal del epitelio intestinal existen las células M, que son un tipo de células especializadas que se encuentran en el epitelio que cubre el tejido linfóide asociado a la mucosa en el tracto digestivo (Ohno et al., 2016). Estas células juegan un papel central en la iniciación de la respuesta inmune de la mucosa mediante el transporte de antígenos, macromoléculas y microorganismos para entregarlos al tejido linfóide subyacente. Las células M, a diferencia de los enterocitos absorbentes, carecen

de un borde en cepillo apical altamente organizado y de glucocálix, y están mal equipadas por lo que respecta a enzimas digestivas. Además, su superficie basolateral está profundamente invaginada para formar “bolsillos intraepiteliales” que están en contacto íntimo con los linfocitos que migran a este peculiar compartimento a partir del tejido linfoide (Ohno et al., 2016). Así pues, se pueden establecer modelos *in vitro* alternativos al de Caco-2 a partir de co-cultivos de células Caco-2 y células Raji B (de linfoma de Burkitt humano; Des Rieux et al., 2007), e incluso combinando las tres líneas celulares descritas (Antunes et al., 2013; Araújo y Sarmiento, 2013; Schimpel et al., 2014). En consecuencia, el desarrollo y el uso de modelos *in vitro* de mayor complejidad, incluyendo otros tipos de células, podría representar un modelo más “real” para la predicción de la absorción intestinal de los NMs generando datos más fiables acerca de la potencial translocación de los NMs a través de la barrera intestinal.

5.5. Estudios de larga duración.

Las NPs metálicas se encuentran entre los NMs más usados (Vance et al., 2015). Como se viene comentando a lo largo de este trabajo, la alta reactividad biológica de los NMs, en comparación con sus correspondientes materiales en tamaños no-nanométricos, puede suponer un aumento de su toxicidad, incluyendo al material genético entre sus blancos. Por estas razones, nuevos campos como la nanotoxicología y la nanogenotoxicología están recibiendo una creciente atención en busca de los posibles riesgos de los NMs, así como de sus posibles mecanismos de acción (Landsiedel et al., 2009; Singh et al., 2009; Demir et al., 2011; Vales et al., 2013).

Hoy en día las AgNPs se están utilizando en múltiples aplicaciones incluido el cuidado personal, el cuidado del hogar, productos médicos y envases de alimentos, debido a sus propiedades antimicrobianas de amplio espectro (Matzke et al., 2014). La producción anual de AgNPs se estima en 320 toneladas y se espera que continúe creciendo en los próximos años (Hendren et al., 2011; Nowack et al., 2011; Matzke et al., 2014). Tanto los procesos de fabricación de las AgNPs como su uso aumentan la posibilidad de exposición humana, fundamentalmente a través del tracto gastrointestinal, a través del agua y alimentos contaminados. Además, se estima que aproximadamente el 14% de los productos de la nanotecnología de plata podría liberar partículas en el aire durante el uso (Quadros y Marr, 2010). De este modo, las NPs inhaladas atrapadas en el mucus de las vías respiratorias también pueden trasladarse al tracto gastrointestinal (Kreyling et al., 2013).

Aunque son muchos los estudios que se han centrado en la determinación de la toxicidad de las AgNPs en diferentes líneas celulares (Kim et al., 2010; Hamilton et al.,

2014; Dubey et al., 2015), hay pocos estudios de toxicidad de las AgNP en el tracto gastrointestinal. Además, prácticamente todos los estudios relacionados han evaluado el impacto potencial en términos de exposición aguda, es decir, frente a tratamientos cortos y elevadas concentraciones (Aueviriyavit et al., 2014; Song et al., 2014; Cheung et al., 2016). Sin embargo, el escenario de exposición real es una exposición a largo plazo y a concentraciones bajas de AgNP, lo que puede dar lugar a diferentes consecuencias biológicas, en comparación con lo observado en las exposiciones agudas a altas concentraciones (Coccini et al., 2014; Comfort et al., 2014; Vales et al., 2015; Aude-Garcia et al., 2016). En este contexto, se necesitan nuevos estudios que reproduzcan escenarios de exposición más realistas: exposiciones subcrónicas o a largo plazo a concentraciones bajas del compuesto. Comfort et al. observaron que en el rango de $\mu\text{g/mL}$, las AgNPs de 50 nm no inducían una respuesta citotóxica, pero activaban el estrés sostenido y las respuestas de señalización, después de la incubación durante tres meses de queratinocitos HaCat (Comfort et al., 2014). Por su parte, Coccini et al. investigaron la citotoxicidad de las AgNP de 20 nm en las líneas celulares SH-SY5Y y D384 después de exposiciones a corto (4-48 h) y largo plazo (10 días; Coccini et al., 2014). Los resultados obtenidos indicaron que los efectos tóxicos de las AgNP empezaron a observarse tras exposiciones a corto plazo con $25 \mu\text{g/mL}$, apareciendo cambios en el metabolismo mitocondrial y daño de la membrana, mientras que las concentraciones más bajas ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$) comprometían la capacidad proliferativa de las células. En referencia a los estudios a largo plazo, Vales et al. (2016) encontraron que, a diferencia de los estudios a corto plazo, se observaba un aumento de los niveles intracelulares de ROS, al tiempo que se activaba la respuesta inflamatoria en células BEAS-2B expuestas a concentraciones subtóxicas (1, 10 y $20 \mu\text{g/mL}$) de MWCNT NM403. Sin embargo, similares condiciones (tres semanas de exposición a concentraciones bajas de $<20 \mu\text{g/mL}$) de TiO_2NPs en células epiteliales bronquiales humanas (BEAS-2B) no dieron lugar a la generación de ROS intracelular, ni a daño genotóxico, ni a un aumento significativo de la expresión de citoquinas (Vales et al., 2015). Dado que los efectos biológicos observados en diferentes líneas celulares después de la exposición a corto y largo plazo de los NMs, difieren de los observados en estudios a corto plazo, parece obvio que se deba prestar más atención a entender los efectos a largo plazo de las AgNP (Hristozov et al., 2012; Coccini et al., 2014; Comfort et al., 2014; Vales et al., 2015).

Es por esto que usando nuestro modelo de células Caco-2 hemos evaluado los efectos de las AgNPs durante las 6 semanas de exposición a concentraciones subtóxicas (0,5 y $1 \mu\text{g/mL}$). Aunque el modelo de exposición de las Caco-2 diferenciadas mimetice más lo que sucede en la realidad, a día de hoy todavía no es viable

mantenerlas en cultivo más de 5 días post-diferenciación, por lo que ha sido necesario usarlas en su estado no diferenciado. Esto nos ha permitido mantenerlas en cultivo durante semanas y evaluar el potencial carcinogénico de las AgNPs.

En los estudios de transporte ya demostramos, no sólo en las células diferenciadas sino también en las células no diferenciadas, la capacidad de las AgNPs de internalizar en las células Caco-2, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Nuestro estudio a largo plazo nos ha permitido analizar el comportamiento de las células Caco-2 en cuanto a la tasa de división durante las 6 semanas de exposición. Así, observamos cómo las células tratadas se dividían a un ritmo más lento durante las primeras semanas de exposición, seguramente debido a la internalización de estas NPs. Sin embargo, a la semana 6 del tratamiento la tasa de división de las células tratadas era ya equivalente a la tasa de división de las células control debido, posiblemente, a los fenómenos adaptativos surgidos debido a la exposición continuada a las AgNPs. Aunque no en el campo específico de los NMs, estos fenómenos adaptativos han sido observados ya con anterioridad en estudios de exposición crónicos a otros contaminantes ambientales tales como el cadmio o el arsénico (Pi et al., 2005; Sun et al., 2011; Bach et al., 2014). En esos casos, los mecanismos de adaptación que se han propuesto pasan por el aumento de los sistemas de excreción de compuestos exógenos, el aumento de actividad de los sistemas de defensa antioxidante, el aumento en la capacidad reparadora de la célula o la resistencia a la apoptosis, entre otros.

Una ventaja importante del uso de exposiciones a largo plazo es que también se pueden determinar los procesos de desdiferenciación celular como indicadores de transformación celular y de carcinogenicidad. Estos marcadores le confieren un valor extra a estos estudios respecto a los ensayos estándar a corto plazo, donde el marcador de riesgo evaluado es la genotoxicidad, que evalúa indirectamente el riesgo carcinogénico. Este enfoque es capaz de determinar la existencia de procesos carcinógenos no genotóxicos vinculados a la exposición frente los NMs. Aunque el crecimiento celular independiente de anclaje es considerado uno de los biomarcadores de cáncer más importantes, otros biomarcadores tales como cambios morfológicos, la secreción de metaloproteinasas, invasión, migración y angiogénesis también se incluyen entre los marcadores característicos de los procesos de carcinogénesis. De hecho, hay buenas asociaciones entre los cambios morfológicos, secreción de metaloproteinasas y el crecimiento independiente del anclaje frente a la exposición a las CoNPs (Annangi et al., 2015).

El crecimiento independiente de anclaje de células en agar blando (*soft-agar*) es una de las características distintivas de la transformación celular. Las células

típicamente normales no son capaces de crecer en estas condiciones de cultivo que imitan escenarios tridimensionales como la del entorno celular *in vivo* (Hanahan y Weinberg, 2011). Ya hay estudios con exposiciones a largo plazo con diferentes NPs en diferentes líneas celulares. Los datos de Vales et al. (2015) revelaron un aumento dependiente de la dosis en la formación de colonias de células BEAS-2B tras la exposición a TiO₂NPs (1, 10 and 20 µg/mL) durante 4 semanas, aunque sólo la concentración más alta (20 µg/mL) produjo aumentos estadísticamente significativos. También observaron un aumento del número total de colonias tras la exposición durante 4 semanas a MWCNT en el mismo tipo celular (Vales et al., 2016). De estos últimos estudios se puede concluir que la exposición crónica a MWCNT es capaz de inducir el fenotipo de transformación celular medible por la capacidad de células de crecer en *soft-agar*. Annangi et al. (2015) también observaron incrementos en la formación de colonias en *soft-agar* en una línea celular MEF deficiente para la reparación de daño oxidativo (MEF *Ogg1*^{-/-}) tras exponerla a CoNPs durante 5 semanas. No obstante, la línea MEF *wild-type* también fue capaz de aumentar la formación de colonias tras la exposición a CoNPs, aunque requiriendo tiempos de exposición más largos (10 semanas). En nuestro estudio hemos observado como en la semana 6 del tratamiento el número de colonias capaces de crecer en el *soft-agar* incrementó de manera significativa respecto el control sin tratar. Este aumento del crecimiento no se observó con anterioridad en el tratamiento, lo que nos indica que es a partir de la semana 6 del tratamiento en la que las AgNPs están induciendo la aparición de ciertas características asociadas al fenotipo tumoral.

Annangi et al. (2015) introdujeron una modificación en el protocolo del *soft-agar* estándar para así poder estudiar otra característica del fenotipo tumoral, que consiste en evaluar la capacidad del secretoma de las células expuestas de actuar como un inductor o promotor del crecimiento tumoral de células adyacentes. En su estudio, Annangi et al. (2015) aplicaron la modificación de la técnica, denominada *soft-agar* indirecto, utilizando el medio condicionado de las células MEF *Ogg1*^{-/-} expuestas a CoNPs para analizar la promoción del crecimiento en *soft-agar* de las células HeLa, que son susceptibles a formar colonias de manera espontánea. Con este enfoque, demostraron la presencia de factores de promoción en el secretoma de las células MEF *Ogg1*^{-/-} expuestas a CoNPs, tras observar la formación de colonias de gran tamaño de células HeLa en comparación con lo observado en el control, lo que confirma la capacidad de transformación de las células expuestas. Del mismo modo, en nuestro estudio hemos usado el medio condicionado de las células Caco-2 expuestas a AgNPs (0,5 y 1 µg/mL) para analizar la promoción en las células HCT116, que también son células capaces de crecer espontáneamente en *soft-agar*. Aunque al inicio del

tratamiento no se observaron diferencias entre el número de colonias totales y grandes de las células control y las células tratadas con 0,5 µg/mL de AgNPs, sí que se observó un número muy reducido de colonias tras la exposición a 1 µg/mL de AgNPs. A mitad del tratamiento se observó un decrecimiento del número de colonias en el control y en el tratamiento con 0,5 µg/mL. Sin embargo, se observó un aumento muy significativo del número de colonias tras los tratamientos con 1 µg/mL en la semana 6 de exposición, indicando que ya en esta semana esta característica tumoral se pone de manifiesto como consecuencia de la exposición.

La secreción de MMPs también se considera un biomarcador precoz de los efectos cancerígenos, jugando un papel crucial en la invasión tumoral, la morfogénesis, la angiogénesis y la metástasis, y en la cicatrización de heridas por la remodelación de la matriz extracelular (Oum'hamed et al., 2004; Kessenbrock et al., 2010). Aunque se han identificado varios subtipos de MMPs, se considera que las MMP2 y MMP9 son enzimas críticas implicadas en la degradación del componente principal de la membrana basal de colágeno de tipo IV. Estos marcadores ya se han utilizado en distintos estudios; así, Annangi et al. (2015) observaron que las células MEF *Ogg1*^{-/-} secretan elevados valores de MMP2+9 después de ser tratadas durante 5 semanas con CoNPs. Coincidiendo con otros marcadores de transformación, en nuestro estudio, se ha observado un incremento en la secreción de MMP2+9 después de las 6 semanas de exposición. Aunque este incremento era dependiente de la concentración, no llegó a ser estadísticamente significativo ya que se observó mucha variabilidad entre réplicas. Hay que señalar que ambas réplicas crecieron independientemente la una de la otra durante las 6 semanas de tratamiento. La ya citada anteriormente heterogeneidad poblacional de las Caco-2 y la selección de las poblaciones con los pases, podrían explicar las diferencias entre las dos réplicas. Ya que se ha encontrado que éste es el tiempo de tratamiento en el que suceden los cambios asociados a un fenotipo de célula transformada, es de esperar que todos los cambios no sucedan coordinadamente en una línea celular tan heterogénea, por eso alargar el tratamiento algunas semanas más seguramente podría darnos una información más clara de las características oncogénicas de nuestras células expuestas. De todas formas, parece evidente que la exposición prolongada a bajas dosis de AgNP está induciendo en nuestras células diversos cambios asociados con la adquisición del fenotipo tumoral, ya que en la semana 6 nuestras células expuestas muestran un –aunque ligero– aumento de proliferación, han adquirido la capacidad de crecer independiente de anclaje, y su secretoma es más rico en MMPs y es capaz de promover el fenotipo tumoral en una línea celular distinta.

Siguiendo el mismo esquema, en la semana 6 de tratamiento, las células Caco-2 tratadas con AgNPs presentan un incremento del número de células con capacidad migratoria. El potencial de migración e invasión se asocia con el grado de malignidad de las células tumorales, y es una razón crucial para la alta mortalidad de los tumores malignos, incluyendo el cáncer colorrectal, en comparación con los tumores benignos. A través de la migración y la invasión, un tumor primario podría extenderse a varios órganos y formar metástasis múltiples. El cáncer colorrectal, por ejemplo, pueden formar metástasis hepática (Li et al., 2015), metástasis de pulmón (Oh et al., 2015), metástasis ósea (Sun et al., 2015), y metástasis de los ganglios linfáticos (Fang et al., 2015). La migración y la invasión de las células tumorales epiteliales generalmente se consiguen mediante la denominada transición epitelial-mesenquimal (EMT). A grandes rasgos, durante la EMT la E-cadherina se sustituye por N-cadherina, y el citoesqueleto de queratina se sustituye por un citoesqueleto de vimentina. Mientras tanto, las células pierden la polaridad y las uniones de adhesión de célula-célula y célula-membrana basal quedan interrumpidas, por lo que las células tumorales transformadas son propensas a moverse (Kalluri y Neilson, 2003). Varios factores de transcripción, como el *SNAIL*, *SLUG*, *ZEB-1* y *TWIST*, están sobreexpresados durante la EMT (Lindsey y Langhans, 2014). Además, las MMPs se secretan para disolver la matriz extracelular, facilitando que las células tumorales penetren a través del endotelio (Lamouille et al., 2014; Vella, 2014; Cao et al., 2015).

Como se ha resumido en el párrafo anterior, se acepta que la EMT es un proceso fundamental para la formación de metástasis, durante el cual las células tumorales pierden sus propiedades epiteliales y adquieren un fenotipo similar al de los fibroblastos. Como consecuencia, se observa reducción de la adhesión intercelular, aumento de la invasividad y aumento de la resistencia apoptótica de las células (Kang y Pantel, 2013; Mathias et al., 2013). Se conoce que varias proteínas pertenecientes a los factores de transcripción de dedos de zinc, incluyendo *SNAIL1*, *SNAIL2* (Slug), *ZEB1/2*, y las proteínas *hélice-bucle-hélice* (*bHLH*) como *TWIST1/2*, están involucradas en estos programas de EMT (Hartwell et al., 2006; McCoy et al., 2009; Taube et al., 2010; Ocaña et al., 2012; De Craene y Berx, 2013; Zheng et al., 2014). Se ha visto que estas proteínas se expresan en diferentes tumores sólidos y, de hecho, este proceso está involucrado en la promoción de las células de cáncer colorrectal de invadir la membrana basal y el microambiente circundante, tales como los sistemas linfáticos y vasculares y, en última instancia, contribuir a la intra o extravasación (Guarino et al., 2007).

La expresión de diversas proteínas involucradas en la formación de las uniones estrechas se ha visto desregulada en los cánceres colorrectales, tal como se indica en

la revisión de Martin y Jiang (2009). Se supone que la adhesión célula-célula podría contribuir a promover o inhibir la migración, asumiéndose que las cadherinas son posibles reguladoras clave de la migración de las células del cáncer y la metástasis. De hecho, se ha encontrado que la proteína de unión adherente (E-cadherina) se encuentra disminuida en los cánceres colorrectales invasivos (Tsanou et al., 2008). Esta proteína se ha estudiado principalmente por su papel en el control de la cohesión y la diferenciación de los epitelios (Gumbiner, 2005), aunque también por su implicación en la migración de células epiteliales durante el desarrollo. Se conoce que un número diverso de factores de transcripción, como *SLUG*, *SNAIL* y *ZEB bHLH*, están relacionados con la represión de la E-cadherina. Se observa que en diferentes líneas celulares de cáncer gástrico se expresa el factor de transcripción Snail1 y que esto causa la inhibición de la E-cadherina y provoca la EMT (Wang et al., 2007; Whiteman et al., 2008). De manera similar, también se ha observado que *SLUG* juega un papel importante en la regulación por disminución de E-cadherina en líneas celulares de cáncer de colon (Shioiri et al., 2006). Dado que el factor de transcripción *SNAIL1* ha mostrado ser crucial para el movimiento celular durante la progresión del cáncer y la metástasis, en pacientes con cáncer de colon se ha observado un aumento de los niveles de *SNAIL1* asociado con un mal pronóstico clínico, probablemente debido a la baja regulación de la expresión de E-cadherina (Peña et al., 2009; Kroepil et al., 2012). Así, se considera que *SNAIL1* juega un papel importante en el desarrollo de tumores malignos humanos, incluyendo aquellos del tracto gastrointestinal como el cáncer colorrectal, que es uno de los cánceres más agresivos y que causa una elevada tasa de mortalidad por cáncer en los países occidentales (Cunningham et al., 2010). De manera similar, una expresión positiva de *SLUG* y una expresión negativa de la E-cadherina en pacientes con carcinoma colorrectal, ha mostrado ser indicativa de mal pronóstico (Shioiri et al., 2006). Así pues, los niveles de *SNAIL1* están inversamente correlacionados con la expresión de E-cadherina (Kroepil et al., 2012) y esta conclusión está de acuerdo con la afirmación de que Snail1 actúa como un represor transcripcional de la expresión *CDH1*. A pesar de observar varias características de célula transformada en la semana 6 de exposición, y esperar un aumento de la expresión de *SLUG* y *SNAIL1* y una disminución de E-cadherina, no hemos podido observar alteraciones a nivel transcripcional en nuestros estudios; si bien es verdad que sería necesaria una evaluación de la expresión de la proteína para confirmar estos resultados negativos. Otro factor que justificaría nuestros resultados negativos podría ser la heterogeneidad poblacional de la línea Caco-2, siendo éste un factor que podría haber influido en nuestros resultados mostrando mucha variabilidad y una transformación desigual en nuestro cultivo.

EPCAM (molécula de adhesión celular epitelial) es una glicoproteína de superficie expresada por carcinomas invasivos y algunos epitelios. *EPCAM* tiene actividad pronocogénica, de promoción de la proliferación celular, la motilidad, la carcinogénesis y la metástasis. Variaciones en sus niveles se han correlacionado con un aumento de la invasividad del cáncer y un mal pronóstico. La abrogación de la función de las uniones estrechas parece ser un requisito previo para la metástasis (Martin et al., 2011), y *EPCAM* puede promover la metástasis mediante la modulación de estas uniones (por ejemplo, actuando sobre ZO-1, ocludinas o claudinas). En nuestro estudio hemos podido observar un incremento en la expresión del mRNA de *EPCAM* en la semana 6 de tratamiento a la concentración de 1 µg/mL de AgNPs, aunque este incremento no llegó a alcanzar significación estadística. Por lo que respecta al análisis transcripcional de ZO-1, éste mostró resultados contrarios a los esperados. Así, se ha observado un aumento de la expresión del mRNA durante todo el tratamiento incluso en la semana 6 de exposición, observándose una disminución muy significativa respecto las semanas anteriores. Aun así, la expresión del mRNA de ZO-1 ha seguido siendo mayor que la observada en el control. Dado que ha sido al final del periodo de exposición donde se han empezado a observar algunos biomarcadores de transformación celular, sería interesante prolongar unas semanas más el estudio para poder obtener conclusiones más claras. El análisis de los niveles de proteína volvería a ser indispensable en este análisis.

Coincidiendo con la modificación de las adherencias célula-célula y célula-sustrato, las células en EMT se someten a un cambio dramático en la morfología celular, aplanándose y alargándose conduciendo a la célula a una morfología mesenquimal (Hay, 2005). Al mismo tiempo, los filamentos intermedios del citoesqueleto se someten a un cambio de composición significativo como células epiteliales, que normalmente sólo expresan filamentos intermedios queratínicos, e inician la expresión de vimentina. Debido a este cambio dramático en la composición, la expresión de vimentina se ha convertido en un marcador de EMT. Por tanto, la vimentina es una proteína predominante de filamentos intermedios en las células mesenquimales (Franke et al., 1982) y su papel es especialmente interesante en la migración celular y en la transición epitelio-mesénquima de los carcinomas epiteliales.

Los estudios de líneas celulares de carcinoma epiteliales humanos han demostrado que la expresión de vimentina se induce en líneas de células invasivas (Sommers et al., 1989, 1992; Gilles et al., 1996). Mendez et al. (2010) demostraron que la expresión de vimentina en las células epiteliales es suficiente para inducir varias características importantes de la EMT, incluyendo la adopción de una forma mesenquimal y el aumento

de la motilidad. En nuestro estudio hemos observado un aumento significativo de la expresión del mRNA en la semana 2 de exposición, pero este aumento no se mantuvo en la semana 6, donde los valores obtenidos no difieren significativamente de los observados en el control. Aunque en nuestro estudio no se ha hecho un análisis morfológico estricto, como en cualquier estudio de larga exposición, sí que hemos hecho un seguimiento morfológico utilizando el microscopio de inversión. Así, durante el tiempo de exposición analizado no se han observado cambios significativos en la morfología de estas células. Hay que señalar que las células Caco-2 tienen una morfología irregular con un citoplasma muy expandido, por lo que no es fácil la evaluación visual de cambios morfológicos.

Todos estos genes relacionados con la EMT no se han visto alterados en nuestro análisis de la expresión del mRNA en la semana 6 de tratamiento, que es cuando se han observado cambios en la tasa de proliferación o en el crecimiento en *soft-agar*. Aun así, sí que se ha observado incremento en la capacidad de migración de estas células Caco-2 tratadas con AgNPs (en ambas concentraciones). Este aumento de la capacidad de migración va asociada, como se ha venido diciendo, a la EMT. Esta transición va asociada a una modificación en la expresión de muchos genes, pero no necesariamente de todos ellos, y además no tienen por qué darse a la vez. El cambio de la expresión de alguno de ellos ya podría ser suficiente para justificar la adquisición de un fenotipo tumoral. Es en esta semana 6 dónde se han empezado a observar cambios, con lo que es posible que algunos otros genes, que no se han analizado, relacionados con la adhesión celular, como claudinas u ocludinas, estén sufriendo modificaciones en la expresión. Así pues, sería necesario ampliar la batería de genes a analizar. Además, esta semana 6 de exposición parece ser un punto de inflexión en el que se están dando muchos cambios. Por tanto, si se siguiera con el tratamiento unas semanas más, se podría valorar si estas características de célula transformada se mantienen en el tiempo y, además, si fuera así, si se disminuye la variabilidad observada en los experimentos de expresión al estabilizarse el fenotipo transformado.

PTEN es un gen supresor de tumor. Como tal, la detección de pérdida de su producto mediante técnicas de inmunotinción en tejidos de cáncer colorrectal se ha asociado con la enfermedad avanzada, la metástasis de hígado y una pobre supervivencia de los pacientes (Zhou et al., 2002; Jiang et al., 2003; Colakoglu et al., 2008; Li et al., 2009), lo que sugiere su potencial papel de protección contra la progresión del cáncer colorrectal humano. *PTEN* controla la polaridad en las células epiteliales normales y se podría especular que la pérdida de esta proteína puede ser suficiente para desencadenar la EMT, un evento temprano crítico en la invasión y la metástasis de

muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal. Hay que señalar que los efectos de la pérdida de *PTEN* se han medido, principalmente, en líneas celulares de cáncer que albergan otras numerosas mutaciones oncogénicas y que han perdido su fenotipo epitelial (Haier y Nicolson, 2002; Rychahou et al., 2008; Bowen et al., 2009), lo que podría modular el verdadero papel de *PTEN*.

Existe un trabajo en el que se ha analizado el papel de *PTEN* en células diferenciadas Caco-2/15, un clon distinto al usado en nuestros estudios (Langlois et al., 2010). Los resultados obtenidos muestran que la reducción de la expresión de *PTEN* en estas células deteriora gravemente su polaridad funcional, lo que se asoció con niveles reducidos de proteínas de unión estrecha y con una reducción significativa de los valores de TEER. Además, las células Caco-2/15 que contienen un bajo nivel de *PTEN* tiene una mayor capacidad para migrar e invadir *in vitro* y de formar tumores *in vivo* en ratones *nude*. Aunque el silenciamiento de *PTEN* intensificó aún más el potencial metastásico de células de cáncer colorrectal “desdiferenciadas” (HCT116 y CT26), este silenciamiento no fue suficiente para conferir propiedades metastásicas a las células Caco-2/15 *in vivo*.

Otros estudios también ha observado que la reducción de la expresión de *PTEN* en líneas celulares de cáncer colorrectal induce la capacidad de migración *in vitro*. En el estudio de Langlois et al. (2010) los resultados revelaron que al silenciar *PTEN* en las células de cáncer colorrectal se les confiere una capacidad invasiva mejor para migrar *in vitro*, probablemente mediante la inducción de la expresión de *MMP2*, *MMP9* y *uPA*, como se ha observado en células de cáncer de próstata (Shukla et al., 2007). Estos efectos de silenciamiento de *PTEN* probablemente están mediados por la actividad de *Akt* ya que se ha demostrado que la activación aguas abajo de las rutas de señalización *Akt*-dependientes promueven la expresión de genes angiogénicos y metastásicos incluyendo *uPA*, *COX2*, *MMP2*, *MMP9* y la *osteopontina* (Agarwal et al., 2005; Shao et al., 2007). Sorprendentemente, en nuestro estudio se observó un incremento de la expresión del mRNA de *PTEN* en las células Caco-2 tratadas durante 6 semanas con 1 µg/mL de AgNPs. Aunque los estudios anteriormente narrados están relacionados con las Caco-2 diferenciadas, esperábamos una disminución de la expresión. No obstante, las características de célula transformada podrían no ser consecuencia de la transcripción, sino estar relacionados con factores post-transcripcionales o de localización celular. Sería necesario realizar estudios de Western Blot para ver si está sometido a regulación traduccional, y/o análisis de localización celular mediante inmunohistoquímica. De hecho, la transformación de los tejidos en el cáncer se asocia frecuentemente con la pérdida de polaridad de células y tejidos, aunque no se conocen

los mecanismos moleculares que subyacen a esta pérdida. Es probable que el proceso de transformación implique la alteración en la expresión de genes de polaridad y/o la localización subcelular de proteínas, lo que resultaría en la inactivación funcional de las vías de polaridad (Lee y Vasioukhin, 2008). En este aspecto, *PTEN* ha surgido recientemente como un factor determinante de la polaridad epitelial (Leslie et al., 2008). De hecho, el análisis en células primarias o en células en cultivo que aún retienen una significativa arquitectura celular y polaridad ha demostrado que *PTEN* se encuentra en sitios especializados, en particular, en los dominios apicales de las células epiteliales polarizadas. Esta polarización epitelial de *PTEN* se demostró inicialmente en *Drosophila* (von Stein et al., 2005; Pinal et al., 2006) y, posteriormente, en el epitelio de epiblasto del embrión de pollo (Leslie et al., 2007), así como en células polarizadas T84 y Caco-2 y células de riñón MDCK en cultivos 3D (Martin-Belmonte et al., 2007).

A pesar de lo dicho, las mutaciones en *PTEN* son poco frecuentes en los cánceres colorrectales (Wang et al., 1998; Shin et al., 2001; Zhou et al., 2002, Li et al., 2009), aunque se ha observado que la expresión de la proteína *PTEN* se reduce en este tipo de cánceres en aproximadamente un 60% de los pacientes estudiados, en base a herramientas de detección inmunohistoquímica (Jiang et al., 2003; Colakoglu et al., 2008; Li et al., 2009), lo que sugeriría que son frecuentes los mecanismos epigenéticos de regulación de *PTEN* en cánceres colorrectales (Zhou et al., 2002).

Por último, la angiogénesis es esencial para el crecimiento de la mayoría de los tumores primarios y su posterior metástasis. Tanto la angiogénesis fisiológica como la tumoral están reguladas por una serie de factores de crecimiento en el microambiente, algunos de los cuales, como el *VEGF*, son muy específicos para las células endoteliales, mientras que otros, como el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), tienen una gama mucho más amplia de acción. Los factores activadores pueden ser producidos por los propios tumores, por el tejido circundante o por la infiltración de macrófagos y fibroblastos (Rosen, 2002). Una vez iniciada, la angiogénesis tumoral no sólo permite el crecimiento del tumor primario, sino que los vasos sanguíneos nacientes también ofrecen una ruta para la diseminación metastásica de las células cancerosas individuales. *VEGF* media la secreción y la activación de las enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. Actuando sobre las células endoteliales, *VEGF* induce la expresión del activador de plasminógeno y su inhibidor (Pepper et al., 1991), la expresión del receptor de uroquinasa (Mandriota et al., 1995), y la expresión de la metaloproteinasas de la matriz de la colagenasa intersticial y la gelatinasa A, mientras que disminuye los niveles de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas 1 y 2 (Unemori et al., 1992; Lamoreaux et

al., 1998). La expresión del *VEGF* se incrementa en la mayoría de los cánceres examinados hasta la fecha, aunque sí que es cierto que es un gen que se encuentra aumentado en etapas muy avanzadas del cáncer, lo cual cuadra con el hecho de que no se haya encontrado un aumento en la expresión del mRNA de *VEGFA* en nuestra línea celular en nuestras condiciones de estudio.

Hasta la fecha, sólo un número de estudios limitado se ha centrado en la evaluación del potencial carcinogénico de los NMs manufacturados bajo exposiciones a largo plazo. Dado que la carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos que requiere la exposición a largo plazo, dicha información es necesaria para evaluar el potencial riesgo carcinogénico de los NMs, incluyendo las AgNPs. En este contexto, nuestros resultados *in vitro* con la línea celular Caco-2 expuesta a concentraciones subtóxicas de AgNPs han mostrado un aumento de la capacidad de crecimiento en *soft-agar*, también un aumento de la promoción de crecimiento de la línea tumoral HCT116 en este *soft-agar* inducido por el secretoma de las Caco-2 expuestas, un incremento de la capacidad migratoria y un aumento en la secreción de MMPs 2+9 tras tan sólo 6 semanas de exposición. En conjunto, todos ellos son sellos distintivos de transformación celular, con lo que se puede concluir que las AgNPs (NM300K) no son seguras en términos de carcinogénesis.

6. CONCLUSIONES

Siguiendo los objetivos planteados en este proyecto, los resultados obtenidos nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- En relación a los estudios de transporte de NMs desarrollados bajo el marco del proyecto europeo NANoREG:
 1. Se ha establecido un buen protocolo de diferenciación de las Caco-2, reproducible por todos los miembros del proyecto NANoREG. Para ello, ha sido necesario el uso del mismo clon de células Caco-2, el mismo lote de suero, limitar el número de pases y usar el mismo medio de cultivo.
 2. Ninguno de los NMs evaluados a concentraciones subtóxicas ha afectado la integridad y permeabilidad de la monocapa formada por las Caco-2 diferenciadas tras la exposición a 24 horas de los mismos.
 3. Es necesario mejorar la detección intracelular de los NMs en concentraciones bajas. El TEM ha resultado no ser una técnica útil y fiable para la detección de la internalización de los NMs en estas células diferenciadas ya que son muy granuladas. El uso de la microscopía confocal como alternativa ha dado resultados muy satisfactorios aunque tiene la inconveniencia de no poder distinguir NPs individuales ni formas, tamaños o composición. Por eso es necesario mejorar la técnica de detección cualitativa de los NMs.
 4. Es necesario mejorar el análisis del medio basolateral tras la exposición de las células. No se ha podido solventar el problema de la visualización por TEM de las NPs enmascaradas con las sales y proteínas del medio. La microscopía confocal, otra vez, con sus limitaciones, ha resultado ser una buena alternativa. El análisis cuantitativo por ICP-MS ha demostrado que la translocación de los NMs es inferior al límite de detección de la técnica por lo que es necesario también mejorar la detección química de concentraciones muy bajas de NMs. En global, el TEM-EDX, la microscopía confocal y el ICP-MS produjeron resultados que indican una limitada translocación de TiO_2NPs , ZnONPs y CeO_2NPs .
 5. Los NMs TiO_2NPs NM100, CeO_2NPs NM212 y AgNPs no producen daño genotóxico evaluable con el ensayo del cometa. Sin embargo, las AgNPs producen daño oxidativo en el DNA aunque este efecto sólo es significativo en la concentración más alta usada.

6. No se han encontrado cambios significativos en la expresión del mRNA de los genes *OCCLUDIN* y *CLAUDIN2* ni en *SI* y *SLC15A1*. Además, hemos confirmado la variabilidad de la expresión génica debida a la heterogeneidad de la población de células Caco-2.
- En cuanto a los estudios de larga exposición, después de 6 semanas de tratamiento con AgNPs:
1. Las células tratadas pasan por un tiempo de adaptación en el que las células se dividen más lentamente que el control, debido a la internalización de las NPs. Sin embargo a la sexta semana recuperan el ritmo de división del control.
 2. Las células Caco-2 expuestas durante 6 semanas a concentraciones subtóxicas de AgNPs adquieren la capacidad de crecer independientemente de anclaje en *soft-agar*. Del mismo modo, el secretoma de las células tratadas con la concentración más alta de AgNPs es capaz de promover el crecimiento en *soft-agar* de las células HCT116.
 3. La exposición durante 6 semanas a AgNPs indica que estas NPs son capaces de inducir incremento, aunque no significativo, de la secreción de MMPs 2 y 9 al medio, en condiciones de estrés.
 4. Al final del tratamiento, se observa un incremento en el número de células Caco-2 con capacidad migratoria.
 5. Finalmente, la exposición durante 6 semanas a AgNPs no conduce a cambios de expresión claros de los genes involucrados en EMT, adhesión celular, citoesqueleto o supresores de tumores.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adibi SA. *Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003; 285(5):G779-88.
- Agarwal A, Das K, Lerner N, Sathe S, Cicek M, Casey G, Sizemore N. *The AKT/ κ B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor- κ B and beta-catenin*. Oncogene. 2005; 24(6):1021-31.
- Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. *Nanocrystal targeting in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(20):12617-21.
- Annangi B, Bach J, Vales G, Rubio L, Marcos R, Hernández A. *Long-term exposures to low doses of cobalt nanoparticles induce cell transformation enhanced by oxidative damage*. Nanotoxicology. 2015; 9(2):138-47.
- Annangi B, Rubio L, Alaraby M, Bach J, Marcos R, Hernández A. *Acute and long-term in vitro effects of zinc oxide nanoparticles*. Arch Toxicol. 2016; 90(9):2201-13.
- Antunes F, Andrade F, Araújo F, Ferreira D, Sarmiento B. *Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs*. Eur J Pharm Biopharm. 2013; 83(3):427-35.
- Araújo F, Sarmiento B. *Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies*. Int J Pharm. 2013; 458(1):128-34.
- Artursson P. *Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells*. J Pharm Sci. 1990; 79(6):476-82.
- Artursson P, Palm K, Luthman K. *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. Adv Drug Deliv Rev. 2001; 46(1-3):27-43.

- Asare N, Duale N, Slagsvold HH, Lindeman B, Olsen AK, Gromadzka-Ostrowska J, Meczynska-Wielgosz S, Kruszewski M, Brunborg G, Instanes C. *Genotoxicity and gene expression modulation of silver and titanium dioxide nanoparticles in mice*. *Nanotoxicology*. 2016; 10(3):312-21.
- AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells*. *ACS Nano*. 2009; 3(2):279-90.
- Aude-Garcia C, Villiers F, Collin-Faure V, Pernet-Gallay K, Jouneau PH, Sorieul S, Mure G, Gerdil A, Herlin-Boime N, Carrière M, Rabilloud T. *Different in vitro exposure regimens of murine primary macrophages to silver nanoparticles induce different fates of nanoparticles and different toxicological and functional consequences*. *Nanotoxicology*. 2016; 10(5):586-96.
- Aueviriyavit S, Phummiratch D, Maniratanachote R. *Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells--induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles*. *Toxicol Lett*. 2014; 224(1):73-83.
- Ayres JG, Borm P, Cassee FR, Castranova V, Donaldson K, Ghio A, Harrison RM, Hider R, Kelly F, Kooter IM, Marano F, Maynard RL, Mudway I, Nel A, Sioutas C, Smith S, Baeza-Squiban A, Cho A, Duggan S, Froines J. *Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential--a workshop report and consensus statement*. *Inhal Toxicol*. 2008; 20(1):75-99.
- Baalousha M. *Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter*. *Sci Total Environ*. 2009; 407(6):2093-101.
- Bach J, Sampayo-Reyes A, Marcos R, Hernández A. *Ogg1 genetic background determines the genotoxic potential of environmentally relevant arsenic exposures*. *Arch Toxicol*. 2014; 88(3):585-96.

- Bach J, Peremartí J, Annangi B, Marcos R, Hernández A. *Reduced cellular DNA repair capacity after environmentally relevant arsenic exposure. Influence of Ogg1 deficiency.* Mutat Res. 2015; 779:144-51.
- Bach J, Peremartí J, Annangi B, Marcos R, Hernández A. *Oxidative DNA damage enhances the carcinogenic potential of in vitro chronic arsenic exposures.* Arch Toxicol. 2016; 90(8):1893-905.
- Baggs RB, Ferin J, Oberdörster G. *Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats.* Vet Pathol. 1997; 34(6):592-7.
- Ballestri M, Baraldi A, Gatti AM, Furci L, Bagni A, Loria P, Rapanà RM, Carulli N, Albertazzi A. *Liver and kidney foreign bodies granulomatosis in a patient with malocclusion, bruxism, and worn dental prostheses.* Gastroenterology. 2001; 121(5):1234-8.
- Barlow PG, Donaldson K, MacCallum J, Clouter A, Stone V. *Serum exposed to nanoparticle carbon black displays increased potential to induce macrophage migration.* Toxicol Lett. 2005; 155(3):397-401.
- Beaulieu JF, Quaroni A. *Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells.* Biochem J. 1991; 280 (Pt 3):599-608.
- Behrens I, Kissel T. *Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers?* Eur J Pharm Sci. 2003; 19(5):433-42.
- Behrens I, Kamm W, Dantzig AH, Kissel T. *Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin.* J Pharm Sci. 2004; 93(7):1743-54.
- Blundell G, Henderson WJ, Price EW. *Soil particles in the tissues of the foot in endemic elephantiasis of the lower legs.* Ann Trop Med Parasitol. 1989; 83(4):381-5.

- Böhmert L, Niemann B, Thünemann AF, Lampen A. *Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2*. Arch Toxicol. 2012; 86(7):1107-15.
- Böhmert L, Niemann B, Lichtenstein D, Juling S, Lampen A. *Molecular mechanism of silver nanoparticles in human intestinal cells*. Nanotoxicology. 2015; 9(7):852-60.
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC*. Part Fibre Toxicol. 2006; 14; 3:11.
- Bourseau-Guilmain E, Griveau A, Benoit JP, Garcion E. *The importance of the stem cell marker prominin-1/CD133 in the uptake of transferrin and in iron metabolism in human colon cancer Caco-2 cells*. PLoS One. 2011; 6(9):e25515.
- Bowen KA, Doan HQ, Zhou BP, Wang Q, Zhou Y, Rychahou PG, Evers BM. *PTEN loss induces epithelial--mesenchymal transition in human colon cancer cells*. Anticancer Res. 2009; 29(11):4439-49.
- Boyd M, Hansen M, Jensen TG, Perearnau A, Olsen AK, Bram LL, Bak M, Tommerup N, Olsen J, Troelsen JT. *Genome-wide analysis of CDX2 binding in intestinal epithelial cells (Caco-2)*. J Biol Chem. 2010; 285(33):25115-25.
- Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. *The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells*. Proc Soc Exp Biol Med. 1997; 214(3):248-57.
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V. *Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004; 286(2):L344-53.
- Buseck PR, Pósfai M. *Airborne minerals and related aerosol particles: effects on climate and the environment*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(7):3372-9.

- Buzea C, Pacheco II, Robbie K. *Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity*. Biointerphases. 2007; 2(4):MR17-71.
- Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract*. 2015; 211(8):557-69.
- Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. *Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species*. *J Phys Chem B*. 2008; 112(43):13608-19.
- Cassee FR, Muijser H, Duistermaat E, Freijer JJ, Geerse KB, Marijnissen JC, Arts JH. *Particle size-dependent total mass deposition in lungs determines inhalation toxicity of cadmium chloride aerosols in rats. Application of a multiple path dosimetry model*. *Arch Toxicol*. 2002; 76(5-6):277-86.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. *Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines*. *Cancer Res*. 1988; 48(7):1936-42.
- Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M. *Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation*. *J Cell Sci*. 1994; 107 (Pt 1):213-25.
- Cheng MW, Chegeni M, Kim KH, Zhang G, Benmoussa M, Quezada-Calvillo R, Nichols BL, Hamaker BR. *Different sucrose-isomaltase response of Caco-2 cells to glucose and maltose suggests dietary maltose sensing*. *J Clin Biochem Nutr*. 2014; 54(1):55-60.
- Cheung TS, Lau PM, Lu H, Ho HP, Lui PPY, Kong SK. *Cytotoxic and sublethal effects of silver nanoparticles on tendon-derived stem cells – implications for tendon engineering*. *Toxicol. Res*. 2016; 5:318-330.
- Cho EC, Zhang Q, Xia Y. *The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles*. *Nat Nanotechnol*. 2011; 6(6):385-91.

- Coccini T, Manzo L, Bellotti V, De Simone U. *Assessment of cellular responses after short- and long-term exposure to silver nanoparticles in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and astrocytoma (D384) cells.* ScientificWorldJournal. 2014; 2014:259765.
- Cohen J, Deloid G, Pyrgiotakis G, Demokritou P. *Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry.* Nanotoxicology. 2013; 7(4):417-31.
- Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Ezer A, Noyan T, Karakayali H, Haberal M. *Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence?* Am J Surg. 2008; 195(6):719-25.
- Comfort KK, Braydich-Stolle LK, Maurer EI, Hussain SM. *Less is more: long-term in vitro exposure to low levels of silver nanoparticles provides new insights for nanomaterial evaluation.* ACS Nano. 2014; 8(4):3260-71.
- Corachán M. *Endemic non-filarial elephantiasis of the lower limbs: podoconiosis.* Med Clin (Barc). 1988; 91(3):97-100.
- Corachan M, Tura JM, Campo E, Soley M, Traveria A. *Podoconiosis in Aequatorial Guinea. Report of two cases from different geological environments.* Trop Geogr Med. 1988; 40(4):359-64.
- Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H. *Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells.* Toxicol Lett. 2005; 155(1):73-85.
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. *Colorectal cancer.* Lancet. 2010; 375(9719):1030-47.
- Dalmaso G, Nguyen HT, Yan Y, Laroui H, Charania MA, Obertone TS, Sitaraman SV, Merlin D. *MicroRNA-92b regulates expression of the oligopeptide transporter PepT1 in intestinal epithelial cells.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011; 300(1):G52-9.

- De Craene B, Berx G. *Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression*. Nat Rev Cancer. 2013; 13(2):97-110.
- DEFRA. *Characterizing the potential risk posed by engineered nanoparticles*. Department of Environment, Food and Rural Affairs, UK; 2007. p. 91. <http://www.defra.gov.uk/publications/files/pb12901-nanoparticles-riskreport-071218.pdf>
- Delie F, Rubas W. *A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1997; 14(3):221-86.
- *Deliverable D-5.03 NANoREG*. 2016. Unpublished.
- Demir E, Vales G, Kaya B, Creus A, Marcos R. *Genotoxic analysis of silver nanoparticles in Drosophila*. Nanotoxicology. 2011; 5(3):417-24.
- Des Rieux A, Fievez V, Théate I, Mast J, Pr at V, Schneider YJ. *An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells*. Eur J Pharm Sci. 2007; 30(5):380-91.
- Drake PL, Hazelwood KJ. *Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review*. Ann Occup Hyg. 2005; 49(7):575-85.
- Dubey P, Matai I, Kumar SU, Sachdev A, Bhushan B, Gopinath P. *Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials*. Adv Colloid Interface Sci. 2015; 221:4-21.
- ECVAM DB_ALM protocols n.142. *Permeability Assay on Caco-2 cells*.
- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. *Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system*. Environ Health Perspect. 2006; 114(8):1172-8.
- Engle MJ, Goetz GS, Alpers DH. *Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes*. J Cell Physiol. 1998; 174(3):362-9.

- Eom HJ, Choi J. *p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells*. Environ Sci Technol. 2010; 44(21):8337-42.
- EPA (Environmental Protection Agency, Office of Research and Development). 2004. *Air quality Criteria for Particulate Matter*. Vol. 3 600/P-95-001cF.
- Fang W, Fu C, Chen X, Mou X, Liu F, Qian J, Zhao P, Zheng Y, Zheng YI, Deng J, Ye P, Wang Y, Zheng S. *Neurokinin-2 receptor polymorphism predicts lymph node metastasis in colorectal cancer patients*. Oncol Lett. 2015; 9(5):2003-2006.
- FDA (Food and Drug Administration). Nanotechnology Task Force Report 2007.
- Ferin J. *Pulmonary retention and clearance of particles*. Toxicol Lett. 1994; 72(1-3):121-5.
- Ferin J, Oberdörster G, Penney DP. *Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats*. Am J Respir Cell Mol Biol. 1992; 6(5):535-42.
- Ferreira T, Rasband W. *ImageJ User Guide*. IJ 1.46r. 2012. <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>
- Foldbjerg R, Irving ES, Hayashi Y, Sutherland DS, Thorsen K, Autrup H, Beer C. *Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure to nanosilver*. Toxicol Sci. 2012; 130(1):145-57.
- Franke WW, Grund C, Kuhn C, Jackson BW, Illmensee K. *Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments*. Differentiation. 1982; 23(1):43-59.
- Gartia M.R., Hsiao A., Pokhriyal A., Seo S., Kulsharova G., Cunningham B.T., Bond T.C., Liu G.L. *Colorimetric plasmon resonance imaging using nanolycurgus cup arrays*. Adv. Opt. Mater. 2013. 1,68-76.
- Geissmann Q. *OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects*. PLoS One. 2013; 8(2):e54072.

- Gerloff K, Pereira DI, Faria N, Boots AW, Kolling J, Förster I, Albrecht C, Powell JJ, Schins RP. *Influence of simulated gastrointestinal conditions on particle-induced cytotoxicity and interleukin-8 regulation in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells*. *Nanotoxicology*. 2013; 7(4):353-66.
- Gilles C, Polette M, Piette J, Delvigne AC, Thompson EW, Foidart JM, Birembaut P. *Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential*. *J Pathol*. 1996; 180(2):175-80.
- Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P, Foidart JM. *Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells*. *Cancer Res*. 2003; 63(10):2658-64.
- Guarino M, Rubino B, Ballabio G. *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*. *Pathology*. 2007; 39(3):305-18.
- Gumbiner BM. *Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(8):622-34.
- Haier J, Nicolson GL. *PTEN regulates tumor cell adhesion of colon carcinoma cells under dynamic conditions of fluid flow*. *Oncogene*. 2002; 21(9):1450-60.
- Hamburger AW, Salmon SE. *Primary bioassay of human tumor stem cells*. *Science*. 1977; 197(4302):461-3.
- Hamilton RF, Buckingham S, Holian A. *The effect of size on Ag nanosphere toxicity in macrophage cell models and lung epithelial cell lines is dependent on particle dissolution*. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(4):6815-30.
- Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*. 2011; 144(5):646-74.
- Hansen SF, Larsen BH, Olsen SI, Baun A. *Categorization framework to aid hazard Identification of nanomaterials*. *Nanotoxicology*. 2009; 1(3):243-250.

- Harris DS, Slot JW, Geuze HJ, James DE. *Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89(16):7556-60.
- Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA. *The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(50):18969-74.
- Hay ED. *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. Dev Dyn. 2005; 233(3):706-20.
- He K, Cui B, Li G, Wang H, Jin K, Teng L. *The effect of anti-VEGF drugs (bevacizumab and aflibercept) on the survival of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC)*. Onco Targets Ther. 2012; 5:59-65.
- Hendren CO, Mesnard X, Dröge J, Wiesner MR. *Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment*. Environ Sci Technol. 2011; 45(7):2562-9.
- Heng BC, Zhao X, Xiong S, Ng KW, Boey FY, Loo JS. *Cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles is influenced by cell density and culture format*. Arch Toxicol. 2011; 85(6):695-704.
- Hetland RB, Cassee FR, Refsnes M, Schwarze PE, Låg M, Boere AJ, Dybing E. *Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions*. Toxicol In Vitro. 2004; 18(2):203-12.
- Heyder J, Takenaka S. *Long-term canine exposure studies with ambient air pollutants*. Eur Respir J. 1996; 9(3):571-84.
- Hidalgo IJ, Li J. *Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in Caco-2 cells*. Adv Drug Deliv Rev. 1996; 22:53-66.
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology. 1989; 96(3):736-49.

- Higgins DA, Park SC, Tran-Ba KH, Ito T. *Single-Molecule Investigations of Morphology and Mass Transport Dynamics in Nanostructured Materials*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif). 2015; 8:193-216.
- Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. *Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa*. Pharm Res. 1990; 7(9):902-10.
- Hoet PH, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. *Nanoparticles - known and unknown health risks*. J Nanobiotechnology. 2004; 2(1):12.
- Hosoya KI, Kim KJ, Lee VH. *Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers*. Pharm Res. 1996; 13(6):885-90.
- Hristozov DR, Gottardo S, Critto A, Marcomini A. *Risk assessment of engineered nanomaterials: a review of available data and approaches from a regulatory perspective*. Nanotoxicology. 2012; 6:880-98.
- Huang M, Khor E, Lim LY. *Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation*. Pharm Res. 2004; 21(2):344-53.
- Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW. *Nanotechnology: History and future*. Hum Exp Toxicol. 2015; 34(12):1318-21.
- IRSAL (Instituto Riojano de la Salud). *La seguridad y salud en la exposición a nanopartículas*. 2011.
http://www.larioja.org/relaciones-laborales/es/irsal/publicaciones/novedades-publicaciones.ficheros/647122-557016_NANOPARTICULAS.pdf
- Jani P1, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. *Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency*. J Pharm Pharmacol. 1990; 42(12):821-6.
- Jiang X, Miclăuș T, Wang L, Foldbjerg R, Sutherland DS, Autrup H, Chen C, Beer C. *Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity*. Nanotoxicology. 2015; 9(2):181-9.

- Jiang YA, Fan LF, Jiang CQ, Zhang YY, Luo HS, Tang ZJ, Xia D, Wang M. *Expression and significance of PTEN, hypoxia-inducible factor-1 alpha in colorectal adenoma and adenocarcinoma*. World J Gastroenterol. 2003; 9(3):491-4.
- Joshi G, Kumar A, Sawant K. *Bioavailability enhancement, Caco-2 cells uptake and intestinal transport of orally administered lopinavir-loaded PLGA nanoparticles*. Drug Deliv. 2016; 22:1-13.
- Kalluri R, Neilson EG. *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest. 2003; 112(12):1776-84.
- Kang Y, Pantel K. *Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients*. Cancer Cell. 2013; 23(5):573-81.
- Kawata K, Osawa M, Okabe S. *In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells*. Environ Sci Technol. 2009; 43(15):6046-51.
- Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S. *Global life cycle releases of engineered nanomaterials*. J. Nanopart. Res. 2013; 15: 1692.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell. 2010; 141(1):52-67.
- Kim YJ, Yang SI, Ryu JC. *Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines*. Mol. Cell Toxicol. 2010; 6:119-25.
- Koeneman BA, Zhang Y, Westerhoff P, Chen Y, Crittenden JC, Capco DG. *Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide*. Cell Biol Toxicol. 2010; 26(3):225-38.
- Koliijn K, Verhoef EI, van Leenders GJ. *Morphological and immunohistochemical identification of epithelial-to-mesenchymal transition in clinical prostate cancer*. Oncotarget. 2015; 6(27):24488-98.

- Kovvuru P, Mancilla PE, Shirode AB, Murray TM, Begley TJ, Reliene R. *Oral ingestion of silver nanoparticles induces genomic instability and DNA damage in multiple tissues*. *Nanotoxicology*. 2015; 9(2):162-71.
- Kreuter J. *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 47(1):65-81.
- Kreuter J. *Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain*. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004; 4(5):484-8.
- Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ränge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, Alyautdin R. *Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier*. *J Drug Target*. 2002; 10(4):317-25.
- Kreyling WG, Scheuch G. *Chapter 7: Clearance of Particles Deposited in the Lungs. Particle-Lung Interactions*. CRC Press. 2000; 323-376.
- Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Möller W. *Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles*. *Acc Chem Res*. 2013; 46(3):714-22.
- Kroepil F, Fluegen G, Totikov Z, Baldus SE, Vay C, Schauer M, Topp SA, Esch JS, Knoefel WT, Stoecklein NH. *Down-regulation of CDH1 is associated with expression of SNAI1 in colorectal adenomas*. *PLoS One*. 2012; 7(9):e46665.
- Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. *Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999; 12(5):247-56.
- Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. *Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro*. *Microvasc Res*. 1998; 55(1):29-42.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(3):178-96.

- Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. *Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers*. Mutat Res. 2009; 681(2-3):241-58.
- Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, Hahn D, Schnekenburger J, Wiench K, Wohlleben W. *Testing metal-oxide nanomaterials for human safety*. Adv Mater. 2010; 22(24):2601-27.
- Langlois MJ, Bergeron S, Bernatchez G, Boudreau F, Saucier C, Perreault N, Carrier JC, Rivard N. *The PTEN phosphatase controls intestinal epithelial cell polarity and barrier function: role in colorectal cancer progression*. PLoS One. 2010; 5(12):e15742.
- Le Gall M, Tobin V, Stolarczyk E, Dalet V, Leturque A, Brot-Laroche E. *Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism*. J Cell Physiol. 2007; 213(3):834-43.
- Lee M, Vasioukhin V. *Cell polarity and cancer--cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor*. J Cell Sci. 2008; 121(Pt 8):1141-50.
- Leslie NR, Yang X, Downes CP, Weijer CJ. *PtdIns(3,4,5)P(3)-dependent and -independent roles for PTEN in the control of cell migration*. Curr Biol. 2007; 17(2):115-25.
- Leslie NR, Batty IH, Maccario H, Davidson L, Downes CP. *Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability*. Oncogene. 2008; 27(41):5464-76.
- Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. *Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations*. J Cell Sci. 1993; 106 (Pt 3):771-83.
- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. *N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells*. Cancer Res. 2001; 61(9):3819-25.

- Li XH, Zheng HC, Takahashi H, Masuda S, Yang XH, Takano Y. *PTEN expression and mutation in colorectal carcinomas*. *Oncol Rep*. 2009; 22(4):757-64.
- Li W, Chang J, Wang S, Liu X, Peng J, Huang D, Sun M, Chen Z, Zhang W, Guo W, Li J. *miRNA-99b-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR*. *Oncotarget*. 2015; 6(27):24448-62.
- Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinink A, Stark WJ. *Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress*. *Environ Sci Technol*. 2007; 41(11):4158-63.
- Limbach LK, Bereiter R, Müller E, Krebs R, Galli R, Stark WJ. *Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency*. *Environ Sci Technol*. 2008; 42(15):5828-33.
- Linak WP1, Miller CA, Wendt JO. *Comparison of particle size distributions and elemental partitioning from the combustion of pulverized coal and residual fuel oil*. *J Air Waste Manag Assoc*. 2000; 50(8):1532-44.
- Lindsey S, Langhans SA. *Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition*. *Front Oncol*. 2014; 4:358.
- Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, Cui L, Zhou QF, Yan B, Jiang GB. *Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size*. *Nanotoxicology*. 2010; 4(3):319-30.
- Lomer MC, Hutchinson C, Volkert S, Greenfield SM, Catterall A, Thompson RP, Powell JJ. *Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease*. *Br J Nutr*. 2004; 92(6):947-55.
- Lu S, Gough AW, Bobrowski WF, Stewart BH. *Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes*. *J Pharm Sci*. 1996; 85(3):270-3.

- Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. *Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles.* Nanotoxicology. 2014; 8(3):233-78.
- Mahler GJ, Shuler ML, Glahn RP. *Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability.* J Nutr Biochem. 2009; 20(7):494-502.
- Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P, Pepper MS. *Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells.* J Biol Chem. 1995; 270(17):9709-16.
- Mariadason JM, Arango D, Corner GA, Arañes MJ, Hotchkiss KA, Yang W, Augenlicht LH. *A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro.* Cancer Res. 2002; 62(16):4791-804.
- Markov AG, Aschenbach JR, Amasheh S. *Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function.* IUBMB Life. 2015; 67(1):29-35.
- Martin TA, Jiang WG. *Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis.* Biochim Biophys Acta. 2009; 1788(4):872-91.
- Martin TA, Mason MD, Jiang WG. *Tight junctions in cancer metastasis.* Front Biosci (Landmark Ed). 2011; 16:898-936.
- Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V, Mostov K. *PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42.* Cell. 2007; 128(2):383-97.
- Mathias RA, Gopal SK, Simpson RJ. *Contribution of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to the tumour microenvironment.* J Proteomics. 2013; 78:545-57.
- Matsumoto H, Erickson RH, Gum JR, Yoshioka M, Gum E, Kim YS. *Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2.* Gastroenterology. 1990; 98(5 Pt 1):1199-207.

- Matsumoto S, Saito H, Inui K. *Transport characteristics of ceftibuten, a new cephalosporin antibiotic, via the apical H⁺/dipeptide cotransport system in human intestinal cell line Caco-2: regulation by cell growth*. Pharm Res. 1995; 12(10):1483-7.
- Matzke M, Jurkschat K, Backhaus T. *Toxicity of differently sized and coated silver nanoparticles to the bacterium Pseudomonas putida: risks for the aquatic environment?* Ecotoxicology. 2014; 23(5):818-29.
- Maynard, A.; Michelson, E. S. *The Nanotechnology Consumer Products Inventory*; Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2006.
- McCoy EL, Iwanaga R, Jedlicka P, Abbey NS, Chodosh LA, Heichman KA, Welm AL, Ford HL. *Six1 expands the mouse mammary epithelial stem/progenitor cell pool and induces mammary tumors that undergo epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest. 2009; 119(9):2663-77.
- McInroy L, Määttä A. *Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion*. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 360(1):109-14.
- Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition*. FASEB J. 2010; 24(6):1838-51.
- Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE. *Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes*. Toxicol Lett. 2005; 155(3):377-84.
- Nakano T, Inoue I, Alpers DH, Akiba Y, Katayama S, Shinozaki R, Kaunitz JD, Ohshima S, Akita M, Takahashi S, Koyama I, Matsushita M, Komoda T. *Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009; 297(1):G207-14.
- Nakashima T, Huang C, Liu D, Kameyama K, Masuya D, Kobayashi S, Kinoshita M, Yokomise H. *Neural-cadherin expression associated with angiogenesis in non-small-cell lung cancer patients*. Br J Cancer. 2003; 88(11):1727-33.

- Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. Nat Mater. 2009; 8(7):543-57.
- Nguyen T, Mège RM. *N-Cadherin and Fibroblast Growth Factor Receptors crosstalk in the control of developmental and cancer cell migrations*. Eur J Cell Biol. 2016; 6. pii: S0171-9335(16)30083-8.
- NIOSH. *Strategic Plan for Nanotechnology Research and Guidance*. 2009.
- NNI (National Nanotechnology Initiative). <http://www.nano.gov/nanotech-101/what>
- Nowack B, Krug HF, Height M. *120 years of nanosilver history: implications for policy makers*. Environ Sci Technol. 2011; 45(4):1177-83.
- NTP 797. *Riesgos asociados a la nanotecnología*. INSHT.
- Oberdorster G. *Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles*. Inhal Toxicol. 1996; 8 Suppl: 73-89.
- Oberdörster G. *Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles*. Int Arch Occup Environ Health. 2001; 74(1):1-8.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. *Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain*. Inhal Toxicol. 2004; 16(6-7):437-45.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect. 2005; 113(7):823-39.
- Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A. *Nanoparticles and the brain: cause for concern?*. J Nanosci Nanotechnol. 2009; 9(8):4996-5007.

- Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A, Nieto MA. *Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1*. Cancer Cell. 2012; 22(6):709-24.
- Oh SY, Kim DY, Suh KW. *Oncologic outcomes following metastasectomy in colorectal cancer patients developing distant metastases after initial treatment*. Ann Surg Treat Res. 2015; 88(5):253-9.
- Ohno H. *Intestinal M cells*. J Biochem. 2016; 159(2):151-60.
- Olsen L, Bressendorff S, Troelsen JT, Olsen J. *Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005; 289(2):G220-6.
- Oum'hamed Z, Garnotel R, Josset Y, Trenteseaux C, Laurent-Maquin D. *Matrix metalloproteinases MMP-2, -9 and tissue inhibitors TIMP-1, -2 expression and secretion by primary human osteoblast cells in response to titanium, zirconia, and alumina ceramics*. J Biomed Mater Res A. 2004; 68(1):114-22.
- Ouzilou L, Caliot E, Pelletier I, Prévost MC, Pringault E, Colbère-Garapin F. *Poliovirus transcytosis through M-like cells*. J Gen Virol. 2002; 83(Pt 9):2177-82.
- Pardali K, Moustakas A. *Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer*. Biochim Biophys Acta. 2007; 1775(1):21-62.
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC. *The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system*. Immunol Rev. 2014; 260(1):8-20.
- Peña C, García JM, Larriba MJ, Barderas R, Gómez I, Herrera M, García V, Silva J, Domínguez G, Rodríguez R, Cuevas J, de Herreros AG, Casal JI, Muñoz A, Bonilla F. *SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue*. Oncogene. 2009; 28(49):4375-85.

- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 181(2):902-6.
- Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Schulz H. *Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update*. *Part Fibre Toxicol*. 2006; 3:13.
- Pi J, He Y, Bortner C, Huang J, Liu J, Zhou T, Qu W, North SL, Kasprzak KS, Diwan BA, Chignell CF, Waalkes MP. *Low level, long-term inorganic arsenite exposure causes generalized resistance to apoptosis in cultured human keratinocytes: potential role in skin co-carcinogenesis*. *Int J Cancer*. 2005; 116(1):20-6.
- Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW. *Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis*. *Toxicol Lett*. 2011; 201(1):92-100.
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. *Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world*. *J. Nanopart. Res*. 2012; 14:1109.
- Pinal N, Goberdhan DC, Collinson L, Fujita Y, Cox IM, Wilson C, Pichaud F. *Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P3 accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells*. *Curr Biol*. 2006; 16(2):140-9.
- Pinto M, Robineleon S, Appay MD, Kedingler M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simonassmann P, Haffen K, Fogh J, Robineleon S, Robine-Leon S, Simon-Assmann P, Robine-Léon S, Robin-Leon S, Simon-Assman P, Robine Leon S, Zwwibaum A, Zweibaum A, Simon-Assmami P. *Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell-line (Caco-2) in culture*. *Biol Cell*. 1983; 47:323-30.

- Piret JP, Vankoningsloo S, Mejia J, Noël F, Boilan E, Lambinon F, Zouboulis CC, Masereel B, Lucas S, Saout C, Toussaint O. *Differential toxicity of copper (II) oxide nanoparticles of similar hydrodynamic diameter on human differentiated intestinal Caco-2 cell monolayers is correlated in part to copper release and shape*. *Nanotoxicology*. 2012; 6(7):789-803.
- Polyak K, Weinberg RA. *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4):265-73.
- Porter KR, Claude A, Fullam EF. *A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations*. *J Exp Med*. 1945; 81(3):233-46.
- Prieto P, Hoffmann S, Tirelli V, Tancredi F, González I, Bermejo M, De Angelis I. *An exploratory study of two Caco-2 cell models for oral absorption: a report on their within-laboratory and between-laboratory variability, and their predictive capacity*. *Altern Lab Anim*. 2010; 38(5):367-86.
- Prieto P, Kinsner-Ovaskainen A, Stanzel S, Albella B, Artursson P, Campillo N, Cecchelli R, Cerrato L, Díaz L, Di Consiglio E, Guerra A, Gombau L, Herrera G, Honegger P, Landry C, O'Connor JE, Páez JA, Quintas G, Svensson R, Turco L, Zurich MG, Zurbano MJ, Kopp-Schneider A. *The value of selected in vitro and in silico methods to predict acute oral toxicity in a regulatory context: results from the European Project ACuteTox*. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27(4):1357-76.
- Quadros ME, Marr LC. *Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles*. *J Air Waste Manag Assoc*. 2010; 60(7):770-81.
- Ramage L, Guy K. *Expression of C-reactive protein and heat-shock protein-70 in the lung epithelial cell line A549, in response to PM10 exposure*. *Inhal Toxicol*. 2004; 16(6-7):447-52.
- Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. *Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain*. *J Agric Food Chem*. 2011; 59(8):3485-98.

- Rieger-Christ KM, Lee P, Zaghera R, Kosakowski M, Moizadeh A, Stoffel J, Ben-Ze'ev A, Libertino JA, Summerhayes IC. *Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway*. *Oncogene*. 2004 23(27):4745-53.
- Rogers F, Arnott P, Zielinska B, Sagebiel J, Kelly KE, Wagner D, Lighty JS, Sarofim AF. *Real-time measurements of jet aircraft engine exhaust*. *J Air Waste Manag Assoc*. 2005; 55(5):583-93.
- Rosen LS. *Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers*. *Cancer Control*. 2002; 9(2 Suppl):36-44.
- Rychahou PG, Kang J, Gulhati P, Doan HQ, Chen LA, Xiao SY, Chung DH, Evers BM. *Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(51):20315-20.
- Sääf AM, Halbleib JM, Chen X, Yuen ST, Leung SY, Nelson WJ, Brown PO. *Parallels between global transcriptional programs of polarizing Caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer*. *Mol Biol Cell*. 2007; 18(11):4245-60.
- Sahu SC, Zheng J, Graham L, Chen L, Ihrle J, Yourick JJ, Sprando RL. *Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells in culture*. *J Appl Toxicol*. 2014; 34(11):1155-66.
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. *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*. 2005; 21(1):1-26.
- Satelli A, Li S. *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(18):3033-46.
- Schimpel C, Teubl B, Absenger M, Meindl C, Fröhlich E, Leitinger G, Zimmer A, Roblegg E. *Development of an advanced intestinal in vitro triple culture*

- permeability model to study transport of nanoparticles*. Mol Pharm. 2014; 11(3):808-18.
- Schlesinger RB, Ben-Jebria A, Dahl AR, Snipes MB, Ultman J. *Disposition of inhaled toxicants*. Handbook of Human Toxicology. CRC Press. 1977; 493-550.
 - Seames WS, Fernandez A, Wendt JO. *A study of fine particulate emissions from combustion of treated pulverized municipal sewage sludge*. Environ Sci Technol. 2002; 36(12):2772-6.
 - Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. *Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption*. Biotechnol Prog. 2006; 22(1):186-98.
 - Shao J, Washington MK, Saxena R, Sheng H. *Heterozygous disruption of the PTEN promotes intestinal neoplasia in APC^{min/+} mouse: roles of osteopontin*. Carcinogenesis. 2007; 28(12):2476-83.
 - Shin KH, Park YJ, Park JG. *PTEN gene mutations in colorectal cancers displaying microsatellite instability*. Cancer Lett. 2001; 174(2):189-94.
 - Shioiri M, Shida T, Koda K, Oda K, Seike K, Nishimura M, Takano S, Miyazaki M. *Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients*. Br J Cancer. 2006; 94(12):1816-22.
 - Shukla S, Maclennan GT, Hartman DJ, Fu P, Resnick MI, Gupta S. *Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion*. Int J Cancer. 2007; 121(7):1424-32.
 - Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TG, Wright CJ, Doak SH. *NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. Biomaterials. 2009; 30(23-24):3891-914.
 - Sioutas C, Delfino RJ, Singh M. *Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research*. Environ Health Perspect. 2005; 113(8):947-55.

- Smita S, Gupta SK, Bartonova A, Dusinska M, Gutleb AC, Rahman Q. *Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach*. Environ Health. 2012; 11 Suppl 1:S13.
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Biotechniques. 2005; 38(1):73-83.
- Sommers CL, Walker-Jones D, Heckford SE, Worland P, Valverius E, Clark R, McCormick F, Stampfer M, Abularach S, Gelmann EP. *Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells*. Cancer Res. 1989; 49(15):4258-63.
- Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, Thompson EW, Byers SW, Gelmann EP. *Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines*. Cancer Res. 1992; 52(19):5190-7.
- Song Y, Guan R, Lyu F, Kang T, Wu Y, Chen X. *In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells*. Mutat Res. 2014; 769:113-8.
- Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. *Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(1):364-8.
- Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ. *Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 24(2):108-15.
- Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, Ouatas T, Pluk H, Jespersen S, Vogels J, Verhoeckx K, Groten J, van Ommen B. *Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2*. Biochim Biophys Acta. 2003; 1650(1-2):73-91.

- Stone V, Tuinman M, Vamvakopoulos JE, Shaw J, Brown D, Petterson S, Faux SP, Borm P, MacNee W, Michaelangeli F, Donaldson K. *Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black*. Eur Respir J. 2000; 15(2):297-303.
- Stone V, Nowack B, Baun A, van den Brink N, Kammer Fv, Dusinska M, Handy R, Hankin S, Hassellöv M, Joner E, Fernandes TF. *Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation*. Sci Total Environ. 2010; 408(7):1745-54.
- Sun Y, Kojima C, Chignell C, Mason R, Waalkes MP. *Arsenic transformation predisposes human skin keratinocytes to UV-induced DNA damage yet enhances their survival apparently by diminishing oxidant response*. Toxicol Appl Pharmacol. 2011; 255(3):242-50.
- Sun C, Deng Y, Zhou H, Hu ZQ. *Risk factors for the development of metachronous bone metastasis in colorectal cancer patients after curative resection*. Int J Surg. 2015; 21:145-9.
- Taeger J, Moser C, Hellerbrand C, Mycielska ME, Glockzin G, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O, Lang SA. *Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis, and metastasis by effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes in pancreatic cancer*. Mol Cancer Ther. 2011; 10(11):2157-67.
- Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J. *Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats*. Environ Health Perspect. 2001; 109 Suppl 4:547-51.
- Tang PA, Moore MJ. *Aflibercept in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer: latest findings and interpretations*. Therap Adv Gastroenterol. 2013; 6(6):459-73.
- Tariq M, Alam MA, Singh AT, Panda AK, Talegaonkar S. *Surface decorated nanoparticles as surrogate carriers for improved transport and absorption of epirubicin across the gastrointestinal tract: Pharmacokinetic and pharmacodynamic investigations*. Int J Pharm. 2016; 501(1-2):18-31.

- Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, Hollier BG, Ram PT, Lander ES, Rosen JM, Weinberg RA, Mani SA. *Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(35):15449-54.
- Taylor DA. *Dust in the wind*. Environ Health Perspect. 2002; 110(2):A80-7.
- Thenappan A, Li Y, Shetty K, Johnson L, Reddy EP, Mishra L. *New Therapeutics Targeting Colon Cancer Stem Cells*. Curr Colorectal Cancer Rep. 2009; 5(4):209.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell. 2009; 139(5):871-90.
- Thomas T, Bahadori T, Savage N, Thomas K. *Moving toward exposure and risk evaluation of nanomaterials: challenges and future directions*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2009; 1(4):426-33.
- Thompson EW, Haviv I. *The social aspects of EMT-MET plasticity*. Nat Med. 2011; 17(9):1048-9.
- Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ. *Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease*. Environ Health Perspect. 2003; 111(9):1202-8.
- Tiwari DK, Jin T, Behari J. *Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats*. Toxicol Mech Methods. 2011; 21(1):13-24.
- Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. *Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles*. J Invest Dermatol. 2004; 123(1):168-76.
- Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. *The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach*. Anticancer Res. 2008; 28(6A):3815-26.

- Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, Santamaria AB. *Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles*. Toxicol Sci. 2006; 89(1):42-50.
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. *Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells*. J Cell Physiol. 1992; 153(3):557-62.
- Vachon PH, Beaulieu JF. *Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line*. Gastroenterology. 1992; 103(2):414-23.
- Vachon PH, Perreault N, Magny P, Beaulieu JF. *Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes*. J Cell Physiol. 1996; 166(1):198-207.
- Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. *Colorectal cancer stem cells*. Stem Cells. 2012; 30(3):363-71.
- Vales G, Demir E, Kaya B, Creus A, Marcos R. *Genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions in Drosophila*. Nanotoxicology. 2013; 7(4):462-8.
- Vales G, Rubio L, Marcos R. *Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells*. Nanotoxicology. 2015; 9(5):568-78.
- Vales G, Rubio L, Marcos R. *Genotoxic and cell-transformation effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) following in vitro sub-chronic exposures*. J Hazard Mater. 2016; 306:193-202.
- Van Beers EH, Al RH, Rings EH, Einerhand AW, Dekker J, Büller HA. *Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation*. Biochem J. 1995; 308 (Pt 3):769-75.
- Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF Jr, Rejeski D, Hull MS. *Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*. Beilstein J Nanotechnol. 2015; 6:1769-80.

- Vanhecke D, Rodriguez-Lorenzo L, Clift MJ, Blank F, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. *Quantification of nanoparticles at the single-cell level: an overview about state-of-the-art techniques and their limitations*. *Nanomedicine (Lond)*. 2014; 9(12):1885-900.
- Vella LJ. *The emerging role of exosomes in epithelial-mesenchymal-transition in cancer*. *Front Oncol*. 2014; 4:361.
- Vila L, Rubio L, Annangi B, García-Rodríguez A, Marcos R, Hernández A. *Frozen dispersions of nanomaterials are a useful operational procedure in nanotoxicology*. Not yet published.
- Visse R, Nagase H. *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. *Circ Res*. 2003; 92(8):827-39.
- Von Stein W, Ramrath A, Grimm A, Müller-Borg M, Wodarz A. *Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling*. *Development*. 2005; 132(7):1675-86.
- Walter E, Kissel T. *Transepithelial transport and metabolism of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): evidence for an active transport component?* *Pharm Res*. 1994; 11(11):1575-80.
- Walter E, Kissel T. *Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport*. *Eur J Pharm Sci*. 1995; 3:215-30.
- Wang ZJ, Taylor F, Churchman M, Norbury G, Tomlinson I. *Genetic pathways of colorectal carcinogenesis rarely involve the PTEN and LKB1 genes outside the inherited hamartoma syndromes*. *Am J Pathol*. 1998; 153(2):363-6.
- Wang Z, Wade P, Mandell KJ, Akyildiz A, Parkos CA, Mrsny RJ, Nusrat A. *Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug*. *Oncogene*. 2007; 26(8):1222-30.
- Warheit DB. *Nanoparticles: Health impacts?*. *Materials Today*. 2004; 7:32-35.

- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. *Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats*. Toxicol Sci. 2004; 77(1):117-25.
- Whiteman EL, Liu CJ, Fearon ER, Margolis B. *The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes*. Oncogene. 2008; 27(27):3875-9.
- Wilkesman J, Kurz L. *Advances in zymography techniques and patents regarding protease analysis*. Recent Pat Biotechnol. 2012; 6(2):106-14.
- Williams D., Carter C.B. *The transmission electron microscope. Transmission electron microscopy*. Springer US. 1996; pp 3-17.
- Wilson G, Hassan IF, Dix CJ, Williamson I, Shah R, Mackay M, Artursson P. *Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: an in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier*. J Contr Rel. 1990; 11:25-40.
- Xiao J, Qi L. *Surfactant-assisted, shape-controlled synthesis of gold nanocrystals*. Nanoscale. 2011; 3(4):1383-96.
- Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, Sueki K, Nakahara H, Enomoto S, Ambe F. *In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity*. Chem Biol. 1995; 2(6):385-9.
- Yamaguchi H1, Kojima T, Ito T, Kimura Y, Imamura M, Son S, Koizumi J, Murata M, Nagayama M, Nobuoka T, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. *Transcriptional control of tight junction proteins via a protein kinase C signal pathway in human telomerase reverse transcriptase-transfected human pancreatic duct epithelial cells*. Am J Pathol. 2010; 177(2):698-712.
- Yang L, Watts DJ. *Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles*. Toxicol Lett. 2005; 158(2):122-32.

- Yu H, Cook TJ, Sinko PJ. *Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages*. Pharm Res. 1997; 14(6):757-62.
- Yu Q, Wang Z, Li P, Yang Q. *The effect of various absorption enhancers on tight junction in the human intestinal Caco-2 cell line*. Drug Dev Ind Pharm. 2013; 39(4):587-92.
- Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Nakakuki K, Kohyama N, Donaldson K. *Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals*. J Toxicol Environ Health A. 1998; 53(6):423-38.
- Zhang Q, Kusaka Y, Zhu X, Sato K, Mo Y, Kluz T, Donaldson K. *Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation*. J Occup Health. 2003; 45(1):23-30.
- Zheng H, Kang Y. *Multilayer control of the EMT master regulators*. Oncogene. 2014; 33(14):1755-63.
- Zhou XP, Loukola A, Salovaara R, Nystrom-Lahti M, Peltomäki P, de la Chapelle A, Aaltonen LA, Eng C. *PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers*. Am J Pathol. 2002; 161(2):439-47.
- Zhou YM, Zhong CY, Kennedy IM, Leppert VJ, Pinkerton KE. *Oxidative stress and NFkappaB activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles*. Toxicol Appl Pharmacol. 2003; 190(2):157-69.
- <http://es.slideshare.net/joseigna80/presentacin-master-nanotubos-jose-ignacio>

