

Biocompatibilidad y toxicidad de nanopartículas de dióxido de titanio en la cavidad oral: Revisión sistemática.

Liliana Argüeta-Figueroa¹, Nayely Torres-Gómez², Rogelio J. Scougall-Vilchis³ y René García-Contreras⁴

¹Cátedra CONACyT, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México.

²Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS), UEAMex-UNAM. Km 14.5, Carr. Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México, México.

³Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO) “Dr. Keisaburo Miyata”, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), Toluca, México.

⁴Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII), Área de Nanoestructuras y Biomateriales, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León; Universidad Nacional Autónoma de México; León, Guanajuato, México.

Palabras clave: aplicaciones biomédicas; citotoxicidad; viabilidad celular; prostaglandina E₂; estrés oxidativo.

Resumen. El presente artículo tiene como propósito analizar el impacto biológico y la toxicidad de las nanopartículas (NPs) de dióxido de titanio (TiO₂) en la producción de especies reactivas de oxígeno así como inducción de estrés oxidativo, a través de una revisión sistemática de la bibliografía publicada hasta el momento sobre la biocompatibilidad de las NPs en contacto con células orales. Los datos disponibles sobre las NPs de TiO₂ fueron recopilados de la base de datos electrónica PubMed, ScienceDirect y otras fuentes, de acuerdo con recomendaciones PRISMA para revisiones sistemáticas. En el análisis cualitativo de la información publicada sobre la citotoxicidad en células orales, se ha observado un ligero aumento en el número de células metabólicamente activas al estar en contacto con las NPs de TiO₂; sin embargo a ciertas dosis la viabilidad celular decrece de manera importante. Uno de los efectos negativos de las NPs de TiO₂ es la inducción de producción de prostaglandina E₂ en un estado proinflamatorio previo, lo que potenciaría el efecto inflamatorio ya existente. Por tal motivo, la aplicación biológica de estas NPs debe ser sujeta a estudios *in vivo* y metabólicos, ya que es posible que los resultados de los experimentos *in vitro* no puedan ser extrapolados a un sistema *in vivo* debido a la tendencia a agregarse en el medio de cultivo empleado para dichas pruebas. Por lo tanto, aunque puede clasificarse como un material con citotoxicidad ligera o incluso biocompatible, no puede ser considerado complemente inocuo.

Biocompatibility and nanotoxicology of titanium dioxide in the oral cavity: Systematic review.

Invest Clin 2018; 59 (4): 352 - 368

Key words: biomedical applications; cytotoxicity; cell viability; prostaglandin E₂; oxidative stress.

Abstract. The aim of the present review article was to analyze the biological impact and toxicology of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) to determine their cytotoxicity, reactive oxygen species production as well as induction of oxidative stress through a systematic review of the literature published so far about the biocompatibility of TiO₂ NPs in contact with oral cells. Available data on nanoparticles (NPs) were collected from the PubMed and Science Direct electronic databases, and other sources according to PRISMA recommendations for systematic reviews. In the qualitative analysis of published data on cytotoxicity in oral cells, a slight increase in the number of metabolically active cells has been observed when the TiO₂ NPs are in contact with oral cells; however, at certain doses cellular viability decreases significantly. One of the negative effects of NPs is the induction of prostaglandin E₂ production in a previous pro-inflammatory state, which could increase the existing inflammatory effect. Therefore, the biological application of these nanoparticles must be performed both *in vivo* and metabolomic studies, since it is possible that the results of the *in vitro* experiments cannot be extrapolated to an *in vivo* system, since it been observed that the particles tend to aggregated among them, in the culture medium, used for such as tests. Therefore, although it can be considered a material with light or even biocompatible cytotoxicity, it must not be considered completely harmless.

Recibido 14-11-2017 Aceptado 25-10-2018

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología consiste en la manipulación de materiales con dimensiones que van de 1 a 100 nanómetros (nm) (1). A medida que las partículas son más pequeñas, su área de superficie se vuelve exponencialmente más grande y, por lo tanto, las NPs son más reactivas (2).

Debido a su afinidad al oxígeno y otros elementos, el titanio (Ti) no existe en su forma metálica en la naturaleza. El dióxido de titanio (TiO₂) es un compuesto mineral

que se encuentra en tres diferentes estructuras cristalinas polimórficas: anatasa, rutilo y brookita. Se ha reportado que la anatasa (tamaño promedio=3-5 nm; dosis=100mg/mL) es químicamente más reactiva y genera seis veces más especies reactivas de oxígeno [por sus siglas en inglés, reactive oxygen species (ROS)] que el rutilo después de su irradiación con luz UV, por lo que la fase anatasa podría poseer mayor potencial citotóxico (9). Sin embargo, las ROS generadas por dicha fase no se producen bajo condiciones de luz visible (3,4).

Debido a su coloración, las nanopartículas (NPs) de TiO_2 se han utilizado en pigmentos farmacéuticos, cosméticos, productos para el cuidado de la piel y para el cuidado personal tales como protectores solares y pastas dentales, esto debido también a su capacidad para atravesar barreras biológicas. Los protectores solares y pastas dentales contienen del 1% al 10% aunque existen productos con concentraciones por debajo de 0,01 mg/mL (5). En el campo de la medicina, se ha reportado el uso de diversas NPs como acarreadoras para liberación de fármacos (6), para tratamiento del cáncer (7), detección (8), diagnóstico (9) y otros tratamientos terapéuticos (10). Específicamente, las NPs TiO_2 se han utilizado como un potencial agente fotosensibilizador en terapia fotodinámica (11) y como componente de las partes articulares de prótesis, especialmente para cadera y rodilla (12); sin embargo, dichas prótesis, en ocasiones fracasan debido a la degradación de los materiales o a la respuesta inflamatoria crónica en el tejido que las rodea (13).

Por otro lado, se está investigando su uso como preparados de NPs de TiO_2 en varios productos del cuidado de la piel para tratar acné vulgaris, dermatitis atópica, lesiones hiperpigmentadas de la piel, condiloma acuminado recurrente, entre otras (14). Asimismo, las NPs de TiO_2 también parecen mostrar actividades antibacteriales bajo radiación ultravioleta (15), ampliando así su aplicación en este campo. Tradicionalmente, las partículas de TiO_2 se han considerado como inertes, debido a esto, se han utilizado como “control negativo” en muchos estudios toxicológicos de partículas tanto *in vitro* como *in vivo*. Actualmente, esta visión ha cambiado tras observar el desarrollo de tumores pulmonares cancerígenos en ratas después de dos años de exposición a concentraciones altas de partículas finas de TiO_2 (16). Por lo que la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer [por sus siglas en inglés, International Agency for Research on Cancer (IARC)], ha clasificado al TiO_2 dentro del grupo 2B carcinó-

geno (posible carcinógeno para humanos) (17). Un aspecto que debe tomarse en consideración, es que las NPs poseen un tamaño diminuto, el cual facilita su incorporación a las células por vía de endocitosis (18) y una vez que las NPs han traspasado la membrana, pueden afectar las funciones celulares e inducir la muerte. Existe cierta controversia sobre la biocompatibilidad de dichas NPs; algunos estudios muestran que la inhalación e ingestión de estas es segura sin causar efectos adversos (19), mientras que otros reportes señalan que incrementan el riesgo a desarrollar asma en las crías de ratones expuestos a inhalarlas (20). Además, se ha encontrado que causan efectos citotóxicos en contacto con tejido cardíaco (21) y hemaglutinación y hemólisis celular en cultivo con eritrocitos (22). En cambio, algunos estudios en otro tipo de líneas celulares reportan que el contacto con células epiteliales alveolares (8A549), células epiteliales bronquiales (16-HBE), monocitos/macrófagos (THP-1), y macrófagos alveolares de ratón no producen citotoxicidad, ni reducción del número de células viables (23). Por otro lado, las NPs, en dosis mayores a 1 mg/L muestran citotoxicidad por acción pro-oxidante en contacto de fibroblastos de ratón y de humano (24). Las condiciones para la evaluación nanotoxicológica *in vitro* pueden verse en la Tabla I.

En odontología, la utilización de las NPs es un campo potencial para el desarrollo de nuevos materiales de restauración, implantes dentales, irrigación de conductos, entre otras, debido a sus propiedades antibacteriales y terapéuticas (25) including dental practice with the development of silver nanoparticles (Ag NPs). Recientemente, diversos materiales dentales han incluido NPs en su composición. Por ejemplo, se han incorporado NPs de TiO_2 a cementos de ionómero de vidrio, las cuales incrementan significativamente su resistencia a la flexión y compresión así como su microdureza y su efecto antibacterial, además de no interferir con la adhesión de estos con los tejidos dentales (26).

TABLA I
CONDICIONES PARA LA EVALUACIÓN NANOTOXICOLÓGICA *IN VITRO*

Condición	Características
Dosis inoculada y dosis celular	La dosis inoculada es variable y es por ello que se debe considerar también, efecto de dosis-respuesta, la dosis intracelular así como la densidad celular.
La dosis celular inoculada no es siempre lo más relevante	La dosis de NPs que se inoculan a las células no es tan importante, lo que si se bene considerar es la dosis intracelular por la incorporación de las NPs a las células.
¿Dispersas o no?	La mayoría de las investigaciones toman precaución en tratar de inocular las NPs dispersas con ayuda de agentes químicos o por agitación ultrasónica, sin embargo de las NPs son de naturaleza agregada en el aire, agua o alimentos, por lo cual se consideran menos citotóxicas. Los agentes químicos y la agitación usados para evitar la agregación de las NPs en ocasiones pueden producir resultados diferentes. Además, se ha demostrado que cuando se inoculación las NPs en el medio de cultivo, éstas se agregan casi de forma instantánea.
¿Qué unidad de medición se debe utilizar para expresar la dosis?	Existe mucha controversia respecto a la unidad de medición en que se debe expresar la dosis. La mayoría de las investigaciones representan mediante dosis gravimétricas ($\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio de cultivo, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del plato de cultivo, $\mu\text{g}/10^6$ células) y, en ocasiones, se utiliza la molaridad por ml de medio de cultivo (M/mL). Las concentraciones dependerán de la naturaleza de las NPs y si se encuentran suspendidas en un vehículo.
Las células blanco a utilizar	Es de vital importancia tomar en cuenta el tipo de célula blanco a evaluar y la cantidad de divisiones celulares (PDL, de inglés population doubling level) que se han efectuado en las células a evaluar.

Por lo antes mencionado, el presente artículo tiene como propósito analizar el impacto biológico de las NPs de TiO_2 para determinar su citotoxicidad, producción de ROS así como inducción de estrés oxidativo, a través de una revisión sistemática de la bibliografía publicada hasta el momento sobre la biocompatibilidad de éstas en contacto con células orales. Adicionalmente, se incluyó una breve sección que brinda un panorama general de los métodos de síntesis de NPs de TiO_2 .

METODOLOGÍA

En la presente revisión sistemática, los datos disponibles sobre las NPs de TiO_2

fueron recopilados de la base de datos electrónica PubMed y Science Direct, de acuerdo con recomendaciones PRISMA para revisiones sistemáticas (27), durante el mes de octubre-noviembre de 2017. Se realizó una búsqueda de los métodos de síntesis de NPs de TiO_2 con el fin de enriquecer el contenido de la revisión, así como ofrecer un contexto adecuado del tema. La búsqueda electrónica se realizó en dichas bases de datos con las siguientes palabras clave y términos MeSH: viability AND oral cells AND titanium dioxide nanoparticles; Cytotoxicity AND titanium dioxide nanoparticles AND oral cells; Prostaglandin E_2 AND titanium dioxide nanoparticles AND oral cells; Oral cells AND oxidative stress AND titanium dioxide nanoparticles;

Reactive oxygen species generation AND titanium dioxide nanoparticles AND oral cells.

Para refinar aún más la búsqueda, se tomaron los siguientes criterios de inclusión: Artículos de texto completo en idioma inglés centrados en el objetivo de esta revisión, que son los aquellos estudios originales publicados en revistas sobre biocompatibilidad de las NPs de TiO₂ en contacto con células orales. La evaluación de la calidad de los artículos fue determinada por la investigación original y metodológicamente coherente y publicada en revistas indizadas de revisión por pares.

Las referencias bibliográficas de los artículos consultados también se consideraron como búsqueda manual, como artículos pertinentes no incluidos en la búsqueda electrónica si contaban con los criterios de inclusión de la búsqueda. La extracción de datos, la recolección, manejo y análisis de datos consistió en la descripción de la evidencia relevante, la cual se presenta en diagrama de flujo de acuerdo a PRISMA (Fig. 1). Además, se presenta una evaluación crítica de los resultados de forma ordenada bajo encabezados apropiados para cada uno de ellos.

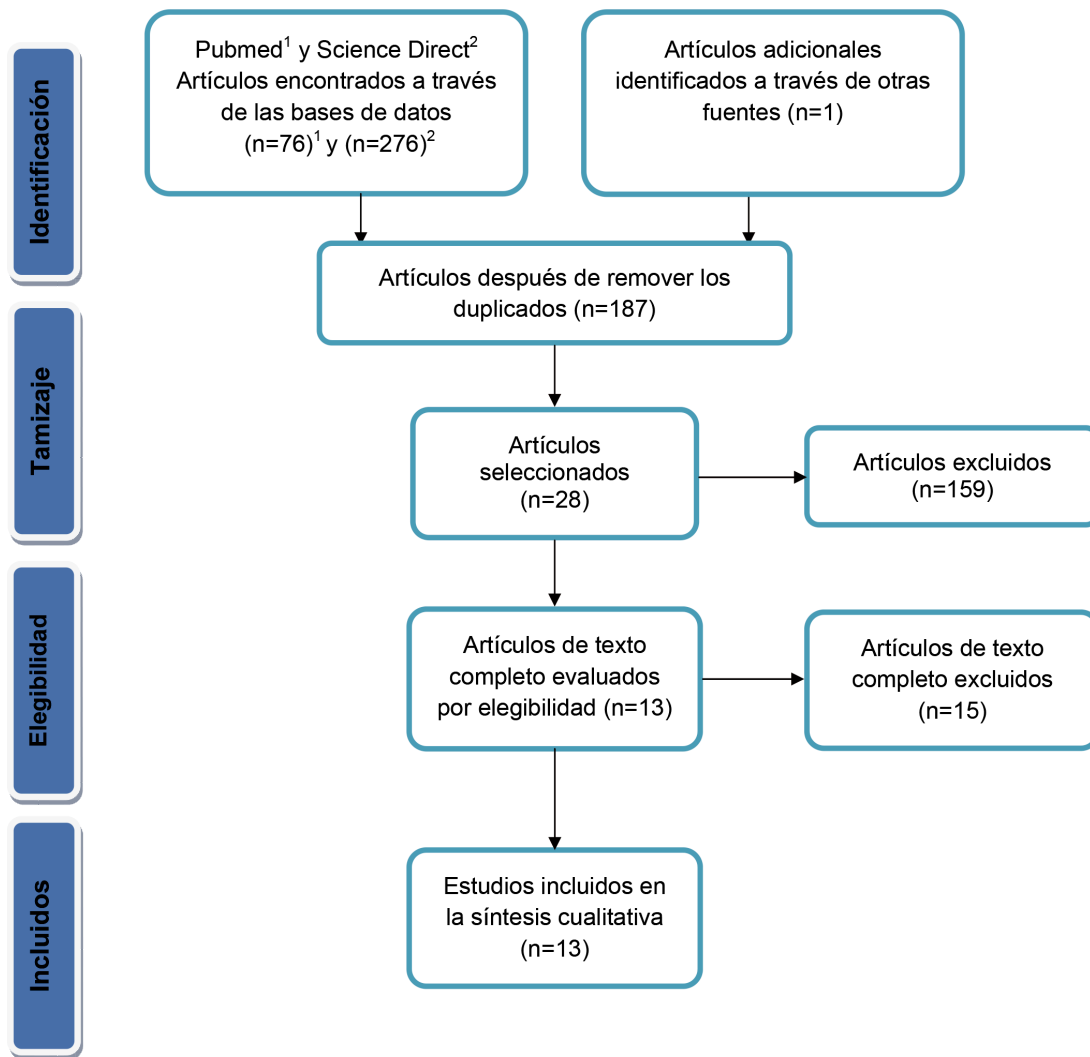


Fig. 1. Diagrama de flujo PRISMA de la revisión sistemática.

DESARROLLO DE LA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Generalidades de los métodos de síntesis de NPs de TiO₂

Uno de los aspectos importantes que se debe de considerar cuando se pretende utilizar un material estructurado es el método de síntesis, ya que este va encaminado a controlar la morfología, tamaño y el ambiente químico en la superficie de las NPs. En la literatura, desde hace más de dos décadas, existen reportes de síntesis de TiO₂, enfocados a la preparación de polvos, cristales, películas delgadas y estructuras. Existe una gran gama de métodos de síntesis que pueden ser utilizados para obtener NPs de TiO₂; desde los físicos hasta los biológicos, por lo que dependiendo de la aplicación final, será el método utilizado para elaborarlas (28).

Cuando se desea tener un buen control de la estequiometría, el tamaño y la forma los métodos más utilizados son los métodos químicos, entre los que podemos mencionar sol-gel, micro-emulsión, hidrotermal o deposición química de vapor. Sin embargo, estos métodos presentan algunas desventajas tales como el uso de precursores caros, tiempos largos de síntesis y, en algunos casos, presencia de impurezas.

El método de sol-gel, es en base húmeda; en la que se realiza una reacción de hidrólisis del alcóxido o haluro del metal precursor, dando paso a la condensación de la fase inorgánica; siendo uno de los más utilizados. Uno de los grupos de investigación que estudiaron algunas de las variables que intervienen en este proceso es el de Sugimoto y col. (29–33); ellos variaron la relación del precursor con un grupo amino, pH, temperatura y tiempo de reacción y encontraron que controlando estas variables podían obtener NPs con diferentes morfologías y tamaños. Su y col. (34), sintetizaron NPs de TiO₂ a partir de la hidrólisis de n-Butóxido de Titanio (IV) en isopropanol con un tamaño variable de 4-35nm con morfologías elipsoidales y poligonales. Wetchakun y Phanichphant (35),

utilizaron etanol absoluto para llevar a cabo la hidrólisis y una membrana de celofán para aumentar el proceso de difusión, reportando NPs de TiO₂ con alta pureza y tamaños de 15-60nm.

Otro de los métodos, en el cual utiliza agua como solvente es el de micro-emulsión donde se forman micelas para controlar el tamaño y la morfología de las NPs de TiO₂ (36–42). En este método las variables que se deben de controlar son la solubilización, tensión superficial, conductividad y difusión. Kim y cols. (36) sintetizaron NPs de TiO₂, en agua y en amoníaco y obtuvieron partículas amorfas con tamaños de 10-20nm; al calentar a 600°C obtuvieron la fase anatasa y a 900°C la fase rutilo. Li y col. (40) utilizaron una fase oleosa y un surfactante no iónico y obtuvieron NPs amorfas; la fase anatasa se obtuvo utilizando rangos de temperatura de 200-750°C y la fase rutilo con una temperatura mayor a 750°C. Zhang y col. (11) sintetizaron TiO₂ cristalino, utilizando ácidos y temperatura ambiente; su aporte principal fue la relación de la acidez con la relación de cristalinidad de la nanopartícula.

También, diferentes grupos de investigación (16–23), han sintetizado NPs de TiO₂ utilizando método hidrotermal o solvotermal. Nian y col. (23) prepararon barras de anatasa en ausencia de surfactantes controlando el pH de la reacción.

En definitiva, se han reportado una gran variedad de métodos de síntesis para fabricación de NPs de TiO₂ con diferentes morfologías y tamaños. De ellos, el método de sol-gel es el más recomendado para sintetizar nanopartículas monodispersas, que es un factor importante para obtener los beneficios de los materiales a escala nanométrica y que dichas NPs puedan ser utilizadas en aplicaciones biológicas.

Es importante mencionar que se debe hacer un estudio detallado de la toxicidad y la biocompatibilidad de estas NPs, ya que en la literatura se muestra principalmente los estudios enfocados a las aplicaciones de TiO₂. En lo que se refiere a su biocompati-

bilidad, se han realizado trabajos de investigación acerca de la citotoxicidad de las NPs de TiO_2 sobre diversas células de animales y de humanos, e incluso es probable que sea uno de los nanomateriales más estudiados; sin embargo, existen pocos reportes acerca de la biocompatibilidad en células orales.

Citotoxicidad de las NPs de TiO_2 en cultivo de células orales

Al llevar a cabo la revisión sistemática, uno de los aspectos que se observan en los estudios publicados hasta el momento es la imposibilidad de realizar una comparación cuantitativa debido a la gran variabilidad en las condiciones entre los diversos estudios. Así, se emplean diversos métodos de síntesis que generan diferentes tamaños de partícula y de morfología, las dosis de las NPs difieren entre sí, así como el número de subdivisiones celulares de la población, el tipo de células, ya sea obtenidas a través explantes de tejido o adquiridas como células inmortalizadas ATCC y los cultivos celulares primarios empleadas en los experimentos. Debido a esto, la siguiente revisión sistemática está enfocada en un análisis cualitativo de los datos publicados en la literatura hasta el momento.

En las investigaciones que han sido publicadas sobre la citotoxicidad de las NPs de TiO_2 en contacto con células orales (vea Tabla II), la viabilidad celular se ha evaluado por dos métodos, el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y el tetrazolio soluble en agua (WST-1). Ambos métodos son muy eficientes e igualmente válidos para terminar la citotoxicidad de un material; sin embargo, el WST-1 es una prueba más sensible capaz de detectar actividad celular aun cuando el conteo es escaso.

En un estudio, en el cual se emplearon NPs de TiO_2 dopadas y sin dopar con nitrógeno a través del método del sol-gel, se observaron agregados de partículas entre 100 a 300 nm, conformados por NPs primarias de 20-30 nm, en ambos casos. En el análisis de Difracción de Rayos X (DRX), se observó que

el dopaje con nitrógeno dio como resultado la formación de TiO_2 principalmente en fase rutilo, mientras que el TiO_2 sin dopar fue principalmente anatasa. Se registró la actividad mitocondrial de las células epiteliales gingivales humanas primarias (hGEPs), en contacto con NPs de TiO_2 con y sin ser dopadas con nitrógeno, con o sin luz azul (485 nm de longitud de onda) usando WST-1 (41). Además, realizaron un ensayo de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular, el cual mostró que las partículas causaban una respuesta de estrés en hGEPs cuando se exponían a 1 hora de luz azul, aunque esto no dio como resultado una liberación detectable de citoquinas. Los resultados muestran que las NPs de TiO_2 dopado con nitrógeno tienen actividad antibacteriana cuando se exponen a la luz azul y son biocompatibles a estas concentraciones. El tratamiento con NPs de TiO_2 dopadas con nitrógeno expuestas a luz ambiental resultó en un aumento ligero, aunque no significativo, de la proliferación celular. Además, el metabolismo celular fue significativamente elevado en las células expuestas a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas, independientemente del tratamiento con luz. Al parecer, dichas NPs estimularon el metabolismo celular a concentraciones bajas e intermedias, pero no fueron citotóxicas en ninguna concentración probada. Debido a resultados de investigaciones como las señaladas anteriormente, acerca de las NPs y tubos de TiO_2 y de otras llevadas a cabo con otras líneas celulares no provenientes de la cavidad oral, se considera por varios grupos de investigación, como un agente que potencialmente puede estimular la proliferación celular por lo que se ha propuesto como recubrimiento para implantes dentales, sin embargo aunque la adición de NPs de TiO_2 ha mejorado la frecuencia de éxito de los implantes en experimentos *in vivo*, todavía dicha tasa de éxito no es completamente satisfactoria (42).

De igual manera, en otro estudio se utilizaron células epiteliales bucales humanas (TR146), las células se pusieron en contac-

TABLA II
CUADRO COMPARATIVO DE LOS ESTUDIOS DE LA TOXICIDAD DE TiO₂ SOBRE CÉLULAS DE LA CAVIDAD ORAL

Referencia	Fase cristalina	Morfología	Tamaño de partícula	Concentraciones probadas	Línea celular/ Tejido	Prueba/ Evaluación	Viabilidad celular
(41)	Rutilo	Cuasi-esférica	21,8±9,6 nm en agregados (≤300nm)	50-200 µg/mL	hGEPs	WST-1	En todas las concentraciones ≥ 100%.
(42)	Mezcla de rutilo y anatasa	Film	Grosor de 380nm	NA	Tejido circundante al implante dental	Tinción azul de toluidina (en cortes histológicos)	No se observa muerte celular ni zonas inflamatorias
(43)	Rutilo	Esférica	1819±61,56nm	50-200µg/mL	Células TRI146	MTS	En todas las concentraciones ≥ 100%.
(44)	Anatasa	Esférica	<25nm	0,05-3nM	HGF	MTT	En todas las concentraciones ≥ 100%.
(45)	Mezcla de anatasa: rutilo 80:20	Cuasi-esférica	1)28,5 ± 9,8 nm y, 2)183,2 ± 73,9 nm	0,031-0,25% w/v.	H376	MTT	
(46)	ND	Nanotubular	Diámetro de 120±15nm	Film sobre placas de titanio	HGF	MTT	En todas las concentraciones ≥ 100%.
(47)	ND	Nanotubular	588,85±3,92	Film sobre placas de titanio	HGF	MTT	≥100%.
(48)	Mezcla de anatasa: rutilo 80:20.	Cuasi-esférica	29,8 nm	1pg./L-1µg/L	HBEC	Tinción celular de yoduro de propidio	En todas las concentraciones probadas fue ≥75%.
(49)	Anatasa	Esférica	<25nm	0,05-3,2 mM	HSC-2	MTT	100±5%
(50)	Anatasa	Esférica	<25nm	GIC + TiO ₂ (3% y 5%, w/w)	HPC, HGF, HPLF; HSC-2, HSC-3, HSC-4 y Ca9-22	MTT	La incorporación de TiO ₂ al 3% disminuye la citotoxicidad de GIC, mientras que al 5% ésta aumenta notoriamente.
(51)	ND	ND	ND	MTA+TiO ₂ (1%w/w)	HGF	MTT	≥100%
(53)	Anatasa	Esférica	<25nm	0,8-3,2mM	HGF	MTT	100±5%
(55)	1)Pigmento anatasa, 2)NPs anatasa, 3)NPs anatasa 80% y rutilo 20%	Cuasi-esférica	34±15nm 28±8nm 36±10nm	50-200 µg/mL	HBEC	MTS	En todas las concentraciones probadas fue 100±5%

NA= No aplica. ND= Dato no disponible. hGEPs= Células epiteliales gingivales humanas TRI146= Carcinoma de células escamosas humanas. HGF= Fibroblastos gingivales humanos. H376= Células epiteliales orales no queratinizadas. HBEC= Células epiteliales bucales humanas. HSC (-2,-3,-4)= Carcinoma oral de células escamosas. Ca9-22=células de carcinoma gingival. HPC= células pulpareas humanas. HPLF= Células del ligamento periodontal humanas. GIC= cementos de ionómero de vidrio. MTA= Agregado de trióxido mineral. w=peso. v=volumen.

to con dosis entre 1-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs de TiO_2 hidrófobas-rutilo (tamaño promedio de 20 nm, recubiertas con dimeticona) y NPs de TiO_2 hidrófilas-rutilo (tamaño promedio 20 nm, recubiertas con glicerol). En sus resultados indicaron que la actividad mitocondrial de las células puestas en contacto con cada uno de los tipos de NPs fue mayor en comparación con el control celular. En este estudio se realizó una prueba de mutagenicidad (ensayo de mutación del gen HPRT), y se encontró que ninguna de las NPs desencadenó la mutación génica en las células epiteliales bucales. En dicho estudio, las NPs hidrófilas produjeron aglomerados de casi el doble de tamaño que las NPs hidrofóbicas de TiO_2 al ser suspendidas tanto en PBS como en saliva artificial. Una posible explicación para la aparente proliferación celular podría ser que dicho incremento es detectado en el ensayo como consecuencia del aumento de la actividad metabólica mitocondrial, la cual podría implicar una situación de estrés celular. Para aclarar este problema, se examinó el potencial de membrana mitocondrial, el cual es indispensable para mantener la función fisiológica de las células. Una pérdida en el potencial de membrana produce lo que genera agotamiento de la energía y muerte celular. El colorante TMRM funciona como un sensor de potencial de membrana mitocondrial y se usó para evaluar los cambios temporales. El efecto desequilibrante del potencial de membrana mitocondrial fue más pronunciado para las partículas hidrófilas que para las hidrofóbicas. Por tanto, un potencial de membrana reducido de las mitocondrias indica el primer signo de muerte celular programada. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó en ausencia de luz UV. Los datos revelaron que las partículas hidrófobas causaron una mayor producción de ROS en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, la fluorescencia relativa obtenida fue marcadamente menor que el control positivo (43). Esto puede interpretarse como que existe una generación de ROS por parte de estas

partículas, que pueden producir cambios en las funciones mitocondriales que son seguidos por alteraciones celulares que desencadenan el inicio del proceso apoptótico.

Por otra parte, se ha reportado que el contacto de NPs de TiO_2 , a diferentes concentraciones, con contacto fibroblastos gingivales humanos [del inglés Human Gingival Fibroblast (HGF)], no mostraron citotoxicidad. Además, se observó proliferación celular a bajas concentraciones y una disminución en el número de células viables a mayor concentración; es decir que sigue un patrón dosis-dependiente (44).

En un estudio en el que se utilizaron NPs de TiO_2 en una mezcla de anatasa-rutilo (en relación 80:20, estabilizadas en solución acuosa, Sigma-Aldrich) comparadas con micropartículas de TiO_2 se encontró que el TiO_2 , tanto nano como micrométrico, fue bien tolerado por las células al emplear un modelo de células epiteliales orales no queratinizadas (H376) a concentraciones que van de 0,031% a 0,250% peso/volumen. En dicho estudio se observó, a través de la medición de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), la disrupción de la membrana celular inducida por las NPs de TiO_2 ; la liberación de LHD para todas las concentraciones de TiO_2 tanto nano como micrométrico, fue menor al 25%. Esto indicaría que, en dicho porcentaje de células, se libera una enzima citosólica estable en etapas tempranas durante la necrosis y en etapas tardías durante la apoptosis (45). Esto se interpreta como una citotoxicidad ligera, sin encontrar diferencias en dicha toxicidad atribuibles al tamaño de partícula.

En un estudio acerca de la citotoxicidad de nanotubos de TiO_2 (diámetro=120 nm) en HGF monitorizados por la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial (ensayo de MTT), después de un período de exposición de 72 h, se observó un ligero aumento en el número de células metabólicamente activas (46), lo cual clínicamente se traduciría como proliferación celular.

Otro aspecto que es abordado es la posibilidad de emplear nanotubos de TiO_2 como

reservorio de lenta liberación de factores de crecimiento tales como el Factor de crecimiento fibroblástico 2. En este estudio se muestra una citotoxicidad de los nanotubos de TiO_2 en forma de film sobre placas de Ti que podría ser empleado para fines prácticos como un recubrimiento para implantes. Al evaluar la viabilidad celular de los HGF se encontró una viabilidad ligeramente mayor que el control, la cual aumentaba aún más si se exponía a diferentes concentraciones del Factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) de manera dosis dependiente, lo cual a su vez también incrementa la adhesión celular a las placas de Ti funcionalizadas con los nanotubos y el FGF2. En este estudio se remarca la importancia de continuar estudiando la posibilidad de emplear dicho NPs de TiO_2 para liberación prolongada de factores de crecimiento de manera local, lo cual abriría la posibilidad de generar otras líneas de investigación prometedoras (47).

Además, en consistencia con esta investigación, se probaron las NPs de TiO_2 (pureza $\geq 99,5\%$; anatasa/rutilo = 80:20; y tamaño de partícula = 27 nm) a concentraciones desde 100 mg/L en diluciones seriadas hasta 1 pg/L frente a las células TR146. Las células tratadas fueron igual de viables (más del 98% de viabilidad relativa) que el grupo control no tratado. Dichas células tratadas son igual de viables (más del 98% de viabilidad relativa) que el grupo control no tratado. En las células TR146 con NPs de TiO_2 , la muerte celular significativa sólo se detectó a una dosis de 1 g/L con una disminución del 24% en la viabilidad celular relativa.

Otro aspecto de discusión en este estudio, es cuando las NPs de TiO_2 están en suspensión en cuyo caso tienden a agregarse y el grado de agregación depende del dispersante utilizado. Esto se demostró al comparar el tamaño hidrodinámico de las NPs suspendidas en agua ultrapura, DMEM/F-12 y únicamente DMEM. Los resultados mostraron que el tamaño hidrodinámico de las NPs en DMEM fue 33-37% menor que el tamaño de las partículas suspendidas en agua ultra-

pura; en cambio, en DMEM/F-12 el tamaño fue un poco mayor que en aquellas partículas suspendidas en DMEM pero 28% más pequeñas que las suspendidas en agua ultrapura. Los valores absolutos del potencial zeta se desplazaron hacia potenciales negativos en los medios de cultivo, DMEM/F-12 (7,6 mV) y DMEM (-11,6 mV) en comparación con los valores del potencial zeta del agua ultrapura (+21,8 mV). Al ser suspendidas en agua las NPs de TiO_2 con un tamaño de 29,8 nm incrementó el tamaño a 392,2 nm en agua ultrapura cuyo pH fue de 6,8, DMEM/F-12 con un pH de 7,4 con 282 nm y DMEM completo (pH 7,4) con 260,9 nm, por lo que el medio es un factor determinante para la agregación de las partículas. Además, al parecer, existe una relación directa entre el pH del medio de cultivo, el potencial zeta y la aglomeración de las NPs; esto es un aspecto importante ya que de dichas condiciones dependerá el tamaño final de los agregados de TiO_2 . Al observar los resultados de estudios sobre viabilidad celular del contacto de las NPs de TiO_2 en cultivo celular, éstas tienden a agregarse entre sí muy fácilmente al entrar en contacto con el medio de cultivo celular, formando aglomerados de NPs (Fig. 2), que muestran menor toxicidad los aglomerados cuando de compara con las NPs dispersas. Al parecer, la transición entre la agregación y dispersión de estas NPs produce resultados experimentales diferentes dependiendo la naturaleza de dichos experimentos. Dado los datos de los reportes anteriores, la citotoxicidad de dichas NPs se genera en función de la concentración; por lo que mientras las concentraciones sean bajas, la citotoxicidad del material es mínima. En el estudio referido se observó una baja citotoxicidad en TR146. En dichas células, la muerte celular sólo se detectó a una dosis de 1 g/L, con una disminución del 24% en la viabilidad celular (48).

Por otra parte, es muy escasa la información sobre el efecto de las NPs de TiO_2 sobre las células cancerígenas. Debido a que estas células exhiben una alta capacidad de proli-

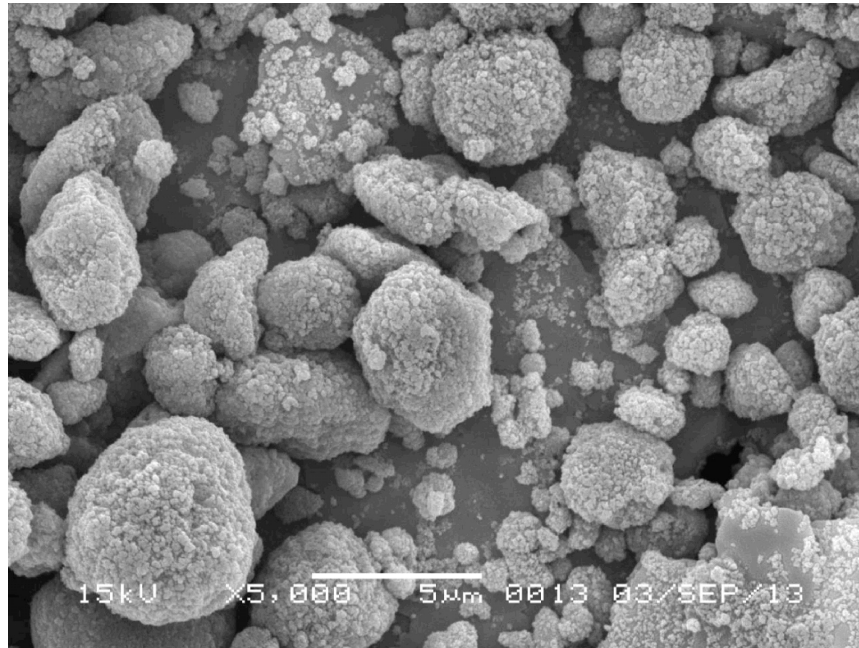


Fig. 2. Imagen representativa de la ultra estructura de las nanopartículas (NPs) de dióxido de titanio (TiO_2). Las NPs de TiO_2 fueron disueltas en agua bidestilada y agitadas en ultrasonido durante 5 min antes de inocularse en el medio de cultivo. Una gota de medio de cultivo conteniendo las NPs de TiO_2 fue colocada sobre un portamuestras de aluminio; el espécimen se dejó secar durante 48 hrs a temperatura ambiente. La muestra fue recubierta con una capa de oro de 50 nm. La topografía de las NPs de TiO_2 fue observada en microscopia electrónica de barrido (SEM, del inglés Scanning electron microscope, JSM-6360LV; JEOL, Tachikawa, Japón) con electrones secundarios (x10,000 y 15 kV). Se observa una agregación de las nanopartículas (NPs) de dióxido de titanio (TiO_2).

feración y, tomando en cuenta el comportamiento reportado en células normales de las NPs de TiO_2 se podría suponer que tampoco serían citotóxicas para las células cancerígenas. Para demostrar esto, se pusieron en contacto NPs de TiO_2 con células humanas de carcinoma escamoso [del inglés Human Squamous Carcinoma (HSC-2)], las cuales no mostraron citotoxicidad y al combinarse con agentes quimioterapéuticos tampoco se potencializó el efecto antitumoral de dichos fármacos [doxorubicina, melfalán, 5-fluorouracilo (5-FU), gefitinib, y docetaxel] (49), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas.

Otra línea de estudios involucra la incorporación de las NPs de TiO_2 a materiales de uso odontológico en porcentajes menores al 5%, ya que dopar un material con un por-

centaje mayor de NPs de cualquier composición (no necesariamente de TiO_2) genera un decremento de las propiedades físicas originales del material. En este sentido, se realizó un estudio, en el cual se incorporaron NPs de TiO_2 (3 y 5%) en diferentes cementos de ionómero de vidrio (GIC, de 0 a 40 mg/mL). Se encontró una citotoxicidad moderada, independientemente de la composición del GIC y la presencia o la ausencia de NPs de TiO_2 ; sin embargo, extrañamente, las células de cáncer orales fueron más sensibles que las células orales normales (50). También se realizó un estudio para evaluar la citotoxicidad del MTA y MTA con NPs de TiO_2 al 1% en peso durante 24 y 48 h después de ponerse en contacto con HGF. Los resultados mostraron un aumento en la viabilidad celular de ambos grupos, y en ambos intervalos de

tiempo, respecto al control de células sin inocular. Sin embargo, una de las deficiencias que impiden la reproducibilidad de este estudio, es que no se especifica el tamaño de partícula ni el método de obtención de las nanopartículas (51).

Al realizar los ensayos de viabilidad celular, una consideración importante es que el método del MTT o incluso el WST-1 pueden dar resultados erróneos. El primero, por ejemplo, se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul-violeta (formazán), permitiendo determinar la función mitocondrial de las células tratadas. En el empleo de este ensayo se pueden producir lecturas erróneas debido a que ciertas NPs reaccionan con los reactivos empleados en los ensayos de citotoxicidad al incorporar un solvente orgánico aprótico, comúnmente dimetil sulfóxido, lo que genera la interpretación de las partículas como células vivas o con actividad mitocondrial en el ensayo (52). Para evitar que esto ocurra debe transportarse el sobrenadante de los platos de cultivo a una microplaca nueva antes de la lectura de la densidad óptica. Esto resuelve el problema dando una lectura precisa de la cantidad de actividad metabólica que se entiende como el número de células viables en el cultivo.

Acción pro-inflamatoria de las NPs de TiO₂ en células orales

A pesar de que las NPs de TiO₂ no mostraron citotoxicidad en cultivo con HGF, estas NPs inducen a un incremento en la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) con la mínima concentración de 0,2 mM (47), y en mayor grado cuando se adiciona interleucina-1β (IL-1β), un agente inflamatorio conocido y estudiado previamente por nuestro grupo de investigación. El contacto de las NPs de TiO₂ con HGF, refleja una actividad pro-inflamatoria cuyo mecanismo se ha identificado por el incremento de la expresión de ciclooxigena-

sa 1 y 2 al estar presente la IL-1β, agravando el efecto pro-inflamatorio (53). Esta información es de suma importancia, ya que la presencia de NPs de TiO₂ en cavidad bucal y ante una enfermedad inflamatoria crónica (por ejemplo en la periodontitis y gingivitis) agrava significativamente la inflamación, pero al conocer los mecanismos pro-inflamatorios se puede contrarrestar dicha inflamación con antiinflamatorios no esteroideos.

Es imprescindible mencionar que la acción pro-inflamatoria puede ser el resultado de la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en las NPs; sin embargo, se ha eliminado esta posibilidad a través de la adición intencional de LPS en el cultivo, concluyendo que su presencia (a una concentración de 0,2 mM de NPs de TiO₂ con 9,0 ng de LPS) no es suficiente para inducir una acción pro-inflamatoria, siendo las NPs de TiO₂ la causa directa de la inducción del efecto inflamatorio en cultivo de HGF (44, 52).

Se encontró un único estudio, realizado por nuestro grupo de trabajo, donde se realizó un análisis con técnica metabolómica de las NPs de TiO₂ en HGF inducidas a un estado inflamatorio con IL-1β. Las NPs de TiO₂ aumentaron significativamente la producción de prostaglandina E₂ inducida por IL-1β y expresión de la proteína COX-1 y COX-2. IL-1β, redujo las concentraciones intracelulares de metabolitos primarios en general, especialmente las vías sintéticas de los aminoácidos, el ciclo de urea, poliamina, S-adenosilmetiona y glutatión (52), ciclos relacionados con el proceso inflamatorio e incremento del estrés oxidativo. Por tal motivo, se recomendaría el uso cuidadoso de los materiales dentales que contienen NPs de TiO₂ en pacientes con enfermedades pro-inflamatorias agudas o crónicas como gingivitis o periodontitis que son muy comunes en la cavidad oral.

Incorporación de las NPs de TiO₂ en las células orales

La interacción de las NPs de TiO₂ con las células es un tema de relevancia para

comprender los mecanismos de citotoxicidad de dicho material. En un estudio, se identificó que la incorporación de las NPs de TiO_2 a las células se lleva a cabo por medio de endocitosis por vía de receptores tipo toll 4 (TLR 4) (54). La observación con microscopio electrónico de transmisión demostró la incorporación de NPs de TiO_2 en forma de endosoma temprano y la inducción de formación de vesículas lisosomales de las células (55).

En células orales normales de HGF, HPLF y cancerígenas HSC-2 se ha observado la incorporación de las NPs de TiO_2 . A pesar de la formación de agregados de NPs, algunas logran incorporarse a la célula y estas se depositan y coexisten como vesículas con organelos celulares donde las NPs son vacuolizadas para su eliminación. Esta atracción o incorporación dentro de las células puede ser causa de la interacción entre los grupos amino y carboxilo de la membrana celular (con carga negativa) y la superficie de las NPs de TiO_2 (con carga positiva) (55). Sin embargo, el mecanismo de incorporación de las NPs de TiO_2 a las células aún no se conoce ampliamente. Diversos estudios señalan que las NPs, después de incorporarse a la célula se posicionan como endosomas y se observa la atracción de lisosomas en el citoplasma (44, 53). En otro estudio con NPs de TiO_2 de rutilo, hidrofílicas (20 nm) y de rutilo hidrofóbicas (20 nm) se observaron diferencias significativas en la localización de partículas intracelulares en células epiteliales bucales humanas (TR146). Las partículas hidrofílicas se encontraron libremente distribuidas en el citoplasma, mientras que sus homólogas hidrofóbicas fueron engullidas en estructuras vesiculares; por lo tanto, los efectos secundarios citotóxicos fueron bajos ya que las partículas aisladas del citoplasma no reaccionan con las estructuras intracelulares. Al parecer, las partículas hidrofóbicas no se unieron a las vesículas; en consecuencia, pudieron interferir con la membrana mitocondrial externa, alterando el potencial de membrana mitocon-

drial que es un elemento indispensable para la homeostasis celular (43).

A través de la revisión de la literatura es evidente que se han observado diferencias en la localización de NPs de TiO_2 en el interior de las células. Esto puede deberse a diversos factores intrínsecos a la morfología, tamaño, método de síntesis y agente estabilizador de las NPs. Es indudable que el medio en el que dichas NPs son solubilizadas juega un papel importante en su interacción con las células dado el cambio producido en el potencial Z de la partícula y la formación de aglomerados.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En un futuro, es necesario contar con mayor evidencia científica para determinar la biocompatibilidad y la aplicación segura de las NPs de TiO_2 en contacto con las células orales. Para esto, el estudio de perfiles metabólicos será capaz de proporcionar información sobre la toxicidad de las NPs de TiO_2 , los procesos patológicos asociados a éstas y su influencia en las funciones bioquímicas. Los estudios metabólicos han sido ampliamente utilizados en la evaluación de la seguridad de los productos químicos como un método para identificar nanotoxicidad en los órganos blancos y el mecanismo toxicológico a través de biomarcadores de orina y suero. Una técnica metabólica selectiva es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), acoplado con el patrón de reconocimiento (PR). Las investigaciones futuras podrían emplear dichos métodos, ya que éstos pueden ofrecer información nanotoxicológica rápida y no invasiva, sólida y reproducible (56). De esta manera, mediante pruebas de expresión metabólica es necesario determinar las vías inflamatorias de señalización y el mecanismo de interacción de los metabolitos, así como crear estrategias terapéuticas específicas para la aplicación de antiinflamatorios como método de prevención y determinar los efectos dosis-respuesta de las NPs de TiO_2 en diver-

esos intervalos de tiempo, particularmente en estudios *in vivo*. La demostración de la bioseguridad en el uso de las NPs de TiO₂ deben estar encaminadas a probar su biocompatibilidad en modelos animales.

Se concluye que los trabajos de investigación encaminados al estudio de la interacción de las NPs de TiO₂ con células y tejidos bucales es limitada debido a que este tipo de materiales se usaban en otras áreas de aplicación, como fotocalizadores o portadores de carga por mencionar algunos. Las publicaciones están orientados a pruebas de citotoxicidad en otro tipo de células somáticas (no provenientes de la cavidad oral) y órganos que pueden ser afectados durante los métodos de síntesis o manipulación de las NPs. Por lo anterior, es de suma importancia revisar los resultados con los que se cuenta hasta el momento, ya que uno de los temas científicos de gran relevancia es la creación de biomateriales odontológicos basados en NPs.

La evidencia con la que se cuenta hasta el momento sugiere que las NPs de TiO₂ en cultivos de células de la cavidad oral no producen un efecto citotóxico y al parecer estimulan el crecimiento celular a bajas concentraciones (hormesis). Este comportamiento puede ser atribuido a la aglomeración de las NPs al entrar en contacto con el cultivo celular. De manera general, en los resultados de los estudios en células *in vitro* se observa cierto grado de biocompatibilidad, siendo un paso importante en el campo científico encaminado al uso de las NPs de TiO₂ en odontología que debe ser extrapolado a un sistema *in vivo* tomado un cuenta todas las condiciones inherentes para realizar estos estudios.

Por otro lado, la investigación clínica sugiere que un efecto pro-inflamatorio en fibroblastos gingivales humanos es ocasionado por el uso de NPs de TiO₂ en ausencia de interleucina-1 β ; y podría agravarse en pacientes con enfermedades bucales inflamatorias crónicas.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto UNAM-DGAPA, PAPIIME: PE201617 y PAPIIT: IA204516. Red Farmoquímicos, CONACyT.

REFERENCIAS

1. **Uskokovic V.** Entering the era of nanoscience: time to be so small. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9: 1441–1470.
2. **Olenin AY, Lisichkin G V.** Metal nanoparticles in condensed media: preparation and the bulk and surface structural dynamics. *Russ Chem Rev* 2011; 80: 605–630.
3. **Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL.** Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 2006; 92: 174–185.
4. **Xue C, Wu J, Lan F, Liu W, Yang X, Zeng F, Xu H.** Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J Nanosci Nanotechnol* 2010; 10: 8500–8507.
5. **Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, Von Goetz N.** Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 2242–2250.
6. **Yang P, Gai S, Lin J.** Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chem Soc Rev* 2012; 41: 3679–3698.
7. **Rosenholm JM, Meinander A, Peuhu E, Niemi R, Eriksson JE, Sahlgrén C, Lindén M.** Targeting of porous hybrid silica nanoparticles to cancer cells. *ACS Nano* 2008; 3: 197–206.
8. **Choi Y-E, Kwak J-W, Park J-W.** Nanotechnology for early cancer detection. *Sensors* 2010; 10: 428–455.
9. **Youns M, D Hoheisel J, Efferth T.** Therapeutic and diagnostic applications of nanoparticles. *Curr Drug Targets* 2011; 12: 357–365.
10. **Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC.** Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83: 761–769.

11. **Szaciłowski K, Macyk W, Drzewiecka-Matuszek A, Brindell M, Stochel G.** Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *Chem Rev* 2005; 105: 2647–2694.
12. **Sul Y-T.** Electrochemical growth behavior, surface properties, and enhanced in vivo bone response of TiO₂ nanotubes on microstructured surfaces of blasted, screw-shaped titanium implants. *Int J Nanomedicine* 2010; 5: 87.
13. **Patri A, Umbreit T, Zheng J, Nagashima K, Goering P, Francke-Carroll S, Gordon E, Weaver J, Miller T, Sadrieh N, McNeil S, Stratmeyer M.** Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. *J Appl Toxicol* 2009; 29: 662–672.
14. **Wiesenthal A, Hunter L, Wang S, Wickliffe J, Wilkerson M.** Nanoparticles: small and mighty. *Int J Dermatol* 2011; 50: 247–254.
15. **Montazer M, Behzadnia A, Pakdel E, Rahimi MK, Moghadam MB.** Photo induced silver on nano titanium dioxide as an enhanced antimicrobial agent for wool. *J Photochem Photobiol B Biol* 2011; 103: 207–214.
16. **Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF.** Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 79: 179–192.
17. **IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans* 2006; 86: 1–9.
18. **Thurn KT, Arora H, Paunesku T, Wu A, Brown EMB, Doty C, Kremer J, Woloschak G.** Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine* 2011; 7: 123–130.
19. **Oberdorster G.** Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol* 1996; 8: 73–89.
20. **Filipe P, Silva JN, Silva R, De Castro JLC, Gomes MM, Alves LC, Santus R, Pinheiro T.** Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharmacol Physiol* 2009; 22: 266–275.
21. **Jawad H, Boccaccini AR, Ali NN, Harding SE.** Assessment of cellular toxicity of TiO₂ nanoparticles for cardiac tissue engineering applications. *Nanotoxicology* 2011; 5: 372–380.
22. **Li S-Q, Zhu R-R, Zhu H, Xue M, Sun X-Y, Yao S-D, Wang SL.** Nanotoxicity of TiO (2) nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3626–3631.
23. **Cho W-S, Duffin R, Bradley M, Megson IL, MacNee W, Lee JK, Jeong J, Donaldson K.** Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10: 55.
24. **Jin C-Y, Zhu B-S, Wang X-F, Lu Q-H.** Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 1871–1877.
25. **García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna PA, Mendieta-Zeron H.** Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J* 2011; 61: 297–301.
26. **Elsaka SE, Hamouda IM, Swain M V.** Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: influence on physical and antibacterial properties. *J Dent* 2011; 39: 589–598.
27. **Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group.** Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 2009; 6: e1000097.
28. **Chen X, Mao SS.** Synthesis of titanium dioxide (TiO₂) nanomaterials. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6: 906–925.
29. **Sugimoto T, Zhou X, Muramatsu A.** Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by gel-sol method: 3. Formation process and size control. *J Colloid Interface Sci* 2003; 259: 43–52.
30. **Sugimoto T, Zhou X.** Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by the Gel-Sol method: 2. adsorption of OH⁻ ions to Ti (OH) 4 gel and TiO₂ particles. *J Colloid Interface Sci* 2002; 252: 347–353.
31. **Sugimoto T, Okada K, Itoh H.** Synthetic of uniform spindle-type titania particles by the gel-sol method. *J Colloid Interface Sci* 1997; 193: 140-143.

32. Sugimoto T, Zhou X, Muramatsu A. Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by gel-sol method: 4. Shape control. *J Colloid Interface Sci* 2003; 259: 53–61.
33. Sugimoto T, Zhou X, Muramatsu A. Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by gel-sol method: 1. Solution chemistry of Ti (OH)_n (4–n)⁺ complexes. *J Colloid Interface Sci* 2002; 252: 339–346.
34. Su C, Hong B-Y, Tseng C-M. Sol-gel preparation and photocatalysis of titanium dioxide. *Catal Today* 2004; 96: 119–126.
35. Wetchakun N, Phanichphant S. Effect of temperature on the degree of anatase-rutile transformation in titanium dioxide nanoparticles synthesized by the modified sol-gel method. *Curr Appl Phys* 2008; 8: 343–346.
36. Do Kim K, Kim SH, Kim HT. Applying the Taguchi method to the optimization for the synthesis of TiO₂ nanoparticles by hydrolysis of TEOT in micelles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2005; 254: 99–105.
37. Lin J, Lin Y, Liu P, Meziari MJ, Allard LF, Sun Y-P. Hot-fluid annealing for crystalline titanium dioxide nanoparticles in stable suspension. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 11514–11518.
38. Zhang D, Qi L, Ma J, Cheng H. Formation of crystalline nanosized titania in reverse micelles at room temperature. *J Mater Chem*. 2002; 12: 3677–3680.
39. Lim KT, Hwang HS, Ryoo W, Johnston KP. Synthesis of TiO₂ nanoparticles utilizing hydrated reverse micelles in CO₂. *Langmuir* 2004; 20: 2466–2471.
40. Li Y, Lee N-H, Hwang D-S, Song JS, Lee EG, Kim S-J. Synthesis and characterization of nano titania powder with high photoactivity for gas-phase photo-oxidation of benzene from TiOCl₂ aqueous solution at low temperatures. *Langmuir* 2004; 20: 10838–10844.
41. Zane A, Zuo R, Villamena FA, Rockenbauer A, Foushee AMD, Flores K, Dutta PK, Nagy A. Biocompatibility and antibacterial activity of nitrogen-doped titanium dioxide nanoparticles for use in dental resin formulations. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 6459.
42. Rossi S, Tirri T, Paldan H, Kuntsi-Vaattovaara H, Tulamo R, Närhi T. Peri-implant tissue response to TiO₂ surface modified implants. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 348–355.
43. Teubl BJ, Schimpel C, Leitinger G, Bauer B, Fröhlich E, Zimmer A, Roblegg E. Interactions between nano-TiO₂ and the oral cavity: Impact of nanomaterial surface hydrophilicity/hydrophobicity. *J Hazard Mater* 2015; 286: 298–305.
44. Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Kanda Y, Nakajima H, Sakagami H. Induction of prostaglandin E2 production by TiO₂ nanoparticles in human gingival fibroblast. *In Vivo* 2014; 222: 217–222.
45. Best M, Phillips G, Fowler C, Rowland J, Elsom J. Characterisation and cytotoxic screening of metal oxide nanoparticles putative of interest to oral healthcare formulations in non-keratinised human oral mucosa cells in vitro. *Toxicol in Vitro* 2015; 30: 402–411.
46. Demetrescu I, Pirvu C, Mitran V. Effect of nano-topographical features of Ti/TiO₂ electrode surface on cell response and electrochemical stability in artificial saliva. *Bioelectrochemistry* 2010; 79: 122–129.
47. Ma Q, Wang W, Chu P. K, Mei S, Ji K, Jin, L, Zhang Y. Concentration-and time-dependent response of human gingival fibroblasts to fibroblast growth factor 2 immobilized on titanium dental implants. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 1965–1975.
48. Giovanni M, Tay CY, Setyawati MI, Xie J, Ong CN, Fan R, Yue J, Zhang L, Leong DT. Toxicity profiling of water contextual zinc oxide, silver, and titanium dioxide nanoparticles in human oral and gastrointestinal cell systems. *Environ Toxicol* 2015; 30: 1459–1469.
49. Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Ando Y, Kanda Y, Hibino Y, Nakajima H, Sakagami H. Effects of TiO₂ nanoparticles on cytotoxic action of chemotherapeutic drugs against a human oral squamous cell carcinoma cell line. *In Vivo* 2014; 28: 209–215.
50. Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Kanda Y, Nakajima H, Sakagami H. Effects of TiO₂ nano glass ionomer cements against normal and cancer oral cells. *In Vivo* 2014; 28: 895–907.

51. **Samiei M, Ghasemi N, Aghazadeh M, Divband B, Akbarzadeh F.** Biocompatibility of mineral trioxide aggregate with TiO₂ nanoparticles on human gingival fibroblasts. *J Clin Exp Dent* 2017; 9: 182–185.
52. **Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schneckeburger J.** Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1123-1136.
53. **Garcia-Contreras R, Sugimoto M, Umemura N, Kaneko M, Hatakeyama Y, Soga T, Tomita M, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Nakajima H.** Alteration of metabolomic profiles by titanium dioxide nanoparticles in human gingivitis model. *Biomaterials* 2015; 57: 33–40.
54. **Teubl B, Leitinger G, Schneider M, Lehr CM, Fröhlich E, Zimmer A, Roblegg E.** The buccal mucosa as a route for TiO₂ nanoparticle uptake. *Nanotoxicol* 2015; 9: 253-261.
55. **Mano SS, Kanehira K, Taniguchi A.** Comparison of cellular uptake and inflammatory response via toll-like receptor 4 to lipopolysaccharide and titanium dioxide nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 13154–13170.
56. **Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK.** Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007; 2: 2692.