

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Análisis comparativo de la citotoxicidad de
nanopartículas de óxido de zinc y su efecto en el
ciclo celular de fibroblastos, osteoblastos y
melanoma**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Gloria Salinas Lucero

Ensenada, Baja California, México

2020

Tesis defendida por

Gloria Salinas Lucero

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Directora de tesis

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dr. Rafael Vázquez Duhalt



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Gloria Salinas Lucero © 2020

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

Resumen de la tesis que presenta Gloria Salinas Lucero como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Análisis comparativo de la citotoxicidad de nanopartículas de óxido de zinc y su efecto en el ciclo celular de fibroblastos, osteoblastos y melanoma

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Directora de tesis

En los últimos años, se ha incrementado exponencialmente la síntesis y aplicación de los nanomateriales en productos comerciales por lo que el hombre, los animales y el medio ambiente están expuestos a una cantidad y diversidad cada vez mayor de este tipo de materiales. Los usos de las nanopartículas de óxido de zinc (NPs de ZnO) están principalmente en el área farmacéutica, cosmética y de alimentación. Es por ello que en este trabajo se analizó y comparó la citotoxicidad, y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en diferentes líneas celulares de tejido conectivo de ratón: fibroblastos (L929), cáncer de piel (melanoma, B16-F10) y pre-osteoblastos (MC3T3-E1), expuestas a diferentes concentraciones de dos tamaños distintos de NPs de ZnO. Además se evaluó el efecto que las NPs de ZnO ocasionan en la proporción de células presentes en las distintas fases del ciclo celular. Se realizó una caracterización fisicoquímica de las NPs de ZnO, utilizando DLS, espectrofotometría UV-Vis y TEM. Los resultados de este trabajo permitieron distinguir una citotoxicidad diferencial asociada al tamaño de las NPs de ZnO siendo las de 27 nm más citotóxicas para la línea celular de melanoma (B16-F10), lo cual se relacionó al incremento en la producción intracelular de ROS. Mientras que las NPs con un tamaño de 39 nm, ocasionaron una citotoxicidad dependiente de la concentración en los pre-osteoblastos y fibroblastos, respectivamente. Las NPs de ZnO de 27 nm y 39 nm ocasionaron un arresto del ciclo celular en la fase G₂/M en todas las líneas celulares, exceptuando en la línea celular de fibroblastos (L929) expuestas a las NPs de 27 nm que ocasionaron un arresto en la fase S del ciclo celular. Los resultados de este trabajo de nanotoxicología proporcionan mayores evidencias sobre el impacto en el ciclo celular en distintos tipos de linajes celulares y su dependencia con los diferentes tamaños de las NPs de ZnO.

Palabras clave: citotoxicidad, NPs de ZnO, ciclo celular, nanotoxicología

Abstract of the thesis presented by Gloria Salinas Lucero as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanosciences.

Comparative analysis of the cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles and its effect on the cell cycle of fibroblasts, osteoblasts and melanoma

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Thesis Director

In recent years, the nanomaterials synthesis and their application in commercial products have increased exponentially, as consequence man, animals and the environment are exposed to increasing quantities of a diversity of nanomaterials. The applications of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) are mainly in the pharmaceutical, cosmetic and food areas. Thus, in this work the cytotoxicity and the production of reactive oxygen species (ROS) were analyzed and compared in different mouse connective tissue cell lines: fibroblasts (L929), skin cancer (melanoma, B16-F10) and pre-osteoblasts (MC3T3-E1), that were exposed to different concentrations of two different sizes of ZnO NPs. Also, the ZnO NPs effect on the proportion of cells present in the different phases of the cell cycle was evaluated. The physicochemical characterization of the ZnO NPs was carried out using DLS, spectrophotometry and TEM. The results from this work showed a differential cytotoxicity associated with the size of the ZnO NPs, being those of 27 nm more cytotoxic for the melanoma cell line (B16-F10), which was related to the increase in the intracellular production of ROS. On the other side, the NPs with a size of 39 nm caused concentration-dependent cytotoxicity in pre-osteoblasts and fibroblasts, respectively. The 27 nm and 39 nm ZnO NPs caused a cell cycle arrest in the G₂/M phase in all cell lines, except in the fibroblast cell line (L929) exposed to the 27 nm NPs that caused an arrest in the S phase of the cell cycle. This nanotoxicological work provide significant evidence on the effect of ZnO NPs size on the cell cycle of different types of cell lineages.

Keywords: cytotoxicity, ZnO NPs, cell cycle, nanotoxicology

Dedicatoria

A mi familia, a mi Esposo y a mi Bebé Rogelio

Agradecimientos

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) y al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por abrirme las puertas para realizar un posgrado. A mis profesores y al personal que laboran en los centros por su apoyo durante mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por aportarme una beca de estudios para realizar la maestría, con número de registro 844726.

Al proyecto CONACYT INFR-269071 y al Proyecto de Cátedras No. 53 “Nanotoxicología: evaluación toxicológica de los nanomateriales”.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del CICESE por el uso del TEM y la toma de las micrografías electrónicas.

Quiero agradecer a mi asesora la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno por su constante e invaluable apoyo durante el desarrollo de esta investigación. Gracias por todo el conocimiento brindado, por estar presente en los momentos importantes de mi vida y gracias por ofrecerme lo mejor y buscar lo mejor para mi persona.

Agradezco a los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Alejandro Huerta Saquero, la Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández, la Dra. Ernestina Castro Longoria y al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por sus valiosas contribuciones en mis avances de tesis.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bionanotecnología del CNyN UNAM, bajo la dirección de la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno.

Quiero dar las gracias a la Dra. Katrin Quester por todo su apoyo y amistad a lo largo de mi estancia en el departamento de Bionanotecnología.

Agradezco a mi familia Salinas Lucero, quienes siempre me dan un apoyo incondicional en cada meta que me propongo.

Agradezco a la familia Orozco Duarte por apoyarme en todo momento en mi estancia en Ensenada, en especial a mi esposo Rogelio por brindarme su apoyo, cariño y comprensión, a lo largo de estos años. A mi Bebé Rogelio por ser fuente de motivación e inspiración.

Agradezco a mis compañeros y amigos quienes sin esperar nada a cambio compartieron conmigo sus conocimientos, alegrías, tristezas y a todas las personas quienes estuvieron apoyándome durante estos dos años y lograr que este sueño se haga realidad.

Agradezco al grupo de Nanotox Lab por brindarme su apoyo incondicional por sentar en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	
1.1. La nanotecnología, los nanomateriales y sus aplicaciones	1
1.2. La nanotoxicología y las propiedades de los nanomateriales	1
1.3. Ingreso de los nanomateriales al ser vivo	3
1.4. Mecanismos de internalización y citotoxicidad de los nanomateriales .	4
1.5. Procesos de muerte celular	5
1.6. El ciclo celular	6
1.7. Genes de regulación del ciclo celular	8
1.8. Citometría de flujo como estudio y análisis del ciclo celular	10
1.9. Antecedentes	14
1.9.1. Principales nanomateriales en contacto con el ser vivo y su efecto	14
1.9.2. Procesos bioquímicos y biológicos afectados por la exposición a los NMs	16
1.9.3. Efecto de las nanopartículas en el ciclo celular	19
1.10. Hipótesis	26
1.11. Objetivos	27
1.11.1. Objetivo general	27
1.11.2. Objetivos específicos	27
Capítulo 2. Metodología	
2.1. Dispersión de las nanopartículas de óxido de zinc	28
2.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de óxido de zinc .	28
2.2.1. Análisis por dispersión de luz dinámica (DLS)	28
2.2.2. Análisis por Espectroscopía ultravioleta visible	29
2.2.3. Análisis por microscopía electrónica de transmisión	29
2.3. Cultivo celular	30
2.3.1. Subcultivo de células y tratamiento con tripsina	31
2.3.2. Conteo de células mediante el método de exclusión por azul tripano	31
2.4. Ensayos de biocompatibilidad	33
2.4.1. Ensayos de viabilidad celular por reducción del MTT	33
2.4.2. Detección de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en pre-osteoblastos, fibroblastos y melanoma con NPs de ZnO	34

Tabla de contenido (continuación)

2.4.3. Cuantificación de ADN en el ciclo Celular de fibroblastos, osteoblastos y melanoma	36
Capítulo 3. Resultados	
3.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de óxido de zinc .	38
3.1.1. Distribución de tamaños de las ZnO NPs por dispersión de luz dinámica (DLS)	38
3.1.2. Plasmón de resonancia superficial por espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	39
3.1.3. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	40
3.2. Resultados de biocompatibilidad	43
3.2.1. Viabilidad celular en osteoblastos, fibroblastos y melanoma expuestos a diferentes tamaños y concentraciones de ZnO NPs . .	43
3.3. Determinación del estrés oxidativo	45
3.3.1. Estrés oxidativo en osteoblastos, fibroblastos y melanoma con ZnO NPs.	45
3.4. Evaluación del efecto de las NPs de ZnO en el ciclo celular	48
3.4.1. Efecto de las NPs de ZnO en el ciclo celular de osteoblastos, fibroblastos y melanoma	48
Capítulo 4. Discusión	
4.1. Caracterización	55
4.2. Biocompatibilidad	56
4.3. Ciclo celular	60
Capítulo 5. Conclusiones	
Capítulo 6. Perspectivas	
Literatura citada	68
Anexo 1	73
Anexo 2	76

Lista de figuras

Figura	Página
1. Diferentes rutas de ingreso de nanomateriales al cuerpo humano	4
2. Etapas de la mitosis (M)	6
3. Fases del ciclo celular de las células eucariotas	7
4. El ciclo de la división celular y las proteínas involucradas en los puntos de control Golias <i>et al.</i> (2004)	9
5. Dos fantasías opuestas de lo que se trata la citometría de flujo. Dibujos de Givan (2013).	11
6. Propiedades de dispersión de luz de una célula en la técnica de citometría de flujo.	12
7. Subpoblaciones celulares basadas en FSC y SSC, muestra de sangre entera lisada (Becton., et al 2002).	13
8. Espectro de absorción de cuatro fluorocromos comúnmente utilizados en la citometría de flujo (Becton., et al 2002).	14
9. Representación esquemática de la toxicidad celular inducida por las NPs de ZnO	18
10. Mecanismos de las nanopartículas que causan efectos negativos en los procesos bioquímicos	19
11. Análisis del ciclo celular de células WEHI-3B tratadas con ZnO NPs después de la tinción con PI	21
12. Morfología de fibroblastos dérmicos humanos expuestos a NPs de ZnO	22
13. Análisis del ciclo celular en células Jurkat T	24
14. Análisis del porcentaje de distribución de fase del ciclo celular de células HeLa no tratadas y tratadas con NPs de ZnO	26
15. Esquema de la cuadrícula de una cámara de Neubauer	32
16. Estructura de la molécula de azul tripano	32
17. Fases del ciclo celular de una célula eucariota y la distribución de población por citometría de flujo	37
18. Caracterizaciones de NPs de ZnO de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS)	38
19. Caracterización del plasmón de resonancia superficial por espectroscopia ultravioleta-visible	39
20. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los espacios vacíos se marcaron con una flecha color rojo la cual indican que existen poros generados por la inter-aglomeración de las NPs de ZnO.	40
21. Caracterizaciones de NPs de ZnO por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	41

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página
22. Histogramas del tamaño promedio de las NPs de ZnO	42
23. Ensayo de viabilidad celular de pre-osteoblastos (MC3T3), fibroblastos (L929) y melanoma (B16-F10)	44
24. Cuantificación de las ROS producidas en los pre-osteoblastos de ratón (MC3T3-E1), fibroblastos (L929) y células de melanoma (B16-F10)	47
25. Evaluación del efecto de las NPs de ZnO de (a) 27 nm y (b) 39 nm en el ciclo celular de pre-osteoblastos de ratón (MC3T3-E1)	50
26. Evaluación del efecto de las NPs de ZnO de (a) 27 nm y (b) 39 nm en el ciclo celular de fibroblastos de ratón (L929)	52
27. Evaluación del efecto de las NPs de ZnO de (a) 27 nm y (b) 39 nm en el ciclo celular de melanoma de ratón (B16-F10)	54
28. Fotografías de la línea celular de pre-osteoblastos (MC3T3) a diferentes concentraciones de NPs de ZnO	76
29. Fotografías de la línea celular de fibroblastos murinos (L929) a diferentes tratamientos de NPs de ZnO	77
30. Fotografías de la línea celular de melanoma de ratón (B16-F10) a diferentes concentraciones de NPs de ZnO	78

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Análisis de citometría de flujo del porcentaje de células WEHI-3B en las distintas etapas del ciclo celular	20
2. Reactivos y concentraciones para la preparación de la solución salina	73
3. Reactivos y materiales para la preparación del medio DMEM al 10 % de 1 L	74
4. Reactivos y cantidades específicas para preparar MTT	75

Capítulo 1. Introducción

1.1. La nanotecnología, los nanomateriales y sus aplicaciones

La nanotecnología es el estudio y desarrollo de materiales y estructuras a una escala nanométrica, es una ciencia multidisciplinaria ya que integra la ingeniería con la biología, la química y la física. El rango de tamaño de los materiales que se estudian en la nanotecnología, es de 1 a 100 nm, y es identificado por la Iniciativa Norteamericana de Nanotecnología (NNI, por sus siglas en inglés National Nanotechnology Initiative) de EE.UU como el rango de tamaño general donde las propiedades de la materia exhiben interacciones cuánticas diferenciales a las interacciones químicas puras atómicas y de moléculas pequeñas.

Los materiales a esta escala pueden ser de origen natural, incidental o sintético y ser orgánicos e inorgánicos. Algunos de los ejemplos de la amplia gama de nanomateriales (NMs) existentes incluyen a los obtenidos de metales nobles como oro, plata, platino y paladio (Au, Ag, Pt y Pd), nanocristales semiconductores (CdSe, CdS, ZnS, TiO₂, PbS, InP y Si), compuestos magnéticos (Fe₃O₄, FePt y CoPt), nanopartículas luminescentes, nanomateriales de silicio, de carbono y sus combinaciones, entre otros.

Los NMs sintéticos, tienen una gran demanda por sus variadas aplicaciones en la biomedicina para la detección biomolecular y el diagnóstico, etiquetado fluorescente, terapia, ingeniería de tejidos, administración de fármacos/genes, detección bioquímica entre otras aplicaciones (Kansara *et al.*, 2015).

1.2. La nanotoxicología y las propiedades de los nanomateriales

El estudio de la toxicidad de los NMs fue nombrado como nanotoxicología en el 2004 por científicos que estudiaban el efecto de la inhalación de este tipo de materiales y que reportaron estudios sobre sus efectos toxicológicos. La nanotoxicología entonces, se define como el estudio de los efectos adversos de los nanomateriales, principalmente de aquellos obtenidos mediante la ingeniería, en los organismos vivos y en los ecosistemas, esto también incluye la prevención de dichos efectos adversos (Kumar *et al.*, 2018).

Los NMs generan una serie de interacciones con varias entidades biológicas, que incluyen el material genético (ADN y ARN), proteínas, membranas, células y organelos en la interfaz nano-bio (Suh *et al.*, 2009). Dichas interacciones son promovidas por fuerzas coloidales que dependen predominantemente de las propiedades fisicoquímicas y de la superficie dinámica de los NMs y que, además, juegan un papel determinante en su toxicidad. Algunas de las propiedades fisicoquímicas que están estrechamente relacionadas con la toxicidad de los NMs son el tamaño de partícula que, junto con la química superficial, constituyen dos de las propiedades más críticas que impactan la respuesta nanotoxicológica, influyendo significativamente en la interacción celular. Estudios previos han identificado que el mecanismo de endocitosis, el grado de internalización de NMs y el destino final intracelular de éstos, dependen de su diámetro (Sutariya y Pathak, 2014).

En lo que respecta a la citotoxicidad, la mayoría de los estudios concluyen que las nanopartículas más pequeñas inducen un mayor grado de muerte celular (Chen *et al.*, 2018).

Otra de las propiedades fisicoquímicas de importancia, es la química de superficie del NM pues constituye la fuerza impulsora tanto para las interacciones entre partículas como para la formación de la interfaz nanomaterial-célula (interfaz nanocelular), por tanto, la química de superficie regula el mecanismo de contacto celular, el grado de internalización del NM y la citotoxicidad resultante (Kumar *et al.*, 2018).

Algunos estudios han reportado el papel de la química de superficie de los NMs en la citotoxicidad y la respuesta al estrés. Estos estudios han identificado que los NMs cargados positivamente, independientemente de la composición, se internalizan más eficientemente y generan una respuesta tóxica alta en comparación a las partículas cargadas negativa y neutralmente (Suh *et al.*, 2009). Las propiedades citotóxicas, la capacidad de alterar los procesos de las moléculas químicas y biológicas, y las tasas cinéticas de disolución iónica, son factores que dependen mucho de la composición química de un NM (Fröhlich y Salar-Behzadi, 2014).

Se ha reportado que ciertos elementos como el Cu, Zn, Co, Ag, Ni y Cd son más citotóxicos que otros como Au, Ti y Fe (Sutariya y Pathak, 2014). Así como también, se ha explorado el mecanismo detrás de la toxicidad dependiente de la composición

y se ha identificado, que una causa principal de la muerte celular, es un aumento del estrés oxidativo inducido por la generación de iones desde la superficie del NM (Chen *et al.*, 2018).

Por otro lado, las biomoléculas asociadas con el sistema biológico cubren las superficies de los NMs formando una corona. Los componentes proteicos son las biomoléculas más importantes que desarrollan la llamada “corona proteica”. La corona proteica que se forma alrededor del NM le confiere, una identidad biológica, además de que regula sus futuras interacciones dentro del medio biológico. La composición de una corona de proteínas es de naturaleza dinámica y depende de las concentraciones relativas de los distintos constituyentes y sus afinidades hacia la superficie del NM (Kumar *et al.*, 2018). En un sistema biológico, los NMs pueden considerarse estructuras en continua evolución en respuesta a concentraciones fluctuantes de biomoléculas, en donde la corona proteica refleja su propia historia previa antes de estabilizarse (Suh *et al.*, 2009).

1.3. Ingreso de los nanomateriales al ser vivo

Los NMs pueden ingresar al cuerpo humano por diferentes rutas que incluyen, la inhalación, la ingestión, o la exposición dérmica (**Figura 1**). La captación por inhalación ocurre en las tres partes del tracto respiratorio: la región nasofaríngea, la región traqueobronquial y la región alveolar. La absorción en las tres regiones produce inflamación y se producen efectos que son exclusivos de los nanoquímicos específicos que se absorben. En consecuencia, cada NM debe analizarse para determinar sus efectos tóxicos. Se ha reportado que algunas nanopartículas (NPs) desencadenan reacciones de tipo asmático, mientras que otras empeoran la lesión pulmonar (Kumar *et al.*, 2018). Otra de la ruta de ingreso de los NMs es la ingestión, y se da cuando están presentes en los alimentos o el agua que se consume. Después de la ingestión, las NPs pueden pasar a la sangre y ser transportadas a otros órganos del cuerpo, incluidos el hígado, el bazo, los riñones, la médula ósea, el cerebro y otros tejidos nerviosos (Hobson y Guy, 2014). En la exposición dérmica, las NPs pueden ser absorbidas a través de la piel e ingresar al cuerpo a través de las heridas. Una vez absorbidas, las NPs se traslocan a los ganglios linfáticos y finalmente al torrente sanguíneo donde se distribuyen a todo el cuerpo (Kumar *et al.*, 2018).

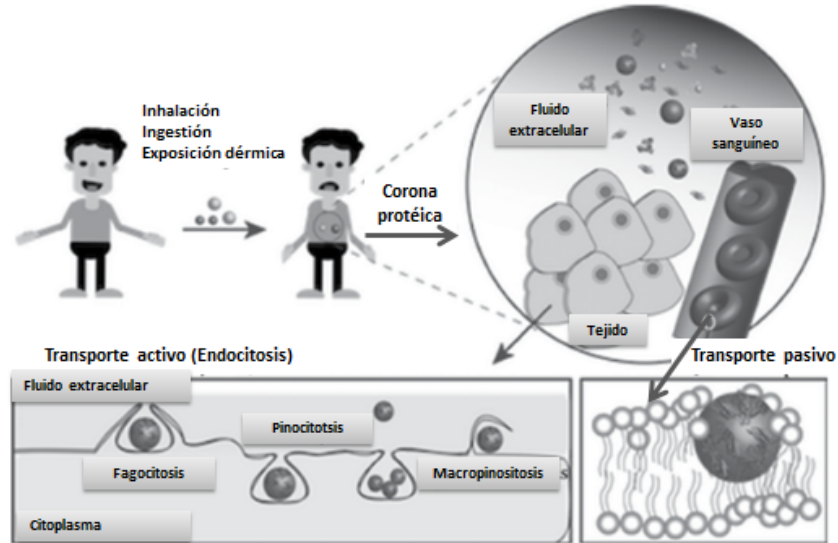


Figura 1. Los nanomateriales pueden ingresar al cuerpo humano por diferentes rutas que incluyen, la inhalación, la ingestión, o la exposición dérmica. Después de la entrada al cuerpo, las macromoléculas de los fluidos corporales rodean a los nanomateriales creando una corona protéica, causando modificaciones en la interacción entre el nanomaterial y la célula Kumar *et al.* (2018).

1.4. Mecanismos de internalización y citotoxicidad de los nanomateriales

Los mecanismos de internalización celular de los NMs funcionalizados con ligandos biológicos se da a través de los diferentes receptores celulares asociados a la membrana celular. En este transporte activo por endocitosis mediada por receptores, se forman vesículas también conocidas como endosomas, que transportan selectivamente a sus cargos, en este caso a los NMs. Es así como, los NMs se transportan a través de las células mediante endocitosis y exocitosis. Según el tamaño de las vesículas de transporte y las propiedades de la carga y la maquinaria de internalización, son posibles diferentes tipos de mecanismos endocíticos. En algunos casos, se ha observado que los NMs pueden ingresar a las células mediante la penetración pasiva a través de la membrana celular como se observa en la **(Figura 1)**. Está bien documentado que después de que un NM se ha internalizado en una célula, existen diversos mecanismos que pueden causar citotoxicidad (Kumar *et al.*, 2018).

Los efectos tóxicos intracelulares de los NMs provienen de su capacidad para inducir la producción de una cantidad excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species). Las ROS incluyen radicales libres tales como el anión superóxido (O_2^\bullet), radicales hidroxilo ($^\bullet OH$), el singulete de oxígeno (1O_2) y el peróxido

de hidrógeno (H_2O_2), que se generan constantemente en las células en condiciones normales como consecuencia del metabolismo aeróbico (Suh *et al.*, 2009). Debido a su alta reactividad química, las ROS pueden reaccionar con el ADN, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos de manera destructiva, induciendo la muerte celular por apoptosis o necrosis. Otro mecanismo molecular es la genotoxicidad, que es el efecto que posee una sustancia (en este caso un NM) para dañar el material genético de una célula (ADN ó ARN) (Kumar *et al.*, 2018).

1.5. Procesos de muerte celular

Se conocen cuatro procesos de muerte celular que son: apoptosis, autofagia, necrosis y necroptosis. La apoptosis fue descrita por primera vez por Kerr *et al.* , y se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos específicos de las células moribundas, que incluyen el encogimiento celular, la condensación, la fragmentación, la formación dinámica de membranas y la pérdida de adhesión a la matriz extracelular. Se ha reportado que una gran cantidad de NMs, son capaces de provocar una muerte celular por apoptosis. La autofagia es un proceso catabólico evolutivamente conservado que comienza con la formación de autofagosomas que son estructuras esféricas, que rodean a macromoléculas y orgánulos citoplasmáticos que han sido destinados para el reciclaje intracelular. En general la autofagia desempeña un papel crucial para la supervivencia en la homeostasis celular (Chen *et al.*, 2018).

La necrosis es un tipo de muerte celular, mayoritariamente presente durante la inflamación o por un daño o rompimiento (lisis) abrupto en las células, por ejemplo, en el caso de un golpe o herida, por lo tanto, este tipo de muerte celular juega un papel importante durante la preservación de la homeostasis del tejido y la eliminación de las células dañadas (Chen *et al.*, 2018). Existe otro tipo de muerte celular, denominada necroptosis, la cual se ha descubierto que contribuye a la regulación del sistema inmunológico, el cáncer y las respuestas celulares (Chen *et al.*, 2018). Estos cuatro procesos de muerte celular pueden ser provocados por la exposición a NMs, ya sea por contacto directo o bien porque éstos sean capaces de ingresar a la célula mediante distintas vías de internalización, como las ilustradas en la **(Figura 1)** (Kumar *et al.*, 2018).

1.6. El ciclo celular

Se conoce como ciclo celular a los eventos ordenados que permiten el crecimiento y la división de las células, y está compuesto por cuatro fases principales que se ilustran en la **Figura 3**, y que en resumen abarcan las etapas G₁, S, G₂ y M. Durante el ciclo de las células somáticas de los mamíferos, las etapas tempranas de la fase G₁ se caracterizan porque las células aumentan de tamaño, forma, sintetizan los ARNs y las proteínas necesarias para la síntesis del ADN. Cuando las células han alcanzado el tamaño adecuado y han sintetizado las proteínas requeridas, las células ingresan al ciclo celular atravesando la fase G₁. Una vez que cruzaron este punto, las células empiezan su división celular e inician su entrada a la fase S (Síntesis, S), este es un periodo en el que las células replican activamente sus cromosomas. Posterior a ello, se da lugar a la fase G₂, que es un periodo de rápido crecimiento celular y síntesis de proteínas durante el cual la célula se prepara para la fase de la mitosis. En la fase de la mitosis (M) comienza el complicado proceso el cual se divide en varias etapas que se ilustran en la **Figura 2** (Vermeulen *et al.*, 2003).

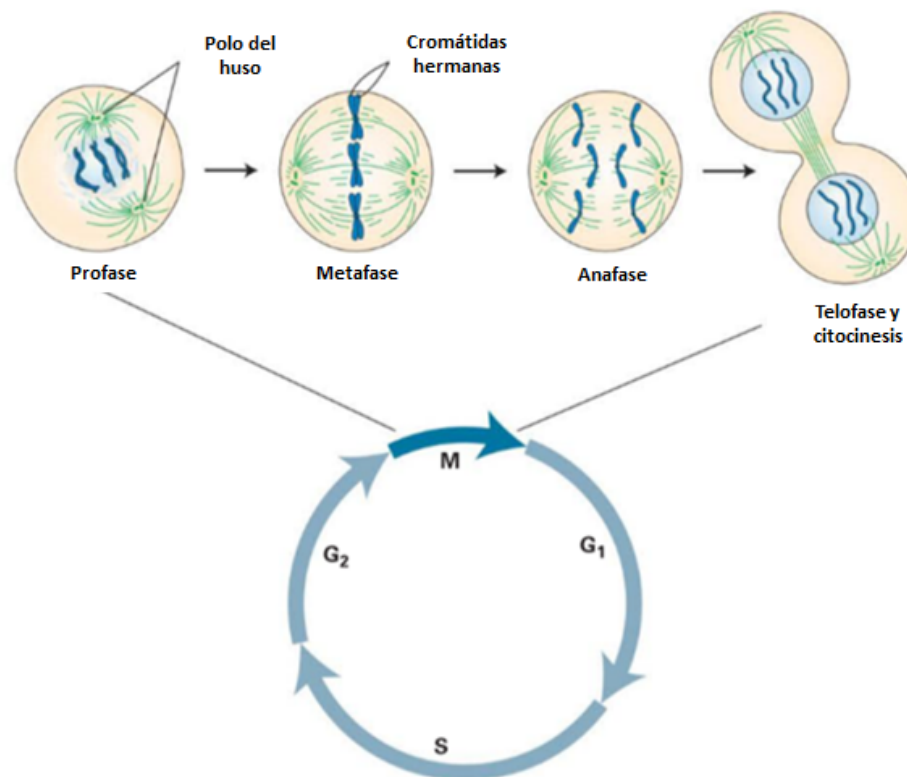


Figura 2. En las etapas de la mitosis (M), durante la profase la envoltura nuclear se rompe, los microtúbulos forman el huso mitótico y los cromosomas se condensan Vermeulen *et al.* (2003)

La mitosis o fase M, es un proceso básico para todos los organismos, durante la fase M ocurre el proceso de división celular que consiste en una división del núcleo (cariocinesis) y una división del citoplasma (citoquinesis) (**Figura 2**). Las etapas de la mitosis (M), involucran la profase, que se caracteriza porque la envoltura nuclear se rompe, los microtúbulos forman el huso mitótico y los cromosomas se condensan. En la metafase, se completa la unión de los cromosomas con la ayuda de los cinetocoros. Durante la anafase los cromosomas duplicados son separados y las cromátidas son desplazadas a polos opuestos de la célula mediante el huso mitótico, con la finalidad de que cada célula hija herede una copia de cada cromosoma. Por último, en la telofase se forman las nuevas envolturas nucleares, para dar lugar a la citocinesis, que consiste en la separación física del citoplasma en dos células hijas durante la división celular. La mitosis por ende es esencial para mantener el número de cromosomas y generar nuevas células para el crecimiento, conservación y reparación de los organismos; este proceso se lleva a cabo tanto en células diploides como haploides. La mayor parte de la actividad metabólica y funciones de la célula, tales como la transcripción y la traducción, están notablemente disminuidas durante esta fase. En la mayoría de las células eucariotas la fase M tiene un tiempo de duración de aproximadamente 1 h, tiempo muy corto cuando se compara con la duración total del ciclo celular (Vermeulen *et al.*, 2003).

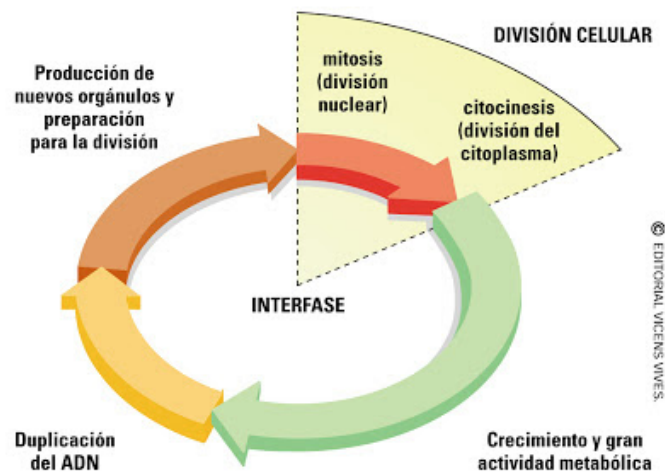


Figura 3. Fases del ciclo celular de las células eucariotas. Las células comienzan a aumentar de tamaño en la fase Gap 1 (G1). La replicación del ADN ocurre durante la fase de síntesis (S). Durante la Gap 2 (G2) entre la síntesis de ADN y la mitosis, las células continúan creciendo Vermeulen *et al.* (2003)

1.7. Genes de regulación del ciclo celular

Las ventajas recientes en el campo de la progresión del ciclo celular han ampliado nuestro conocimiento del mecanismo de proliferación celular sus bases moleculares. Se consideran dos grandes grupos de factores involucrados en el control del ciclo celular: extracelular (señales ambientales, es decir, factores de crecimiento) e intracelular (oncogenes y anti-oncogenes). Además, una gran cantidad del trabajo se ha centrado en cómo los oncogenes y los genes supresores de tumores regulan el ciclo celular durante el desarrollo normal y en el cáncer (Prober y Edgar, 2001).

La función de los genes que regulan el ciclo celular está dirigida básicamente a controlar mecanismos de aceleración y frenado de las diferentes etapas durante el ciclo celular. Es de gran importancia centrarse en los puntos de control o las vías supresoras de tumores como sistemas de transducción de señales negativas que pueden inducir el arresto del ciclo celular. Los puntos de control evitan cualquier transición de ciclo hasta que el ADN y otras condiciones celulares hagan que dicha progresión sea segura. La mayor parte de lo que sabemos sobre la regulación del ciclo celular provino originalmente de organismos eucarióticos unicelulares modelo como las levaduras (Golias *et al.*, 2004).

Uno de los primeros genes identificados como un importante regulador del ciclo celular en la levadura es *cdc2/cdc28*. La activación de este gen requiere asociación con una subunidad reguladora llamada ciclina A. Ahora se sabe que la activación e inactivación secuencial de la ciclina dependiente de cinasas (cdks) es uno de los principales mecanismos de regulación del ciclo celular (**Figura 4**) (Vermeulen *et al.*, 2003).

La proteína de punto de control en el ciclo celular o gen p53 codifica un importante supresor de tumores cuya inactivación se considera un paso crítico en la tumorigénesis (Innocente *et al.*, 1999). Las mutaciones en este gen están presentes en más de la mitad de todos los tumores en humanos (Lopez-Saez, 1998). El producto del gen p53, es un importante regulador del ciclo celular en los puntos de control G1 / S y G2 / M. El gen supresor de tumores p53 está comúnmente mutado en las células de cáncer en humanos, lo que indica su papel importante en la conservación de la progresión del ciclo celular normal (El-Deiry *et al.*, 1993).

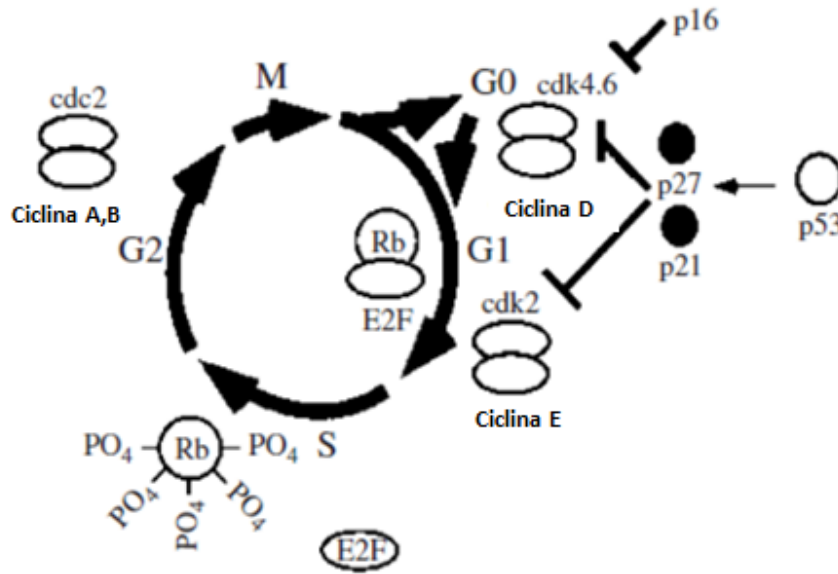


Figura 4. El ciclo de la división celular y las proteínas involucradas en los puntos de control Golias *et al.* (2004)

Las secuencias amino-terminales de p53 funcionan como un dominio de activación transcripcional y las secuencias carboxilo-terminal parecen ser necesarias para que p53 forme dímeros y tetrámeros consigo mismo. Se ha demostrado que p53 activa la transcripción de genes con funciones en el control del ciclo celular, incluido WAF1 / CIP1 / p21 (que codifica un regulador de Actividad de Cdk) (8), GADD45 (un gen), MDM2 (codifica una proteína que es un regulador negativo conocido de p53) (**Figura 4**) (Golias *et al.*, 2004).

Una de las funciones esenciales de p53 es suprimir el crecimiento tumoral mediante dos mecanismos distintos. El primer mecanismo de la proteína p53 es inducir, la apoptosis, una vía estrictamente regulada de la muerte celular programada que implica cambios en la fisiología mitocondrial, activación de la cisteína proteasa, degradación del ADN y cambios en la morfología celular. La sobreexpresión de p53 induce la apoptosis y la inactivación de p53 conduce a una disminución de la apoptosis causada por la radiación- γ . Asimismo, la proteína de p53 previene el crecimiento al detener el ciclo celular, así como también inhibe la transición de la fase G1/S en células expuestas a agentes que dañan el ADN al causar la acumulación de p21^{CIP1/WAF1}, una proteína que se une e inactiva las cinasas dependientes de ciclinas necesarias para iniciar la síntesis de ADN. De igual importancia, p53 regula un punto de control del huso mitótico que

previene la síntesis de ADN antes de la segregación cromosómica. La pérdida de estos puntos de control en células deficientes en p53 puede provocar poliploidía, roturas cromosómicas y amplificación del centrosoma, lo que indica que los puntos de control contribuyen al mantenimiento de la integridad del ADN (Innocente *et al.*, 1999).

1.8. Citometría de flujo como estudio y análisis del ciclo celular

La citometría de flujo es una técnica de análisis cuantitativo de células individuales la cual se basa en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas, presencia de biomarcadores y en la ingeniería de proteínas. La **Figura 5** es una comparación pictórica entre la citometría de flujo que se desarrolló en la década de 1970 y el citómetro de flujo que rápidamente se convirtió en un instrumento esencial para las ciencias biológicas. Impulsados por la pandemia del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y una gran cantidad de descubrimientos en hematología, varios fabricantes desarrollaron citómetros de flujo especializados para su uso en el laboratorio clínico. La principal aplicación clínica de la citometría de flujo es un diagnóstico de neoplasia maligna hematológica, pero existe una amplia variedad de otras aplicaciones, como el conteo de reticulocitos y el análisis de la función celular (Shapiro, 2005).

También la citometría de flujo ha sido adaptada para la medición y el análisis de varios componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, etc.), organelos (lisosomas, mitocondrias, etc.) o funciones (viabilidad celular, actividades enzimáticas, etc). Sin embargo, en la actualidad, muchas aplicaciones permanecen basadas en inmunofluorescencia o estudios de contenido de ADN celular. Esta última técnica ha contribuido ampliamente a mejorar el conocimiento sobre el ciclo celular, al medir fluorocromos que se unen específicamente al material genético y que de acuerdo a las condiciones de tinción, la fluorescencia emitida es proporcional al contenido de ADN presente en las células y por lo tanto a una fase específica del ciclo celular. Los algoritmos matemáticos y el software adaptado para analizar los histogramas de distribución celular se utilizan para estimar rápidamente la cantidad de células que se encuentran en las diversas fases del ciclo celular. Sin embargo, estos análisis monoparamétricos no discriminan células por su metabolismo, sino con el mismo contenido de ADN (Jayat

y Ratinaud, 1993).

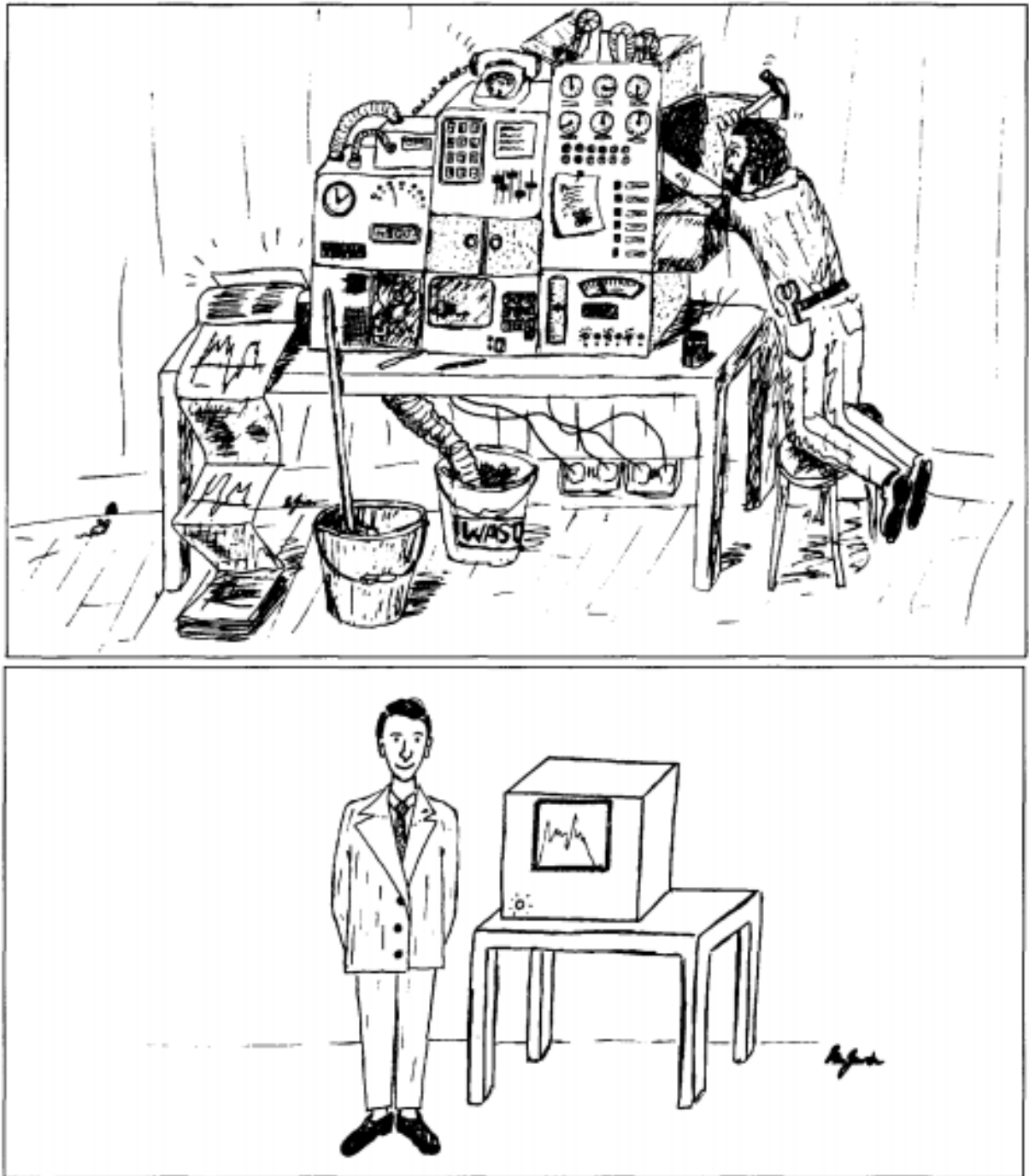


Figura 5. Dos fantasías opuestas de lo que se trata la citometría de flujo. Dibujos de Givan (2013).

El citómetro de flujo detecta las muestras y procesa las señales mediante la dispersión de la luz que es cuando una partícula desvía la luz láser incidente, a medida en que esto ocurre, dependerá de las propiedades físicas de una partícula, es decir, su

tamaño y complejidad interna. Los factores que afectan la dispersión de la luz son la membrana celular, núcleo y cualquier material granular dentro de la célula. La forma de la célula y su topografía superficial también contribuyen a la dispersión total de la luz. La luz dispersada hacia adelante o detectada por la dispersión frontal (por sus siglas en inglés Forward- Scattered light, FSC), es proporcional al área o tamaño de la superficie celular. El FSC es una medida de luz difractada que en su mayoría se detecta justo fuera del eje del rayo láser incidente en la dirección hacia adelante mediante un fotodiodo (**Figura 6**). El FSC es un método adecuado para detectar partículas (o células) independientemente de su fluorescencia, y por lo tanto, a menudo se usa como herramienta para el inmunofenotipo celular (Dickinson, 2002).

Existe otro cálculo igualmente importante que es cuantificado por el citómetro de flujo, y se conoce como luz de dispersión lateral o detector de dispersión lateral (por sus siglas en inglés Side-Scattered light, SSC), el cual es proporcional a la granularidad o complejidad interna de la célula. El SSC es una medida de luz principalmente refractada y reflejada que ocurre en cualquier interfaz dentro de la célula donde hay un cambio en el índice de refracción (**Figura 6**). El SSC se recolecta aproximadamente a 90° con respecto al rayo láser mediante una lente de recolección y luego se redirige mediante un divisor de rayos al detector apropiado (Dickinson, 2002).

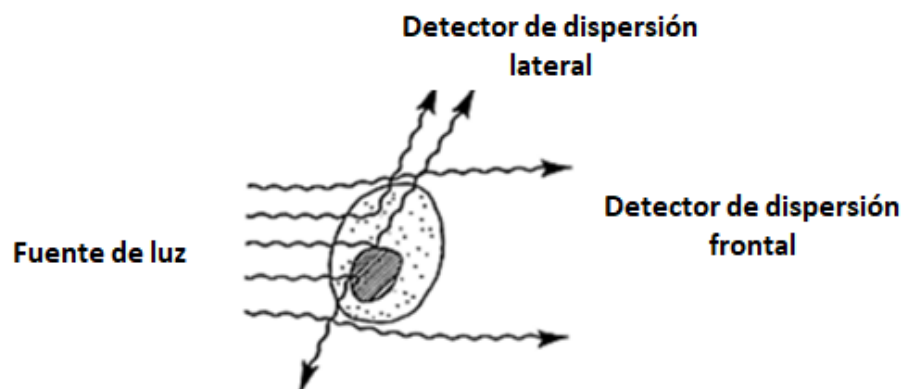


Figura 6. Propiedades de dispersión de luz de una célula en la técnica de citometría de flujo.

Asimismo, las mediciones correlacionadas de FSC y SSC pueden permitir distinguir los tipos de células en una población celular heterogénea. Como ejemplo tenemos, que las principales subpoblaciones de leucocitos se pueden diferenciar utilizando FSC y SSC (**Figura 7**).

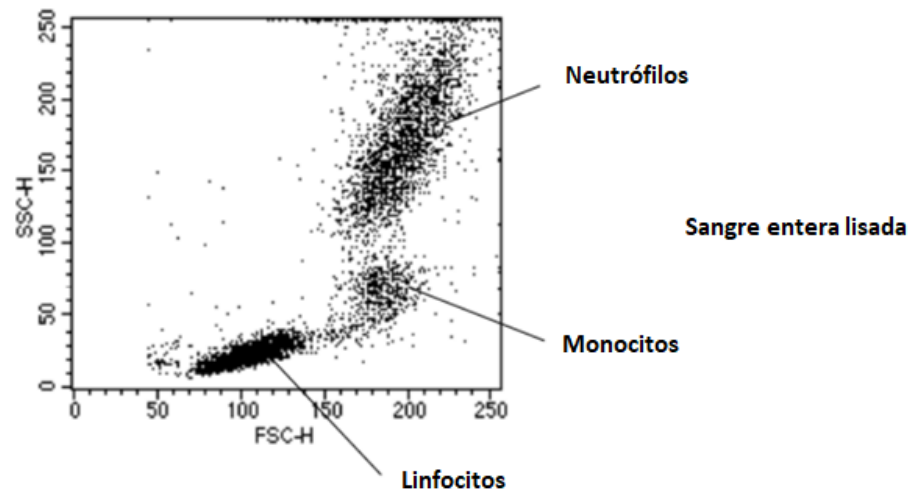


Figura 7. Subpoblaciones celulares basadas en FSC y SSC, muestra de sangre entera lisada (Becton., et al 2002).

El citómetro de flujo también tiene la capacidad de medir la fluorescencia emitida por las muestras o fluorocromos asociados a las mismas. Un compuesto fluorescente absorbe la energía de la luz en un rango de longitudes de onda que es característico de ese compuesto. Esta absorción de luz hace que un electrón en el compuesto fluorescente se eleve a un nivel de energía más alto. El electrón excitado se desintegra rápidamente a su estado fundamental, emitiendo el exceso de energía como un fotón de luz, a esta transición de energía se le llama fluorescencia. El rango sobre el cual se puede excitar un compuesto fluorescente se denomina espectro de absorción y a medida que se consume más energía en las transiciones de absorción que la que se emite en las transiciones fluorescentes, las longitudes de onda emitidas serán más largas que las absorbidas. Al rango de longitudes de onda emitidas para un compuesto particular se denomina espectro de emisión (**Figura 8**) (Jayat y Ratinaud, 1993).

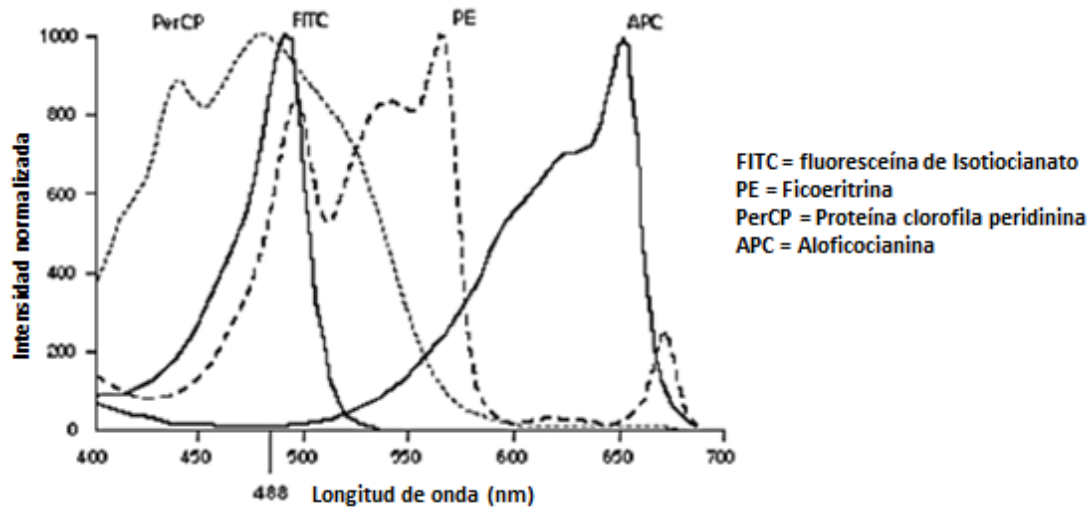


Figura 8. Espectro de absorción de cuatro fluorocromos comúnmente utilizados en la citometría de flujo (Becton., et al 2002).

1.9. Antecedentes

1.9.1. Principales nanomateriales en contacto con el ser vivo y su efecto

Las nanopartículas de óxidos metálicos como el dióxido de titanio (TiO_2) y el óxido de zinc (ZnO) se utilizan generalmente como aditivos, en lociones y cosméticos, ya que se ha registrado que son compuestos que poseen propiedades eficaces de absorción de la luz UV, actuando como bloqueadores exitosos (Syama *et al.*, 2013). Como pigmento las NPs de TiO_2 se incorporan en pinturas, materiales como plásticos, papel, alimento y como componentes de los filtros solares en la industria cosmética (Gea *et al.*, 2019).

El óxido de zinc, debido a sus propiedades físicas y químicas, se considera un agente contra el cáncer para tratamientos biomédicos. Las ZnO NPs se encuentran entre los cinco NMs más utilizados en productos de consumo humano. Las NPs de ZnO se utilizan principalmente como pigmento debido a su intenso brillo, a su resistencia a la decoloración y al alto índice de refracción. Como pigmento las NPs de ZnO se incorporan en pinturas, materiales como plásticos, papel, alimento y como componentes

de los filtros solares en la industria cosmética. Debido a sus propiedades catalíticas y fotocatalíticas, las NPs de ZnO también se utilizan como agentes antimicrobianos y catalizadores para la purificación de aire y agua (Gea *et al.*, 2019).

El elevado uso mundial de las NPs de ZnO, ha producido que también su liberación al ambiente se incremente, existen informes sobre su presencia como contaminantes en el agua, aire y suelo. Por lo tanto los seres humanos están expuestos a estas nanopartículas durante su síntesis (laboratorio), fabricación (industria), uso (productos de consumo, dispositivos, medicamentos, etc.) y a través de la exposición ambiental debido a su eliminación y desecho. Las principales vías de exposición a este tipo de NMs, son la inhalación (principalmente en condiciones laborales y de fabricación), la oral o ingestión (principalmente a través del consumo de alimentos) y la exposición dérmica (a menudo a través de aplicaciones de cosméticos y protectores solares). Como las nanopartículas son pequeñas en tamaño y tienen altos coeficientes de difusión, pueden migrar rápidamente en el aire, por lo tanto, se considera que la inhalación es la principal vía de exposición por la cual los humanos están expuestos a las NPs de ZnO suspendidas en el aire (Fubini *et al.*, 2011) (Kansara *et al.*, 2015).

Brunner *et al.* (2006) reportaron que las NPs de ZnO de 19 nm indujeron la muerte celular casi completa en células de mesotelioma humano (MSTO-211H) y células de fibroblastos de roedores (3T3). También Lanone *et al.* (2009) reportaron una disminución del 50% en la supervivencia de células de monocitos / macrófagos (THP-1) después de 48 horas de exposición a las NPs de ZnO (11 $\mu\text{g}/\text{ml}$), de la misma forma, la viabilidad de las células epiteliales alveolares humanas (A549) se redujo en un 50% después de 24 horas por la exposición a las NPs de ZnO a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Además, se demostró que las células T humanas cancerosas tienen alrededor de 30 veces más sensibilidad a las NPs de ZnO que las células T normales Hanley *et al.* (2008).

Se ha demostrado que la exposición a NPs de ZnO de la línea celular epidérmica humana (A431) causa citotoxicidad y estrés oxidativo. Además, se han observado efectos dañinos en el ADN en estas mismas células atribuyéndole a la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo como una de las causas probables (Sharma *et al.*, 2009).

Los mecanismos de citotoxicidad de las NPs de ZnO aún no se comprenden por

completo, pero se cree que la generación de radicales hidroxilo (OH^\bullet), anión superóxido (O_2^\bullet), y radicales perhidroxilo (HO_2^\bullet) de la superficie de ZnO son los principales inductores de muerte, cuando las nanopartículas interactúan con las células, se activan mecanismos de protección celular para minimizar el daño. Sin embargo, si la producción de radicales libres altamente activa excede la capacidad defensiva antioxidante de la célula, resultando en un daño oxidativo de las biomoléculas que puede conducir a la muerte celular (Namvar *et al.*, 2015).

Se ha reportado, que los efectos biológicos inducidos por las nanopartículas, pueden ser influenciados por su estructura, tamaño, forma, superficie de contacto, aglomeración, agregación y química superficial. En estudios recientes, algunos autores han demostrado que la aglomeración puede influir en la genotoxicidad de las nanopartículas (Gea *et al.*, 2019).

1.9.2. Procesos bioquímicos y biológicos afectados por la exposición a los NMs

Se ha reportado con frecuencia al estrés oxidativo como uno de los mecanismos por el que algunas nanopartículas son tóxicas a nivel celular. Por ejemplo, se reportó que las expresiones de ho-1 y mt-2A, cuyos genes están relacionados con el estrés oxidativo, estaban reguladas por la exposición a nanopartículas de plata (AgNPs). Estos hallazgos muestran que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede inducir la apoptosis como resultado de la exposición a AgNPs (Raja *et al.*, 2020).

La alta producción intracelular de ROS puede suprimir las defensas celulares, lo que resulta en el daño al ADN (genotoxicidad), alteraciones genéticas, muerte celular o mutagénesis con el potencial de carcinogénesis. Se ha reportado que las NPs de oro (AuNPs), AgNPs y ZnO induce la sobre producción de ROS lo que provoca daños genotóxicos importantes para la célula, que pueden ser citotóxicos en algunos casos (Abdal Dayem *et al.*, 2017).

El daño en el ADN después de la exposición a nanopartículas puede incluir rupturas de cadena sencilla y doble, deleciones e inestabilidad genómica. La modificación del ADN celular después de la exposición a elevadas cantidades de ROS, es el evento

inicial que puede estar mayoritariamente involucrado en la inducción de los efectos mutagénicos y letales de varios agentes de estrés oxidativo. Por lo tanto, uno de los mecanismos posibles que pueden sugerirse para el daño del ADN inducido por las NPs de ZnO puede ser la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROS) reaccionan con la molécula de ADN y causan daños tanto en las bases de purina y pirimidina, como en el esqueleto del ADN (Martinez *et al.*, 2003).

Además, el oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$) reacciona con los residuos de guanina del ADN. Las respuestas mutagénicas y genotóxicas observadas cuando el ADN o las células se tratan con $^1\text{O}_2$ podrían entenderse mejor mediante la identificación de los productos de oxidación generados en este proceso. La formación de $^1\text{O}_2$ puede implicar diferentes vías físicas, químicas y bioquímicas. Entre ellos incluyen el mecanismo de fotosensibilización tipo II, reacciones de peróxido de hidrógeno con hipoclorito o peroxinitrito, procesos enzimáticos de peroxidasa y oxidasas y descomposición de dioxetanos y endoperóxidos (Martinez *et al.*, 2003).

Se ha investigado sobre la implicación del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), generado como resultado de la activación UVA de los fotosensibilizadores endógenos como porfirinas y flavinas. Y se ha demostrado que el 7,8-dihidro-8-oxo-2-deoxiguanosina (8-oxodGuo) es el producto exclusivo de la reacción de ($^1\text{O}_2$) con el residuo de guanina del ADN, en contraste con el radical hidroxilo, que reacciona casi indiferentemente con todos los nucleótidos y el residuo de azúcar del ADN (Martinez *et al.*, 2003).

Alarafi y colaboradores reportan que es importante considerar la estabilidad de las nanopartículas en la suspensión del cultivo celular, así como abordar la toxicidad del Zn^{2+} disuelto. Estudios recientes han demostrado que el Zn^{2+} se libera de la superficie de las nanopartículas de ZnO cuando se suspenden en un estado acuoso (**Figura 9**). Y aunque las NPs de ZnO liberan Zn^{2+} en un estado acuoso, los niveles de Zn^{2+} liberados son insuficientes para ser tóxicos para las células de cáncer de colon humano (Moos *et al.*, 2010).

De la misma forma entre los NPs y el estrés oxidativo, uno de los modos posibles que pueden surgirse para el daño del ADN inducido por las NPs de ZnO puede ser la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. Se sabe que las ROS reaccionan con la

molécula de ADN y causan daños tanto en las bases de purina y pirimidina, como en el esqueleto del ADN.

La peroxidación lipídica, que genera una variedad de productos reactivos con distintas macromoléculas celulares, incluido el ADN. Uno de los principales productos de la peroxidación de lípidos es el malondialdeído, el cual es un compuesto cancerígeno mutagénico comprobado que reacciona con el ADN para formar aductos a la desoxiguanosina, desoxiadenosina y desoxicitidina. Por lo que la genotoxicidad inducida por NPs de ZnO, aunque de forma inicial está mediada por el estrés oxidativo, puede vincularse con otras vías moleculares diferentes (Martinez *et al.*, 2003).

El daño del ADN resultante de cualquiera de estos mecanismos probables puede desencadenar vías de transducción de señales que conducen a la apoptosis o causar interferencias con los procesos celulares normales, como la división celular, ocasionando finalmente la muerte celular. Sin embargo, se necesitan más estudios para desentrañar el mecanismo exacto detrás de la genotoxicidad inducida por las ZnO NPs (Sharma *et al.*, 2009).

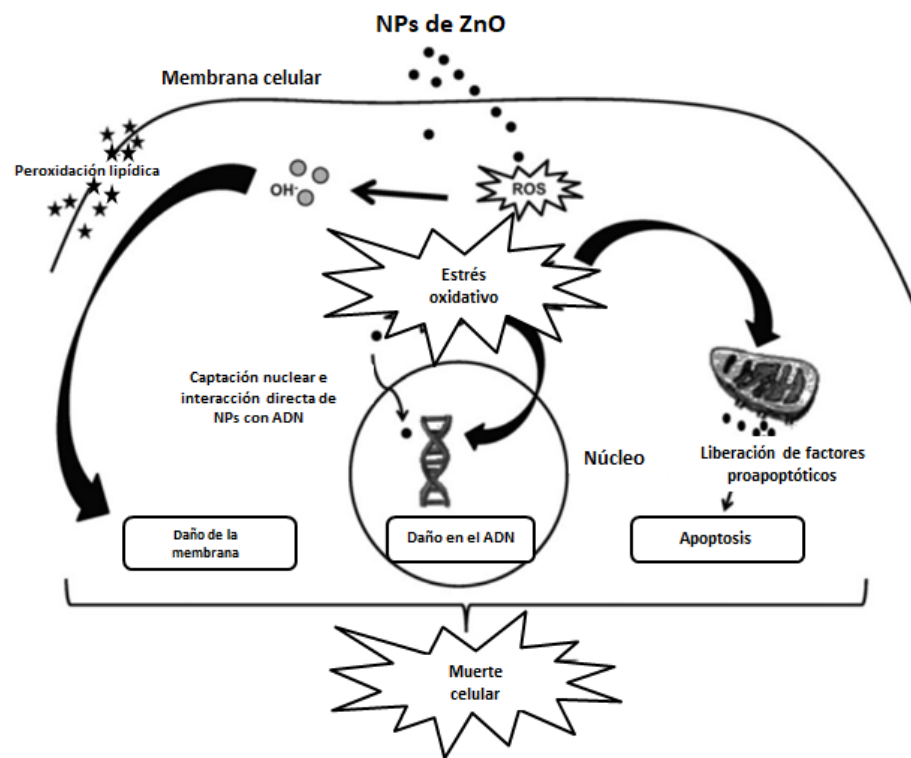


Figura 9. Representación esquemática de la toxicidad celular inducida por las NPs de ZnO modificado de [Sharma *et al.*, (2009)].

Los mecanismos que estudian la toxicidad de las NPs, involucran el conocer la relación causal entre la exposición de las células a las NPs, los procesos bioquímicos afectados y los resultados biológicos finales. La exposición de las NPs a un medio biológico, puede hacer que sus propiedades fisicoquímicas varíen, como por ejemplo su tamaño, carga y adsorción de superficie. Los eventos que involucran la interacción de las NPs con moléculas como proteínas y ARN, pueden verse afectados de manera diferente dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las NPs. Los resultados biológicos finales dependen del alcance del estudio, en donde los resultados pueden provenir de pruebas *in vitro* de citotoxicidad o resultados de todo el organismo, como la supervivencia para estudios *in vivo* (Qiu *et al.*, 2018).

Conocer las relaciones causales entre la exposición de las células a las NPs, los procesos bioquímicos afectados y los resultados biológicos finales son clave para comprender cómo las NPs afectan a los organismos biológicos y, además, afectan la salud humana y el medio ambiente (**Figura10**).

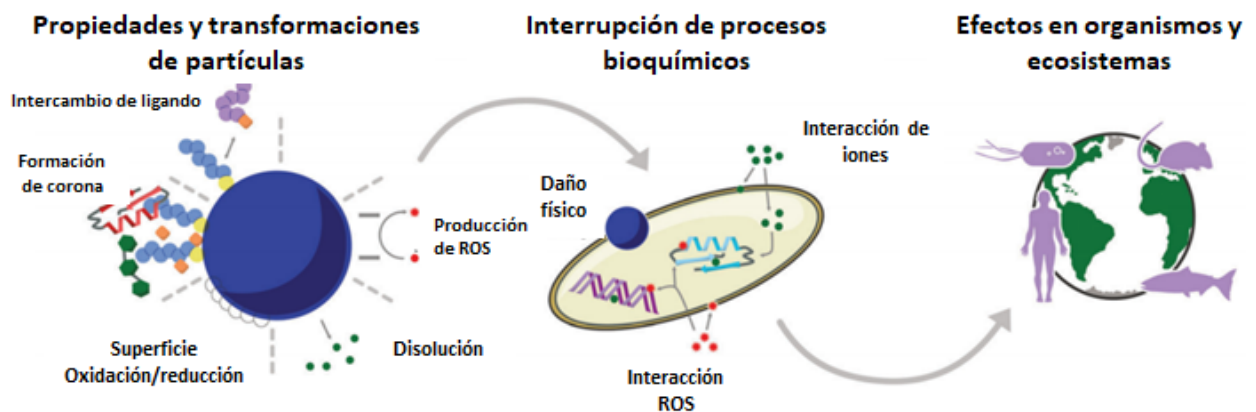


Figura 10. Mecanismos de las nanopartículas que causan efectos negativos en los procesos bioquímicos y como afectan a los seres vivos y el ecosistema (Qiu *et al.*, 2018).

1.9.3. Efecto de las nanopartículas en el ciclo celular

Namvar y colaboradores analizaron por citometría de flujo la progresión del ciclo celular y la apoptosis inducida en células de leucemia mielomonocítica (WEHI-3B) expuestas a NPs de ZnO biosíntetizadas; y encontraron que algunas etapas del ciclo

celular, fueron controlados por varias vías de señalización. Analizaron los efectos de las NPs de ZnO en el ciclo celular para determinar el mecanismo de su actividad antiproliferativa en las células cancerosas. Encontraron que la exposición de las células WEHI-3 a las NPs de ZnO ocasionó una acumulación significativa y un pico distinto en la población sub-G0 / G1, que representa la población de células apoptóticas. Por lo tanto, se estima que el aumento significativo ($p < 0.05$) en la población sub-G0/G1 dependió del tiempo de incubación con las NPs de ZnO, pues a las 24 horas había un porcentaje de células en Sub-G0/G1 de 10.50 %, a las 48 horas este valor incrementó a 22 % y después de 72 horas de exposición a las ZnO NPs, el porcentaje de células apoptóticas incrementó a 25.85 %. Por otro lado, se observó una clara disminución de las células en las etapas del ciclo celular G0/ G1 y G₂/M (**Figura 11**), en la tabla 1 se puede observar los valores que representan a cada población celular de las distintas fases como lo son la sub-G1, G0/G1, síntesis y G₂/M. Los resultados obtenidos, indican que las NPs de ZnO podrían bloquear el ciclo celular e inducir apoptosis en las células WEHI-3B y estos efectos son dependientes del tiempo de incubación con las NPs.

Tabla 1. Análisis de citometría de flujo del porcentaje de células WEHI-3B en las distintas etapas del ciclo celular después de ser tratadas con NPs de ZnO. Las células se tiñeron con yoduro de propidio para cuantificar la cantidad de ADN y por lo tanto, la etapa en el ciclo celular a la que corresponda la población celular. Las células se expusieron a una concentración determinada de NPs de ZnO y se incubaron a 37°C, durante 24,48 y 72 h Namvar *et al.* (2015).

Fase del ciclo celular	Células (%)					
	Control 24 h	Tratamiento 24 h	Control 48 h	Tratamiento 48 h	Control 72 h	Tratamiento 72 h
G0/G1	55.25 ± 0.06	33.40 ± 0.45	51.10 ± 0.29	42.61 ± 0.52	50.64 ± 0.32	37.68 ± 0.68
G ₂ /M	18.85 ± 0.76	18.00 ± 0.41	19.16 ± 0.26	12.29 ± 0.35	9.30 ± 0.22	6.06 ± 0.93
S	24.91 ± 0.06	38.30 ± 0.33	29.24 ± 0.06	22.93 ± 0.12	37.50 ± 0.61	30.35 ± 0.18
Sub-Go/G1	0.9 ± 0.23	10.50 ± 0.28	0.50 ± 0.34	22.00 ± 0.20*	2.20 ± 0.46	25.85 ± 0.56*

Los valores se expresan como media ± SD de tres experimentos diferentes. Los datos se han analizado usando ANOVA de una vía de prueba de comparación post hoc; medias en comparación con la prueba Turkey's h. * Aumento significativo ($P < 0.05$) de células en la fase sub-Go/G1 en los grupos tratados con NPs de ZnO en comparación con los controles no tratados.

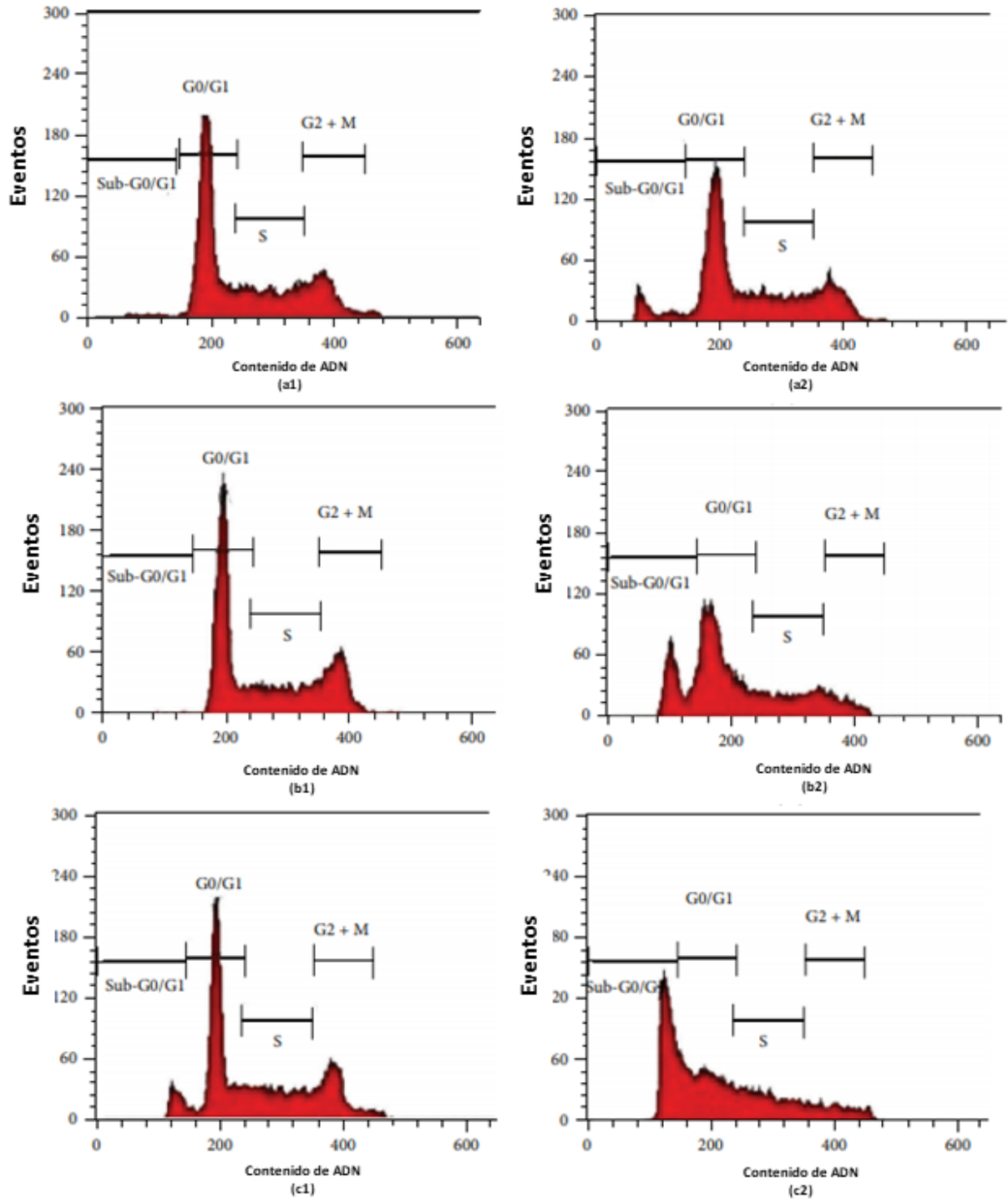


Figura 11. Análisis del ciclo celular de células WEHI-3B tratadas con NPs de ZnO después de la tinción con yoduro de propidio (PI). (a1) - (c1) células WEHI-3B no tratadas durante 24, 48 y 72 h, respectivamente. (a2) - (c2) los efectos de 24, 48 y 72 h, respectivamente, en relación con la exposición de las células WEHI-3B a NPs de ZnO. G0 / G1, G₂/M y S indican la fase celular, y Sub-G0-G1 se refiere a las células apoptóticas (Namvar *et al.*, 2015).

La producción de nanopartículas artificiales está creciendo rápidamente a medida que el campo de la nanotecnología continúa expandiéndose. En el estudio que reportaron Meyer *et al.* (2011), evaluaron la inducción de la apoptosis por NPs de ZnO a través de la proteína cinasa p38 activada por mitógenos y las rutas de la proteína p53 en los puntos de control del ciclo celular en células de fibroblastos dérmicos humanos. El ensayo de viabilidad celular basado en MTT que realizaron, demostró una disminución significativa en la supervivencia celular después de la exposición a NPs de ZnO, y las imágenes de contraste de fase, revelaron que las células tratadas con NPs de ZnO tenían menor densidad y una morfología redondeada (**Figura 12**). La inducción de la apoptosis se confirmó mediante el ensayo de anexina V y el análisis de transferencia Western blot, en donde mostraron la regulación positiva de las proteínas p53 y fosfo-p38.

Además, en las células expuestas a NPs de ZnO, la proteína p53 se fosforiló en los sitios Ser33 y Ser46 que se sabe que son fosforilados por p38. Los resultados de Meyer *et al.* (2011) sugieren que las NPs de ZnO tienen el potencial de inducir la apoptosis en fibroblastos dérmicos humanos a través de las vías p53-p38.

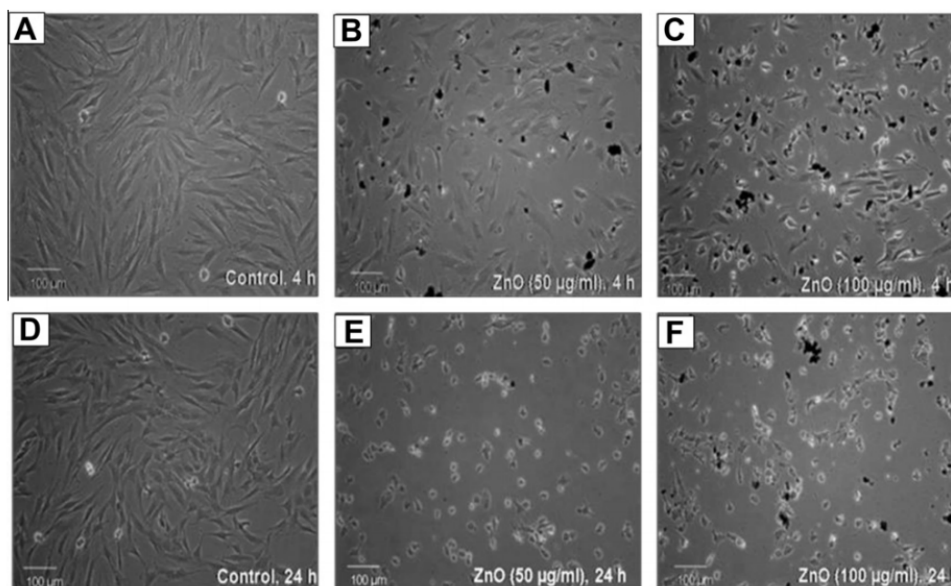


Figura 12. Morfología de fibroblastos dérmicos humanos expuestos a NPs de ZnO. (A) y (D) Son células de control. (B) 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 4 h, (C) 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 4 h, (E) 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h (F) 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h (Meyer *et al.*, 2011).

Otro ejemplo de NPs que juegan un papel importante regulando el ciclo celular, son las AgNPs. En un estudio reportado por Eom y colaboradores (2010), investigaron la activación de p38MAPK, una clase de proteínas cinasas activadas por mitógeno que responden a los estímulos de estrés, a las citosinas, la irradiación ultravioleta, el choque térmico y el choque osmótico, y que además, participan en la diferenciación celular, la apoptosis y la autofagia). Encontraron que p38MAPK puede ser activada a través del estrés oxidativo (Nrf2) y los factores de transcripción relacionados con la inflamación (NFB), dando como resultados varios tipos de daños celulares en la línea celular inmortalizada Jurkat T. Los resultados indicaron que en las células del control, la población principal se encontraba en la fase G1; mientras que, en las células expuestas a AgNPs, se observó una disminución en la población G1, acompañada de un aumento en la población G₂/M. Asimismo se cuantificó un aumento en el número de células en las fases G₂/M y S en células expuestas a 0.1 y 0.2 mg/L de AgNPs, respectivamente **(Figura 13)**. Un análisis reveló que después de 12 y 24 horas de exposición, las AgNPs conducen a una importante disminución de la cantidad de las células en la fase G1 y un aumento en la cantidad de células en las fases G₂/M y S. Sin embargo, los iones Ag[±] no afectaron a ninguna de las proporciones en las fases del ciclo celular. El hecho de haber encontrado que existe un aumento en las fases G₂/M y S, así como una disminución en la fase G1 ante la exposición de las células Jurkat T a AgNPs, sugiere que éstas pueden causar un daño celular grave. Además, la exposición de las células a las AgNPs, indujo un incremento dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, en el número de células con un contenido de ADN subdiploide lo que sugiere que el daño al ADN y la apoptosis pueden estar involucrados en los mecanismos de toxicidad de las AgNPs (Eom y Choi, 2010).

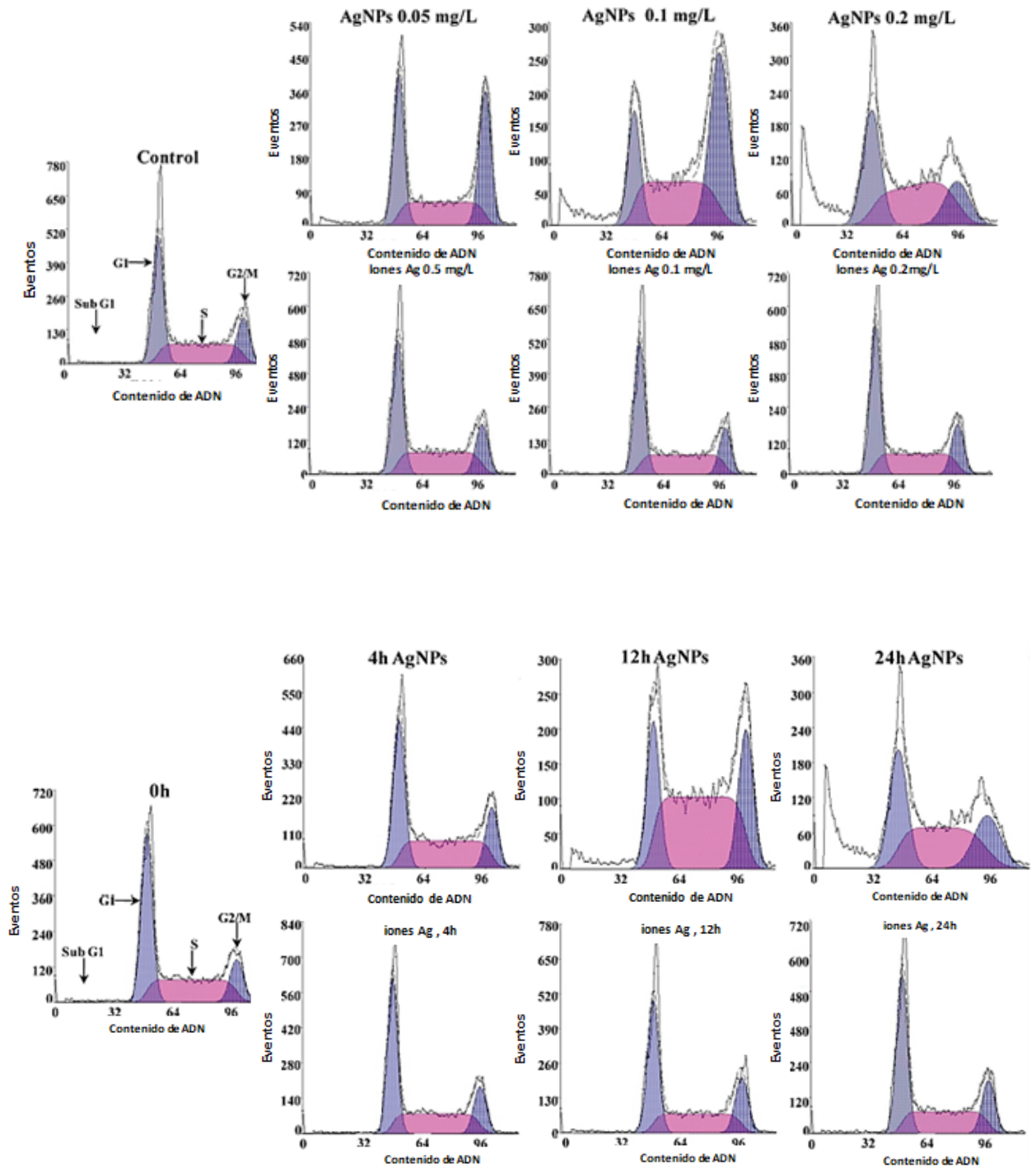


Figura 13. Análisis del ciclo celular en células Jurkat T expuestas a 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L AgNPs e iones Ag^{\pm} por 24h, 0.2 mg/L por 4,12 y 24 h. Tamaño de AgNP utilizadas de 28-35 nm (Eom y Choi, 2010).

Sirelkhatim *et al.* (2016) evaluaron la viabilidad de células de cáncer cérvix (HeLa) y fibroblastos (L929), expuestas a NPs de ZnO de tamaños de 20, 40 y 80 nm a una concentración de 1mM. Reportaron que después de 48 h de exposición a las NPs, existía una reducción de la viabilidad de las células HeLa de 37, 32, 15 %, respectivamente. Sin embargo, en células normales de fibroblastos L929 a las 48 h, las mismas concentraciones de NPs de ZnO no fueron tan citotóxicas pues indujeron una viabilidad celular de 79.6, 76 y 75 %, respectivamente. También reportaron un incremento considerable del 50 % de ROS en células HeLa inducido por las NPs de ZnO de 20 nm. Por otro lado, Sirelkhatim *et al.* (2016) encontraron que las NPs de ZnO inducían la muerte celular por apoptosis y lo confirmaron mediante la fragmentación de ADN y las imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia. Ellos reportan que además de los cambios morfológicos de las células HeLa visualizados bajo el microscopio óptico, existían una variedad de cambios morfológicos asociados a la muerte celular, que involucran el encogimiento, vacuolización y formación de cuerpos apoptóticos en estas células. En los resultados expusieron el impacto del tamaño y la morfología de las muestras de NPs de ZnO en la toxicidad ejercida en las células HeLa mediada principalmente por el incremento en la producción de ROS.

Un mecanismo propuesto por Sirelkhatim *et al.* (2016) para explicar la muerte celular en esta investigación, fue la desionización de las NPs de ZnO con tamaños mas pequeños, lo que produce iones de zinc (Zn^{2+}) en el microambiente ácido de las células de cáncer, proponiendo este mecanismo de muerte como un fenómeno dependiente del tamaño de las NPs. Los hallazgos surgidos en esta investigación recomiendan proporcionar nuevas plataformas en el desarrollo de terapias como agentes selectivos para el cáncer de cuello uterino y para beneficiarse de la influencia sinérgica del tamaño y la nanoestructura al diseñar agentes contra el cáncer.

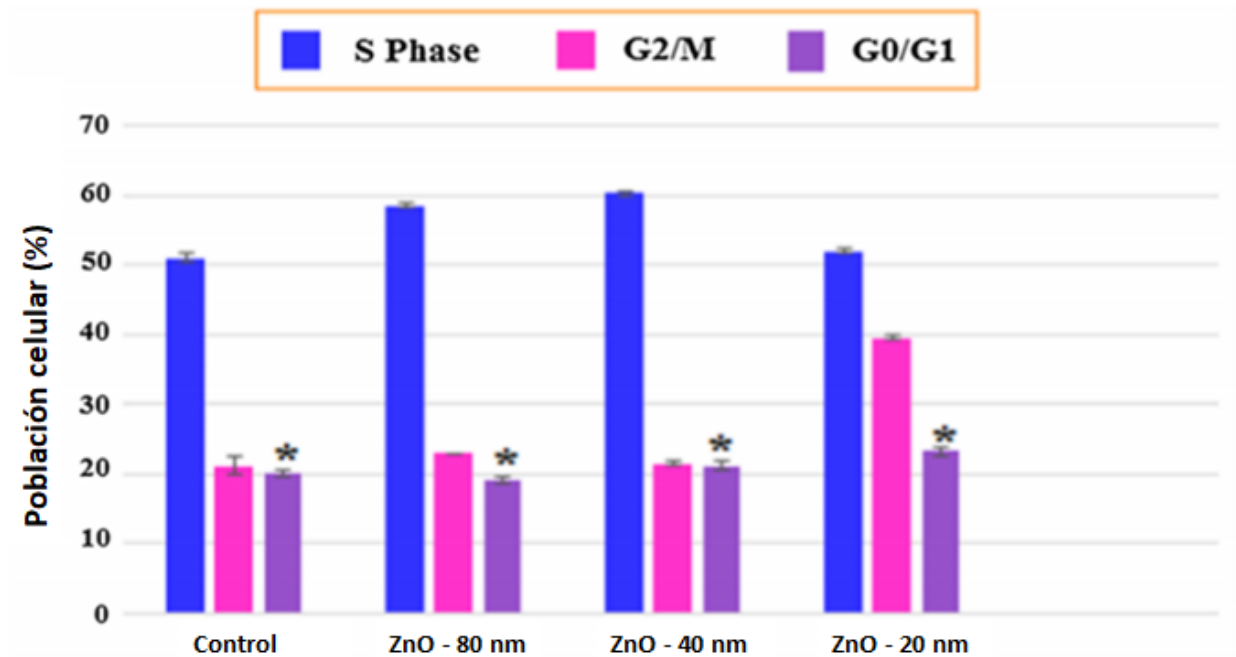


Figura 14. Análisis del porcentaje de distribución de fase del ciclo celular de células HeLa no tratadas y tratadas con NPs de ZnO en sus valores de IC₅₀ después de 72 h. Los resultados fueron un promedio de experimentos por triplicado representados en desviación estándar (\pm SD), * p 0.05 con respecto a los no tratados según lo determinado por ANOVA de una vía (Sirelkhatim et al., 2016).

1.10. Hipótesis

La exposición *in vitro* de las células de piel, melanoma y pre-osteoblastos a diferentes concentraciones y tamaños de NPs de ZnO, inducirá un cambio en las proporciones de las células en las diferentes etapas del ciclo celular.

1.11. Objetivos

1.11.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de dos tamaños diferentes de NPs de ZnO en la proporción de los estadios del ciclo celular.

1.11.2. Objetivos específicos

1. Caracterización fisicoquímica de las NPs de ZnO.
2. Evaluar y comparar el efecto citotóxico *in vitro* de dos diferentes tamaños y concentraciones de nanopartículas de ZnO, en líneas celulares de cáncer de piel, fibroblastos y pre-osteoblastos.
3. Estudiar la producción de ROS *in vitro*, en líneas celulares de cáncer de piel, fibroblastos y pre-osteoblastos expuestas a diferentes tamaños y concentraciones de NPs de ZnO.
4. Evaluar el efecto de la exposición de las células a diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO en el ciclo celular de las líneas celulares de cáncer de piel, fibroblastos y pre-osteoblastos.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Dispersión de las nanopartículas de óxido de zinc

Materiales:

Nanopartículas de óxido de Zinc (NPs de ZnO, 99+ %, 10- 30 nm, recubierta de polivinilpirrolidona (PVP), US Research Nanomaterials, Inc) y agua mili Q.

Procedimiento:

Primer protocolo: En un tubo falcón nuevo de 50 ml, se pesó 15 mg de NPs de ZnO y se agregó 15 ml de agua mili Q. Estas muestras se ultrasonicaron en intervalos de 3 min, por 9.9 segundos prendidos y 9.9 segundos apagados (9" ON, 9" OFF) durante 10 minutos.

Segundo protocolo: En un tubo falcón nuevo de 50 ml, se pesó 1 mg de NPs de ZnO y se agregó 15 ml de agua mili Q. Estas muestras se ultrasonicaron en intervalos de 3 min, por 9.9 segundos prendidos y 9.9 segundos apagados (9" ON, 9" OFF) durante 15 minutos.

2.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de óxido de zinc

2.2.1. Análisis por dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés de Dynamic light scattering) es una técnica que permite determinar el tamaño de partículas en suspensión hasta rangos del orden de los nanómetros, el uso del movimiento Browniano de las partículas en suspensión permite alcanzar estos límites de sensibilidad. Adicionalmente, este método no altera de ninguna manera la matriz de estudio debido a que es una técnica no invasiva. Los parámetros que se midieron en este trabajo fue la dispersión del tamaño por el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta. El equipo utilizado para

la medición fue un Zetasizer de Malvern Instruments Ltda. Para el análisis se tomó 10 μl de la muestra stock y se diluyó en 1 ml de agua mili Q en un tubo eppendorf. Luego con la ayuda de una jeringa se extrajo 1ml del tubo eppendorf para luego añadirlo en una celda de marca Malveren con volumen de 1ml y modelo DTS1070.

2.2.2. Análisis por Espectroscopía ultravioleta visible

La espectroscopía ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-vis) utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380 nm y 780 nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

La espectroscopía UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados. Para medir el espectro se tomó 50 μl de la muestra stock y se diluyó en 1 ml de agua mili Q en un tubo eppendorf para después agregarla en una celda de vidrio para espectrofotómetro. Los espectros UV-vis se obtuvieron con el equipo Cary 60 UV-vis Agilent Technologies en un intervalo de 200 a 800 nm.

2.2.3. Análisis por microscopía electrónica de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés, "Transmission Electron Microscopy"). Los electrones difractados al pasar a través de la muestra generan un difractograma que puede ser transformado directamente en imagen mediante lentes magnéticas que es la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones. Las imágenes se pueden producir a partir de los electrones difractados (imágenes de campo oscuro) o a partir de los electrones directos que

han atravesado la muestra sin interacción (imágenes de campo claro/ brillante). El tamaño y la morfología de las nanopartículas de ZnO se determinaron por el microscopio electrónico de transmisión, del cual se colocó una alícuota de 10 μ l de cada muestra y se colocaron en rejillas de cobre recubiertas de formvar/carbón (malla 75, Ted Pella Inc.). Dichas muestras de cada protocolo de NPs de ZnO se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se analizaron bajo el TEM (Hitachi H-7500 a 80 Kv). Los histogramas de tamaño de las nanopartículas se llevaron a cabo con mediciones realizadas mediante el programa OriginPro 2018.

2.3. Cultivo celular

♣ Cultivo de células de melanoma:

La línea celular B16-F10 de melanoma de ratón (ATCC CRL-6475) fue cultivada en medio DMEM (por sus siglas en inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés Fetal Bovine Serum), 1% v/v de antibiótico/ antimicótico, 1% v/v de L-glutamina y de bicarbonato de sodio (2 g/L), ajustado a un pH de 7.4. Y esterilizado por filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.22 μ m.

♣ Cultivo celular de osteoblastos:

La línea celular de pre-osteoblastos de ratón MC3T3-E1 subclona E4 (ATCC CRL-2593), fue cultivada en medio MEM-alfa (por sus siglas en inglés Minimum Essential Medium Eagle Alpha Medium) el cual fue suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino, 1% v/v de antibiótico/ antimicótico, 1% de L-glutamina y de bicarbonato de sodio (2 g/L), ajustado a un pH de 7.2. El medio fue esterilizado por filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.22 μ m.

♣ Cultivo de células de fibroblastos:

La línea celular L929 (ATCC CCL-2) de fibroblastos de ratón, fue cultivada en medio DMEM (por sus siglas en inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium) el cual fue suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés Fetal

Bovine Serum), 1 % v/v de antibiótico/ antimicótico, 1 % de L-glutamina y (2 g/L) de bicarbonato de sodio, ajustado a un pH de 7.4. Y esterilizado por filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.22 μm .

2.3.1. Subcultivo de células y tratamiento con tripsina

Las células se mantuvieron en cultivos de cajas Petri especiales para cultivo celular, por lo que las células se adhieren a esta superficie y una vez que han cubierto la mayor parte de la caja de cultivo, se requiere despegarlas de dicha superficie. Para ello se utiliza una solución de tripsina, que es una enzima peptidasa cuya principal función es disociar los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis con la finalidad de formar péptidos de menor tamaño y así facilitar la disociación de la superficie de la caja Petri. La tripsinización en cultivo celular, se realiza removiendo el medio viejo para luego lavar las células con PBS y agregar 1 ml de la tripsina (solución tripsina/EDTA 1x, almacenada a -20 hasta su uso) y posteriormente se incuba la caja con células a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ por 5 minutos, para después remover mecánicamente las células y colocarlas en un tubo eppendorf que se centrifugó a 1200 rpm, finalmente las células se resuspenden en 1 ml de medio de cultivo o el volumen que sea pertinente de acuerdo al tamaño del pellet celular, y se prosigue a contarlas y hacer el subcultivo o cambio de pase de la línea celular.

2.3.2. Conteo de células mediante el método de exclusión por azul tripano

Para realizar los ensayos de citotoxicidad es necesario hacer un conteo total de las células viables que se obtuvieron del cultivo en la caja Petri. Para ello, se cuentan las células con la ayuda de la cámara de Neubauer, que es una placa gruesa de cristal con forma de portaobjetos de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado y esto a su vez es subdividido en 9 cuadros de 1 mm de lado cada uno. La cámara de Neubauer tiene un cuadro central y es el destinado al recuento de hematíes y plaquetas, este se divide en 25 cuadros medianos

de 0.2 mm de lado y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadros pequeños, que en el caso de este trabajo son los que se tomaron en cuenta para hacer el conteo celular (**Figura 15**).

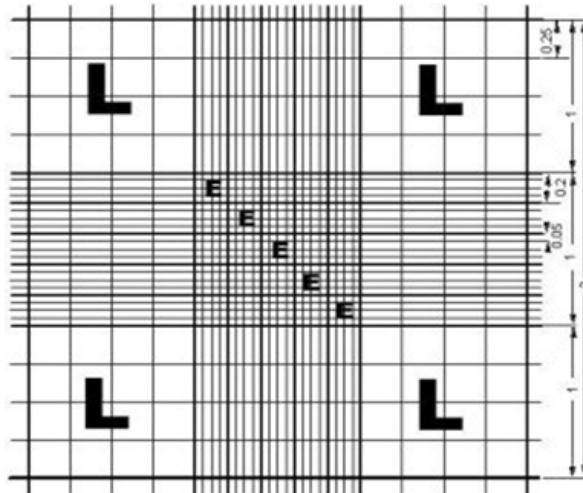


Figura 15. Esquema de la cuadrícula de una cámara de Neubauer. Cuadros L correspondientes al conteo de las células, en total son 64 cuadros de .25 mm cada uno (Deliamc, 2014).

Para contar las células es necesario utilizar un colorante llamado azul tripano (**Figura 16**) a este procedimiento, se le conoce también como conteo de células viables por el método de exclusión por azul tripano. Esto se debe a que este colorante permite diferenciar las células vivas de las muertas, ya que las primeras son impermeables al colorante, pues si la célula es viable, mantiene intacta su membrana plasmática y el colorante no puede ingresar a la célula, de esta manera las células vivas se observan de un color translúcido a diferencia de las células muertas, las cuales al tener la membrana plasmática dañada, pueden ser teñidas por el colorante, lo que hace que se observen de color azul.

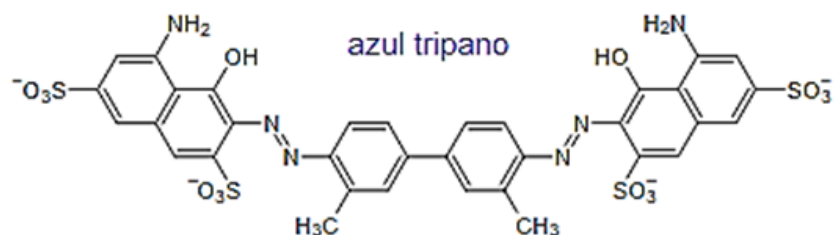


Figura 16. Estructura de la molécula de azul tripano. El tamaño de la molécula y en especial su carga eléctrica impiden que atraviese la membrana celular [Piñero., et al 2009].

Para el conteo celular se agregaron en un tubo eppendor de 1 ml, 10 μ l del células y 40 μ l de colorante azul tripano (0.4 % w/v) para obtener una dilución 1:5. Posteriormente, la muestra se observa en el microscopio óptico y se cuentan los cuatro cuadrantes señalados en la figura 15, una vez obtenido el total de las células vivas en la cámara de Neubauer se procedió a utilizar la siguiente fórmula para conocer el número de células viables por mililitro que se tiene en la caja Petri.

Fórmula para obtener el número total de células en solución:

Número de células / ml = (Promedio de células contadas en los cuatro cuadrantes) (dilución de Azul tripano) (Volumen total de células) (10,000).

2.4. Ensayos de biocompatibilidad

2.4.1. Ensayos de viabilidad celular por reducción del MTT

Para determinar la citotoxicidad de un nanomaterial, se pueden realizar diferentes ensayos, muchos de ellos son colorimétricos, uno de los más utilizados, es el ensayo de viabilidad celular por la reducción del reactivo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). El motivo por la que este reactivo se reduce es por la actividad metabólica realizada por diversas enzimas, entre ellas la enzima llamada succinato deshidrogenasa y diferentes reductasas citosólicas. La forma a la que es reducido el MTT es en un reactivo llamado (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano (formazan) cuyo compuesto pertenece a la familia de los formazanos, que son cristales de color violeta insolubles en agua.

El ensayo de viabilidad celular por reducción del MTT, se realizó en una placa de 96 pozos, en la cual se sembraron 10,000 células de melanoma, fibroblastos o de preosteoblastos en cada pozo, en un volumen final de 100 μ l de su respectivo medio de cultivo celular para luego incubarlo por 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Posteriormente, se decantó el medio de cultivo de la placa de 96 pozos y se le agregaron a cada pozo y por triplicado, las diferentes concentraciones de NPs de ZnO (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ g/ml) en un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo

celular para luego incubarlo por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

Como controles positivos se añadió solamente medio de cultivo celular y en los controles negativos se agrega el compuesto que induce a la muerte celular que puede ser dimetilsulfóxido (DMSO) o Tritón-X100 al 0.5 %. Al concluir las 24 horas de incubación con las NPs, se decantó el medio de cultivo de la placa y se lavaron las células tres veces con 200 µl de buffer de fosfatos (PBS 1x) luego se agregó a cada pozo 10 µl de MTT (3 mg/ml) y 90 µl de medio de cultivo, la placa se incubó por 4 horas a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

Transcurrido el tiempo de incubación, a cada pozo de la placa se le agregaron 100 µl de isopropanol puro, la muestra se resuspendió varias veces con la ayuda de la micropipeta para disolver los cristales de formazan, posteriormente, la placa se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Por último se midió la absorbancia del formazan en una longitud de onda de 570 y 690 nm en un equipo de lector de placas ELISA marca Thermo Scientific, Multiskan GO.

Para calcular la viabilidad celular se utilizaron las absorbancias en donde se hizo lo siguiente: $Abs_{570\text{ nm}} - Abs_{690\text{ nm}}$ con la finalidad de obtener el valor real de la absorbancia en tratamiento para las diferentes muestras. El valor de la absorbancia del control positivo será tomado como el 100 % de la viabilidad celular y a partir de ahí, se calculará el porcentaje correspondiente para cada uno de los valores de las absorbancias de cada muestra.

2.4.2. Detección de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en pre-osteoblastos, fibroblastos y melanoma con NPs de ZnO

Evaluar la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) servirá para determinar si las nanopartículas de óxidos metálicos son capaces de inducir un estrés oxidativo significativo en las líneas celulares de fibroblastos, melanoma y pre-osteoblastos expuestas a diferentes concentraciones de las NPs. Es por ello, que la técnica para determinarlo fue mediante la cuantificación de la fluorescencia de un reactivo que es reducido por las ROS generadas en el citoplasma de la célula, de esta forma se cuan-

tificó la generación de ROS por citometría de flujo mediante un kit llamado Image-iT Live Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (I36007, Invitrogen).

♣ Cultivo de células para la detección de ROS:

Para este ensayo cada línea celular se sembró en una placa de 12 pozos a una densidad de 150,000 células por pozo y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, con diferentes concentraciones de ZnO NPs (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml) por 24 horas.

♣ Preparación del reactivo H₂DCFDA:

1. Se preparó una solución stock de 10 mM del reactivo H₂DCFDA, disolviendo 50 µl de DMSO (componente D) en un vial de carboxy- H₂DCFDA (componente A, 275 µg).
2. Luego se procedió a hacer una solución de trabajo de una concentración de 25 µM con el stock realizado en el paso 1, para ello se disolvió 5.625 µl de carboxy-H₂DCFDA (paso 1) en 2.250 ml de medio de cultivo celular (dependiendo de la línea celular).

♣ Preparación del reactivo TBHP:

1. Se preparó una solución stock de 100 mM del reactivo TBHP (componente C, 7.78 M), agregando 1 µl de TBHP en 77 µl de agua estéril..
2. Posterior a ello se realizó una solución de trabajo, diluyendo el stock (paso 1) para preparar una dilución 1:1000 y obtener una solución de trabajo de 100 µM de concentración. Para ello se diluyó 1 µl del stock TBHP en 1 ml del medio de cultivo (dependiendo de la línea celular) y así obtener dicha concentración. .

♣ Incubación de las células con los reactivos:

Luego de la tripsinización (descrito en el punto 2.3.2) el pellet de células obtenido de la centrifugación, se resuspendió en 250 µl de medio con el reactivo carboxy-H₂DCFDA y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 1 hora al igual que el

control positivo, al control negativo se le añadió 7 μ l de TBHP. Posterior a la incubación, se centrifugaron las células a 1200 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS 1X. Finalmente, las células obtenidas se analizaron por citometría de flujo con un citómetro Attune NxT del cual se utilizó el canal de fluorescencia BL1 (Excitación 488 nm/ Emisión 525 nm) con un parámetro de 360 voltios en el incremento de la fluorescencia, para la potencia en la luz de dispersión lateral (por sus siglas en inglés Side Scatter light SSC) se utilizó un parámetro de 350 voltios y para la potencia en la luz de dispersión frontal (por sus siglas en inglés Forward Scatter light FSC) se utilizó un parámetro de 350 voltios, colectando para cada muestra 30 mil eventos con sus respectivos triplicados. Se hicieron al menos tres mediciones de cada muestra adquiriendo al menos 10,000 eventos (células) en cada una de ellas.

2.4.3. Cuantificación de ADN en el ciclo Celular de fibroblastos, osteoblastos y melanoma

Evaluar el contenido de ADN en cada línea celular servirá para determinar si las diferentes concentraciones de las ZnO NPs son capaces de arrestar las células de fibroblastos, pre-osteoblastos y melanoma en alguna fase del ciclo celular. Es por ello, que la técnica para determinarlo fue mediante la tinción de ADN con yoduro de propidio (PI) el cual es un agente intercalante fluorescente que puede usarse para teñir células y ácidos nucleicos, pues se une al ADN intercalándose entre las bases con poca o ninguna preferencia de secuencia, de esta forma se cuantificó el contenido de ADN de cada línea celular mediante citometría de flujo y se determinó la etapa del ciclo celular de acuerdo a la **Figura 17**.

♣ Cultivo de células para la cuantificación de ADN:

Para este ensayo cada línea celular se sembró en una placa de 12 pozos con 100,000 células por pozo y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, con diferentes concentraciones de ZnO NPs (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ g/ml) por 24 horas.

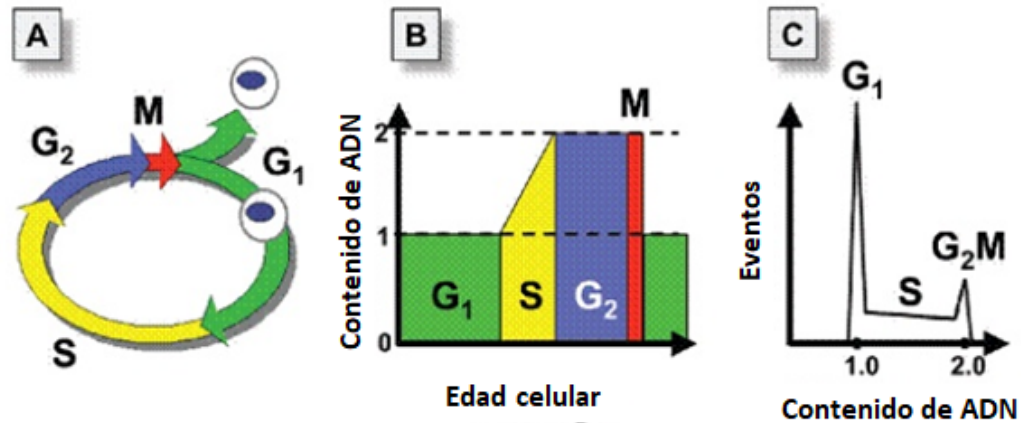


Figura 17. Fases del ciclo celular de una célula eucariota y la distribución de población por citometría de flujo. A) Ciclo celular de una célula eucariota. B) Histograma del contenido de ADN celular en función a la edad de la célula es decir la población celular que representa en cada fase del ciclo celular G₁, S, G₂ y M. C) Distribución teórica según el contenido de ADN celular por citometría de flujo.

Luego de la tripsinización (descrito en el punto 2.3.2) el pellet de células obtenido de la centrifugación, se volvió a centrifugar con PBS esto para eliminar residuos de la tripsina. Después se obtuvieron dos tubos de cada concentración. El primer tubo se resuspendió en 1 ml de EtOH al 70% frío para fijar las células en un tiempo de 2 horas. Mientras el segundo tubo solamente se le añadió medio necesario para cada línea celular y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Al transcurrir las 2 horas, los primeros tubos que contenían las células con los diferentes tratamientos se centrifugaron a 1250 rpm por 5 min. Se decantó el medio y el pellet celular se lavó una vez con 1ml de PBS. A estos primeros tubos se le agregó 50 µl de RNAsa y 10 µl de PI, en este orden, y se incubó por 15 minutos antes de ser analizados en el citómetro de flujo. Los segundos tubos se centrifugaron igualmente a 1250 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se añadió un ml de PBS. Posteriormente se cuantificó el contenido de ADN en el citómetro de flujo Attun NxT utilizando el canal BL3 (Excitación 488 nm/ Emisión 695 nm).

Capítulo 3. Resultados

3.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de óxido de zinc

En el desarrollo de esta investigación se caracterizaron los parámetros fisicoquímicos de las nanopartículas de ZnO por tres métodos diferentes, espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis), dispersión de luz dinámica (DLS) y Microscopia electrónica de transmisión (TEM).

3.1.1. Distribución de tamaños de las ZnO NPs por dispersión de luz dinámica (DLS)

Se dispersaron las muestras de NPs de ZnO por dos protocolos diferentes, la Figura 18 presenta los histogramas de distribución de tamaño con respecto al porcentaje de las NPs de ZnO medidas. La Figura 18a se observa que la muestra de NPs de ZnO derivada de la dispersión con el protocolo 1, generó un diámetro hidrodinámico de 255 nm y un índice de polidispersidad de 0.261. Es importante mencionar que el valor del diámetro hidrodinámico es similar al reportado por Saud Alarifi *et al.* (2013). En la Figura 18b se muestra el histograma de la distribución de los tamaños de las NPs de ZnO obtenidas por la dispersión ultrasónica con el protocolo 2 en donde se obtiene un promedio de diámetro hidrodinámico de 622.2 nm con índice de polidispersidad de 0.480.

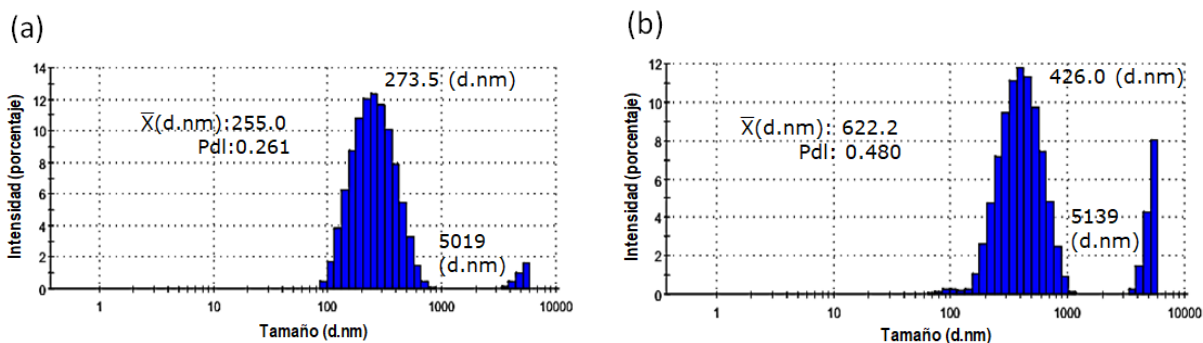


Figura 18. Caracterizaciones de NPs de ZnO de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS. Distribución de tamaño con respecto a la intensidad en las NPs de ZnO. **a)** 255.0 nm. **b)** 622.2 nm.

3.1.2. Plasmón de resonancia superficial por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)

La Figura 19 presenta los espectros obtenidos de la muestra de NPs de ZnO a una concentración de 1 mg/ml y 0.066 mg/ml, respectivamente y que fueron dispersadas en agua desionizada mediante ultrasonificación durante 10 y 15 minutos, con dos intervalos de agitación con vórtex respectivamente. Se muestra una banda de absorción en los 369.26 nm y otra en los 370.23 nm correspondientes a la de excitación del plasmón de resonancia superficial de las NPs de ZnO, además de ello, se observa una curva prolongada, que coinciden con la reportada por Saud Alarifi *et al.* (2013), en donde se describe una banda de absorción máxima en los 370 nm.

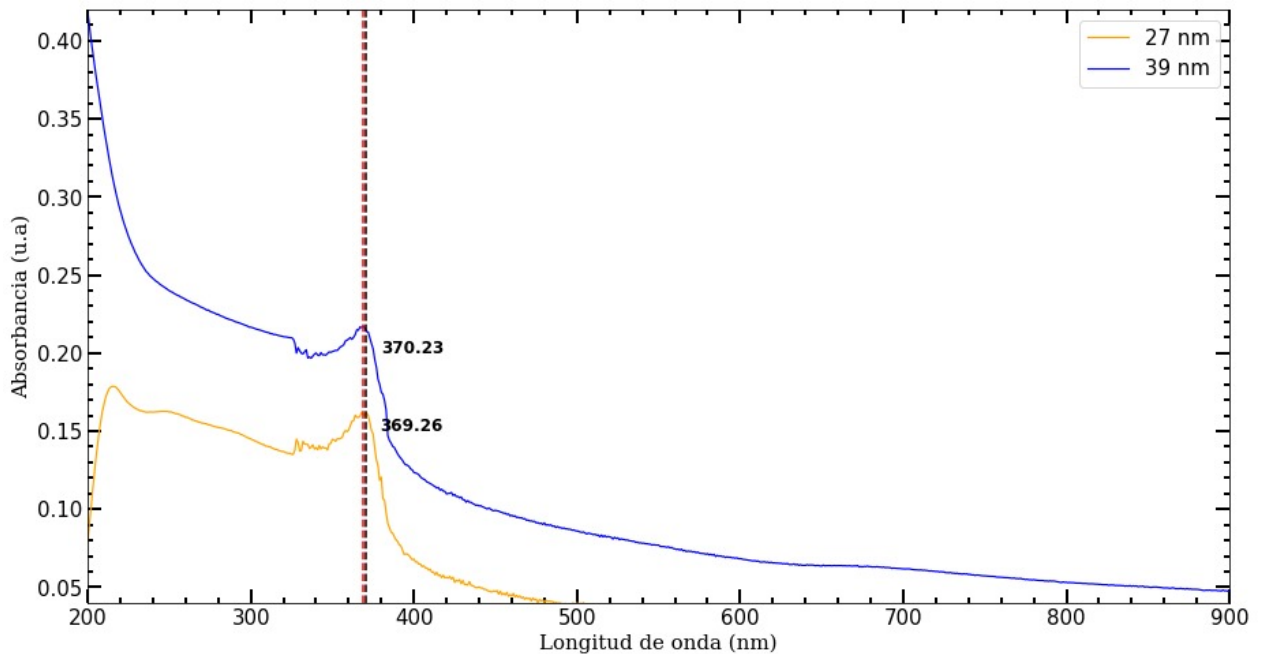


Figura 19. Caracterización del plasmón de resonancia superficial por espectroscopia ultravioleta-visible de dos diferentes muestras de ZnO NPs de diferente tamaño (27 nm y 39 nm) con absorbancias máximas de 320.23 nm y 369.26 nm, respectivamente.

3.1.3. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

En la Figura 21 se muestran las NPs de ZnO obtenidas con los protocolos de dispersión 1 y 2. Los espacios vacíos o entre las partículas se marcaron en la Figura 20 y estos se consideran los poros generados por la inter-aglomeración de las NPs de ZnO Pudukudy y Yaakob (2015). En las micrografías se puede observar que la mayoría de las NPs tienen una forma de hoja poligonal con superficies lisas. El diámetro promedio de las NPs de ZnO se calculó midiendo (**Figura 22**) más de 20 partículas en campos aleatorios de la vista de la micrografía por TEM y se encontró un tamaño de 27.2 nm para el protocolo 1 (**Figura 21a**) y 39.1 nm para el protocolo 2 (**Figura 21b**). Los tamaños de ambas NPs de ZnO de este trabajo son más grandes a lo que reportó Saud Alarifi *et al.* (2013) y muy similares a las que reportó Pudukudy y Yaakob (2015).

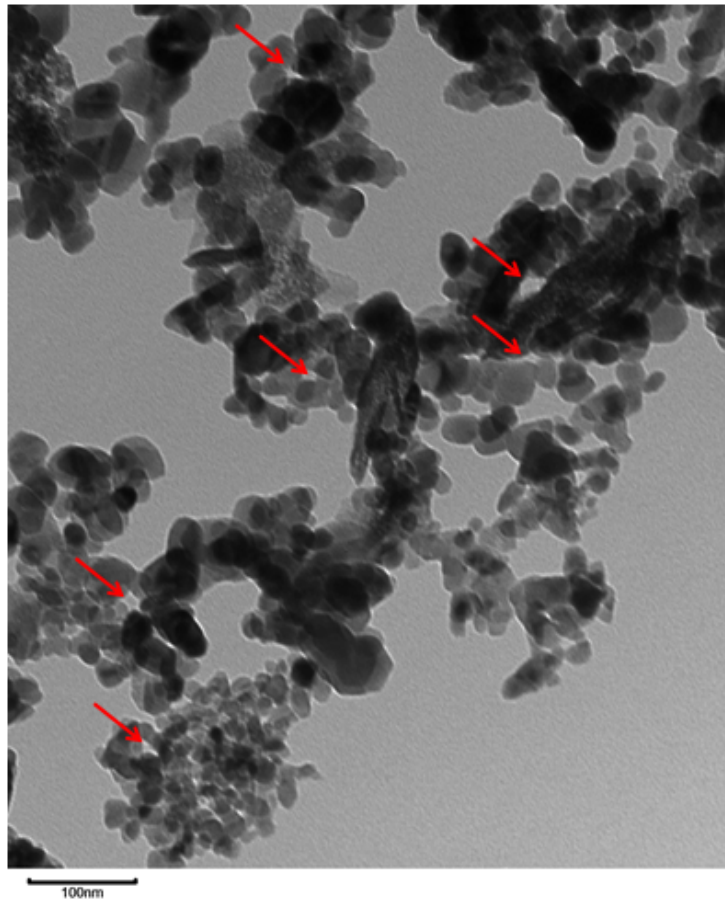


Figura 20. Caracterización por microscopia electrónica de transmisión (TEM). Los espacios vacíos se marcaron con una flecha color rojo la cual indican que existen poros generados por la inter-aglomeración de las NPs de ZnO.

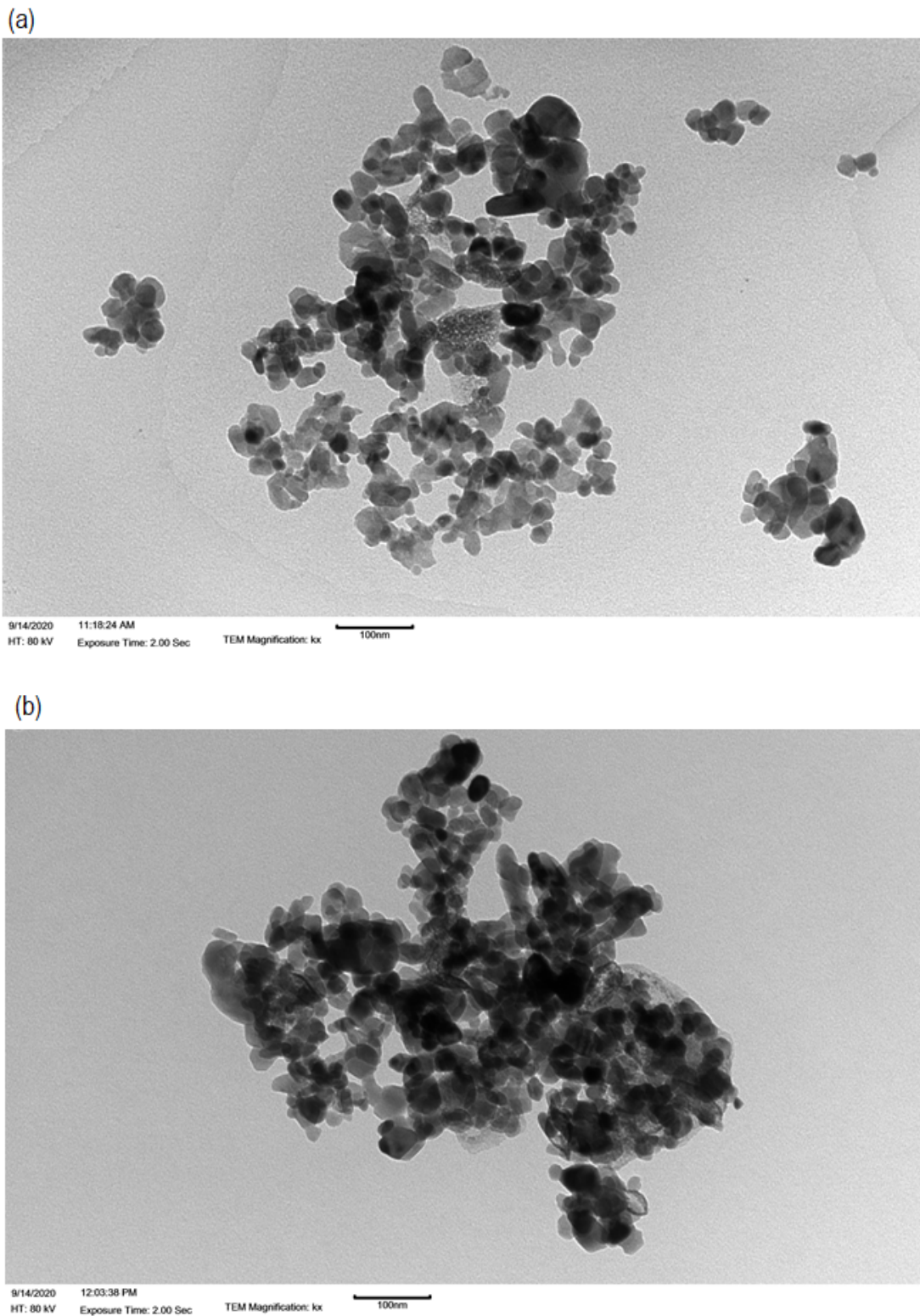


Figura 21. Caracterizaciones de NPs de ZnO por microscopía electrónica de transmisión (TEM). **a)** NPs generadas con el método de dispersión 1 con un tamaño promedio de 27.2 nm. Se observa en el contorno de las NPs un borde brillante el cual es característico de un recubrimiento por un polímero. **b)** NPs de ZnO obtenidas con el protocolo 2 con un tamaño promedio de 39.1 nm, en el cual no se encuentra a simple vista un contorno brillante en las NPs de ZnO.

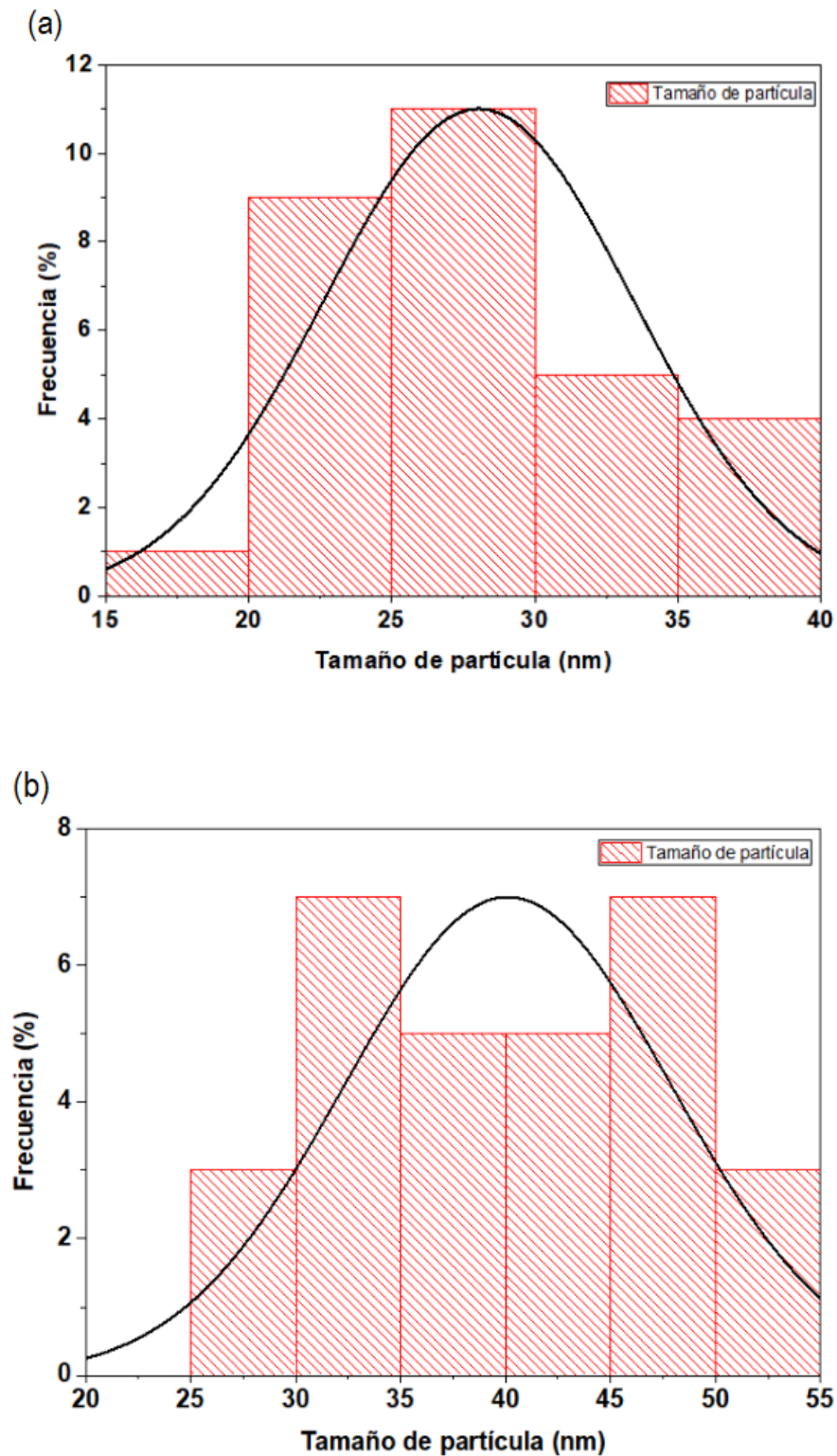


Figura 22. Histogramas del tamaño promedio de las NPs de ZnO generadas con el (a) protocolo 1 (tamaño promedio de 27 nm) y (b) NPs de ZnO dispersadas con 39 nm. Las mediciones realizadas fueron llevadas a cabo mediante el programa OriginPro 2018.

3.2. Resultados de biocompatibilidad

3.2.1. Viabilidad celular en osteoblastos, fibroblastos y melanoma expuestos a diferentes tamaños y concentraciones de ZnO NPs

La Figura 23 representa la viabilidad de la línea celular de pre-osteoblastos de ratón-E1 (MC3T3), fibroblastos (L929) y melanoma de ratón (B16-F10) cultivados por 24 h con diferentes concentraciones (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$) de NPs de ZnO de dos tamaños distintos: 27 nm y 39 nm. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT. Es importante enfatizar que la cantidad de MTT reducido y cuantificado como porcentaje, es un reflejo directo de la actividad metabólica de la célula, en particular de la funcionalidad de la mitocondria.

Las barras de la Figura 23 indican el porcentaje de viabilidad celular de las tres líneas celulares en presencia de las NPs de ZnO de 27 nm de tamaño, a diferentes concentraciones. Es posible observar en la gráfica (a) que los fibroblastos (L929) y los pre-osteoblastos (MC3T3) expuestos a todas las concentraciones de NPs de ZnO, presentaron un incremento significativo de la viabilidad celular ($P < 0.05$) para los fibroblastos y ($P < 0.05$) para los pre-osteoblastos. Sin embargo, la viabilidad de la línea celular de melanoma (B16-F10), si disminuye de una manera dependiente de la concentración de las NPs de ZnO de 27 nm, se puede observar que a concentraciones mayores (80 y 100 μM) hubo una disminución de la viabilidad celular en un 67 y 63 %, respectivamente, por lo que estas NPs sí son citotóxicas en estas células.

En la Figura 23b se observa el porcentaje de la viabilidad de las células expuestas a diferentes concentraciones de las NPs de ZnO de 39 nm de diámetro. En la línea celular de pre-osteoblastos (MC3T3), se observa una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración de las NPs, en las concentraciones mayores de 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de NPs de ZnO se cuantificó una viabilidad celular del 74 % y 59.4 %, respectivamente. Por el contrario, en las células de melanoma (B16-F10) y fibroblastos (L929), se observa que los porcentajes de viabilidad celular son similares al control en las concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de NPs de ZnO de 39 nm, pero la viabilidad celular disminuye a partir de los 40 $\mu\text{g/ml}$, este comportamiento es dependiente de la concentración, en la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de NPs de ZnO se observa un porcentaje de la viabilidad celular del 79 % para melanoma y 72.2 % para fibroblastos.

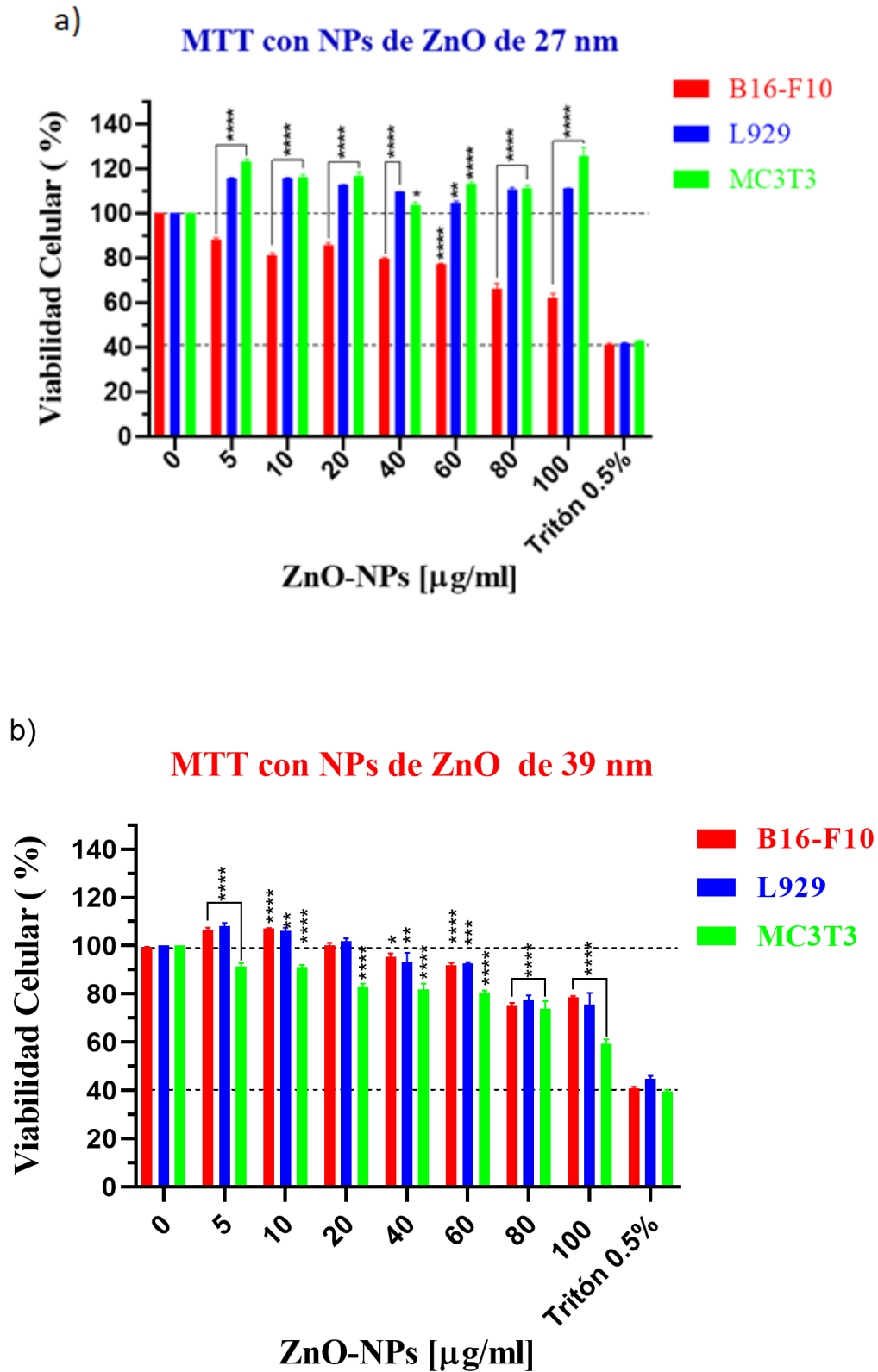


Figura 23. Ensayo de viabilidad celular de pre-osteplastos (MC3T3) en color verde, fibroblastos (L929) en color azul y finalmente de melanoma (B16-F10) en color rojo expuestas a diferentes tamaños de (a) 27 nm y (b) 39 nm, ambos ensayos se realizaron con concentraciones de (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes con sus triplicados internos. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías, en donde la significancia estadística representa * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.3. Determinación del estrés oxidativo

3.3.1. Estrés oxidativo en osteoblastos, fibroblastos y melanoma con ZnO NPs.

La Figura 24 representa el porcentaje de ROS producidas en los pre-osteoblastos de ratón (MC3T3), fibroblastos (L929) y células de melanoma (B16-F10) al estar expuestas por 24 h con las NPs de ZnO. Estos resultados muestran si las NPs de ZnO son capaces de inducir estrés oxidativo significativo, el análisis se realizó de forma indirecta a través de la cuantificación de la fluorescencia del reactivo H₂DCFDA el cual es reducido por las ROS generadas en el citoplasma de la célula. La producción de ROS se estimó tomando como referencia la fluorescencia del control negativo el cual consiste en las células cultivadas en medio de cultivo sin NPs, por lo que éste refleja las condiciones normales del crecimiento celular y por lo tanto la producción endógena de ROS.

En la Figura 24a se observa que las NPs de ZnO de 27 nm, inducen en la línea celular de melanoma (B16-F10) un incremento en el porcentaje de ROS producidas por las células que han sido expuestas a las concentraciones de 0, 5, 40, 80 y 100 µg/ml con respecto al control. En la línea celular de fibroblastos (L929), se observa que la incubación con las NPs de ZnO de 27 nm, induce un ligero incremento en la producción de ROS con respecto al control, siendo únicamente significativo ($P < 0.05$) en la concentración de 80 µg/ml de NPs. Por el contrario en la línea celular de pre-osteoblastos (MC3T3), se observa que las NPs de ZnO inducen un decremento en el porcentaje de ROS producidas por las células tratadas con respecto al control. Observándose una disminución considerable del porcentaje de ROS ($P < 0.05$) en los pre-osteoblastos tratados con 40 µg/ml de las NPs de ZnO de 27 nm.

La Figura 24b representa el porcentaje de ROS generadas por la incubación de las células con NPs de ZnO de 39 nm. Se observa que en la línea celular de melanoma (B16-F10), las NPs indujeron un incremento significativo de la producción de ROS con respecto al control, únicamente en la concentración de 80 µg/ml ($P < 0.05$). Por el contrario en las líneas celulares de fibroblastos (L929), el porcentaje de la producción de ROS respecto al control, inducidas por la exposición a diferentes concentraciones de

las NPs de ZnO de 39 nm es fluctuante, y se observa un decremento significativo en el porcentaje de ROS únicamente en las concentraciones de 5, 80 y 100 μ g/ml. Para el caso de los pre-osteoblastos (MC3T3), la incubación con diferentes concentraciones de NPs de ZnO de 39 nm, indujeron una disminución significativa de la producción de las ROS respecto al control. Este comportamiento es dependiente de la concentración, pues a mayor cantidad de NPs mayor es la disminución del porcentaje de ROS producidas por las células. Siendo el porcentaje más bajo (10%) el encontrado a partir de los 60 μ g/ml y hasta los 100 μ g/ml de NPs de ZnO.

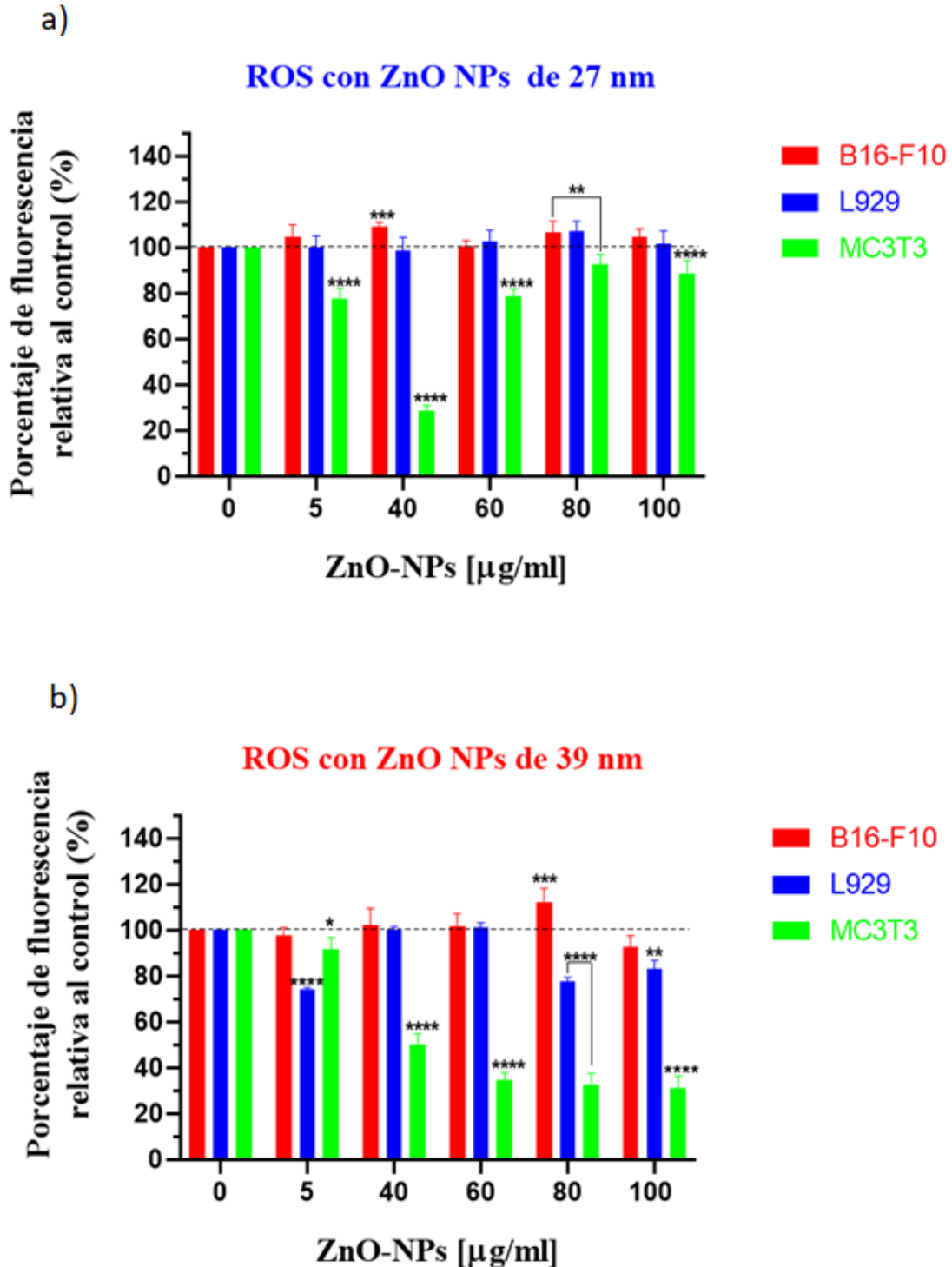


Figura 24. Cuantificación de las ROS producidas en los pre-osteoblastos de ratón (MC3T3-E1), fibroblastos (L929) y células de melanoma (B16-F10) incubadas con diferentes tamaños y concentraciones de NPs de ZnO. Gráficas del porcentaje de ROS producidas por las células incubadas con NPs de ZnO de dos tamaños diferentes (a) 27 nm y b) 39 nm. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de tres ensayos independientes con sus triplicados internos. El análisis estadístico que se realizó en ambas gráficas fue un ANOVA de dos vías, con el software GraphPad Prism 8.0.2, en donde la significancia estadística representa * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.4. Evaluación del efecto de las NPs de ZnO en el ciclo celular

3.4.1. Efecto de las NPs de ZnO en el ciclo celular de osteoblastos, fibroblastos y melanoma

Las Figuras 25a y 25b representan los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de las NPs de ZnO de diferentes tamaños (27 nm y 39 nm) y concentraciones en el ciclo celular de los pre-osteoblastos de ratón (MC3T3-E1). Las barras de la Figura 26a y 26b indican el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las diferentes fases del ciclo celular: G₀/G₁, S y G₂/M. Además, mediante la técnica de citometría de flujo y el marcaje del ADN con yoduro de propidio, es posible identificar una fase denominada como Sub G₀/G₁, la cual indica la proporción de células que están en apoptosis.

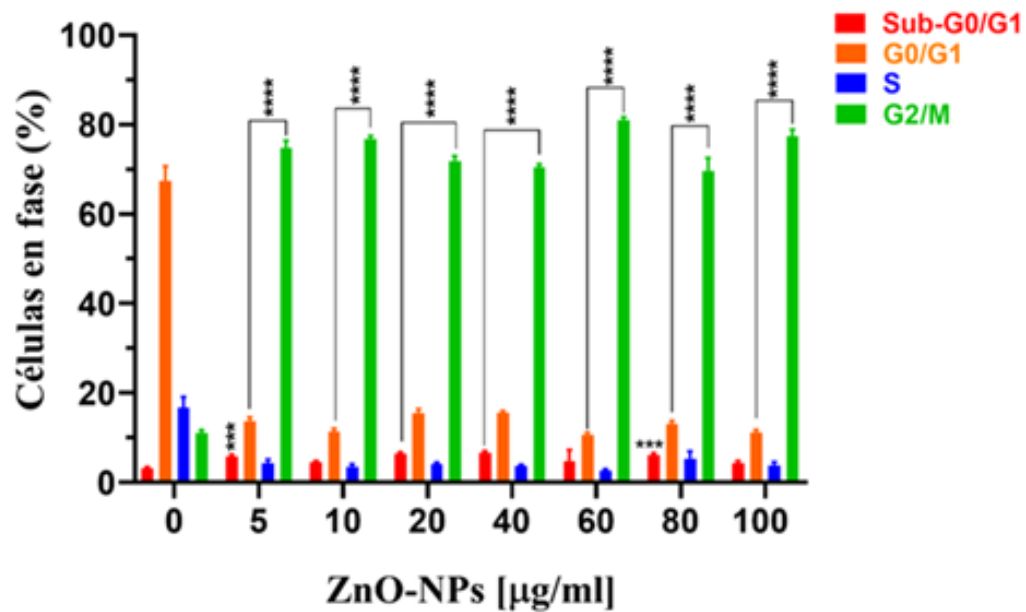
Es posible observar en la Figura 25a los resultados de la evaluación del efecto de las NPs de ZnO con un tamaño promedio de 27 nm en el ciclo celular de los pre-osteoblastos de ratón. En ausencia de NPs 0 $\mu\text{g/ml}$, el porcentaje normal de células en la fase G₀/G₁ es el más abundante, seguido de la fase S y G₂/M. Sin embargo, cuando los pre-osteoblastos son incubados con concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de las NPs de ZnO de 27 nm, se observa que en todas estas muestras, existe un cambio con respecto al control en relación al porcentaje de las poblaciones celulares en las diferentes etapas del ciclo celular. En donde es evidente que la fase G₂/M es la más abundante en todos los tratamientos, mientras que la fase G₀/G₁ es menos abundante. Por lo que los pre-osteoblastos que han sido expuestos a las diferentes concentraciones de NPs de ZnO de tamaño de 27 nm se encuentran arrestadas en la fase G₂/M.

Por otro lado en la Figura 25b se presentan los porcentajes de pre-osteoblastos de ratón (MC3T3-E1) que se encuentran en los diferentes estadios del ciclo celular al ser expuestos a concentraciones crecientes de NPs de ZnO con un tamaño promedio de 39 nm de ZnO NPs. Es posible observar en la Figura 25b que el control muestra una mayor población celular en la fase G₀/G₁, seguida de una población en la fase Sub G₀/G₁, S y G₂/M. La abundancia en la población Sub G₀/G₁ indica que la células se encontraban en apoptosis, esto puede deberse a la manipulación de las propias células o bien al

número de pase y por lo tanto el número de veces que ha sido cultivada, sin embargo la tendencia en la abundancia de la población G₀/G₁ se mantiene. Al exponer a los pre-osteoblastos a las diferentes concentraciones de las NPs ZnO de 39 nm, es posible observar un aumento de la población celular en la fase G₂/M, seguida de la fase S y Sub G₀/G₁ por lo que en ambos casos, la exposición de las células MC3T3 a los dos tamaños de 27 nm y 39 nm de NPs de ZnO, ocasiona un cambio en el porcentaje de células que se encuentran en las fase del ciclo celular respecto del control siendo mayor la población celular arrestada en la fase G₂/M.

a)

ADN de MC3T3 con NPs de ZnO de 27 nm



b)

ADN de MC3T3 con NPs de ZnO de 39 nm

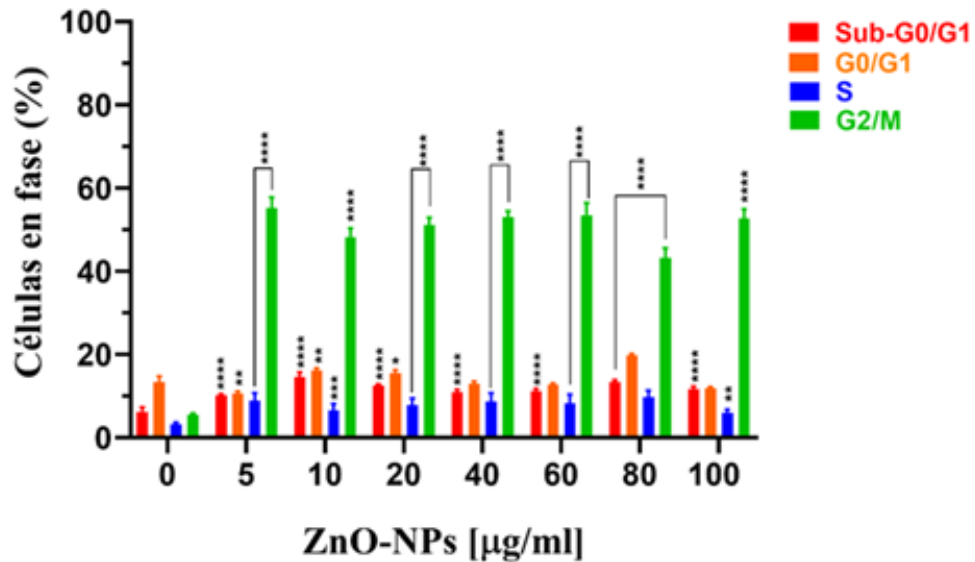


Figura 25. Evaluación del efecto de las ZnO NPs de (a) 27 nm y (b) 39 nm en el ciclo celular de preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1) expuestos por 24 horas a concentraciones de (5,10,20,40, 60,80 y 100 µg/ml). El análisis estadístico que se realizó en ambas gráficas fue un ANOVA de dos vías, con el software GraphPad Prism 8.0.2, en donde la significancia estadística representa *p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

La Figura 26a y 26b representan la evaluación del efecto de las NPs de ZnO de diferentes tamaños (27 y 39 nm) en el ciclo celular de fibroblastos. Las barras de la Figura 27a y 27b indican el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular: Sub-G0/G1, G0/G1, S y G₂/M en presencia de NPs de ZnO. Cabe destacar que en esta línea celular de fibroblastos, L929, también se identifica la fase Sub-G0/G1 correspondientes a las células apoptóticas.

Es posible observar en la Figura 26a, los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de las NPs de ZnO con un diámetro hidrodinámico promedio de 27 nm en el ciclo celular de fibroblastos de ratón (L929). Los resultados muestran que a 0 $\mu\text{g/ml}$ de NPs de ZnO, existe una mayor población celular en la fase G0/G1, seguido por la fase S, Sub-G0/G1 y finalmente por la fase G₂/M. Evaluando la proporción de células de la línea celular de L929 presentes en la muestra que ha sido expuesta a diferentes concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de NPs de ZnO, se encontró que existe una diferencia significativa de poblaciones celulares con respecto al control, siendo mayor la población celular en fase S, que las fases sub G0/G1, G0/G1 y G₂/M. Por lo que la línea celular de fibroblastos expuestos a NPs de ZnO de 27 nm, se encuentran arrestadas en la fase S del ciclo celular.

En cambio en la Figura 26b se presentan los porcentajes de fibroblastos de ratón (L929) que se encuentran en los diferentes estadios del ciclo celular a ser expuestos a las diferentes concentraciones de NPs de ZnO con un diámetro hidrodinámico promedio de 39 nm. En la Figura 27b se observa que el control (0 $\mu\text{g/ml}$) tiene una mayor población celular en la fase G0/G1. Al exponer las células de fibroblastos de ratón a diferentes concentraciones de NPs de ZnO se puede observar un incremento en la fase G₂/M del ciclo celular seguido por la fase S, G0/G1 y finalmente, la fase Sub-G0/G1 en concentraciones de 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Las mediciones del contenido de ADN, indican que la fase G₂/M del ciclo celular, es el punto de control en el cual las NPs de ZnO de 39 nm arrestan estas células.

Por lo que los diferentes tamaños de NPs de ZnO tienen efectos distintos en el ciclo celular de la misma línea celular fibroblastos de ratón (L929). Las NPs con un diámetro hidrodinámico promedio de 27 nm promueven un arresto en la fase S del ciclo celular, por el contrario a un diámetro hidrodinámico promedio de 39 nm, las NPs de ZnO inducen un mayor arresto en la fase G₂/M del ciclo celular.

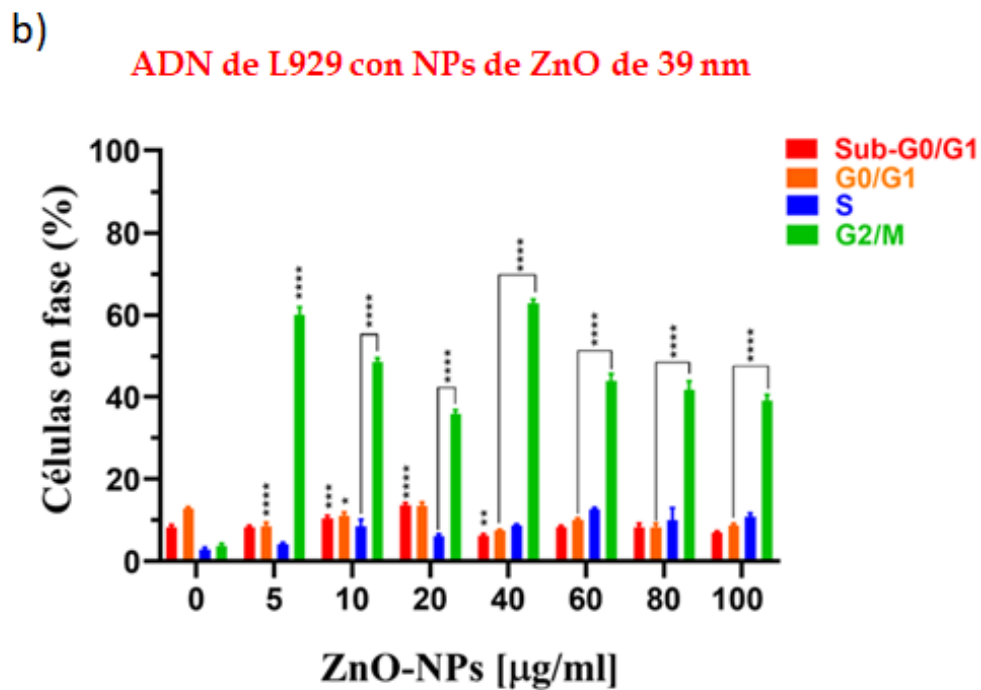
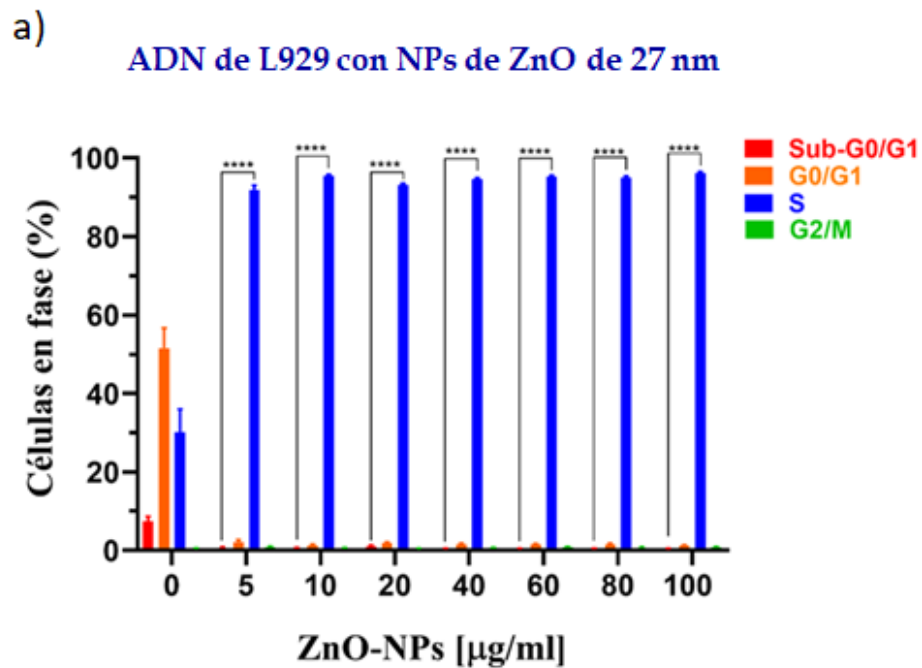


Figura 26. Evaluación del efecto de las NPs de ZnO de (a) 27 nm y (b) 39 nm en el ciclo celular de fibroblastos de ratón (L929) expuestos por 24 horas a concentraciones de (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml). El análisis estadístico que se realizó en ambas gráficas fue un ANOVA de dos vías, con el software GraphPad Prism 8.0.2, en donde la significancia estadística representa * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Las Figuras 27a y 27b representan los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de las NPs de ZnO de diferentes tamaños (27 y 39 nm) y concentraciones en el ciclo celular de melanoma de ratón (B16-F10). Las barras de la Figura 27a y 27b reflejan el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las diferentes fases del ciclo celular: G0/G1, S y G₂/M en B16-F10 en presencia de NPs de ZnO. Es importante mencionar que en esta línea celular cancerígena de melanoma B16-F10 no se visualiza la fase Sub-G0/G1.

Es posible observar en la Figura 27a los resultados de la evaluación del efecto de las NPs de ZnO con un diámetro hidrodinámico de 27 nm en el ciclo celular de las células de melanoma de ratón. En ausencia de NPs de ZnO, la fase S es la que tiene un abundante contenido de ADN, seguido por la fase G₂/M y finalmente G0/G1. Sin embargo, cuando las células de melanoma son incubados a diferentes concentraciones de NPs de ZnO de 27 nm, se observa un arresto en la fase G₂/M del ciclo celular a partir de la concentración de 60 µg/ml, mientras que la fase S es menos abundante y finalmente la fase G0/G1. Por lo que en células de melanoma que han sido expuestos a concentraciones de 60, 80 y 100 µg/ml existe un arresto en la fase G₂/M del ciclo celular.

Por otro lado, en la Figura 27b se presentan los porcentajes de la línea celular de melanoma de ratón (B16-F10) que se encuentran en los diferentes estadios del ciclo celular al ser expuestos a concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml de NPs de ZnO con un diámetro hidrodinámico promedio de 39 nm. Es posible observar en la Figura 27b que el control muestra una mayor población celular en la fase S, seguida por una población en la fase G0/G1 y G₂/M.

Sin embargo, cuando las células de melanoma son incubados a diferentes concentraciones de NPs de ZnO de 39 nm, se observa que en todos los tratamientos, existe un cambio con respecto al control en relación al porcentaje de las poblaciones celulares en las etapas del ciclo celular. En donde la fase G₂/M es la más abundante en todas las concentraciones, mientras que la fase S es la menos abundante. Por lo que es posible observar que las células de melanoma de ratón que han sido expuestas a diferentes tamaños (27 y 39 nm) de NPs de ZnO existe un arresto en la fase G₂/M a altas concentraciones 60, 80 y 100 µg/ml en 27 nm y un arresto en la fase G₂/M en concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml en 39 nm.

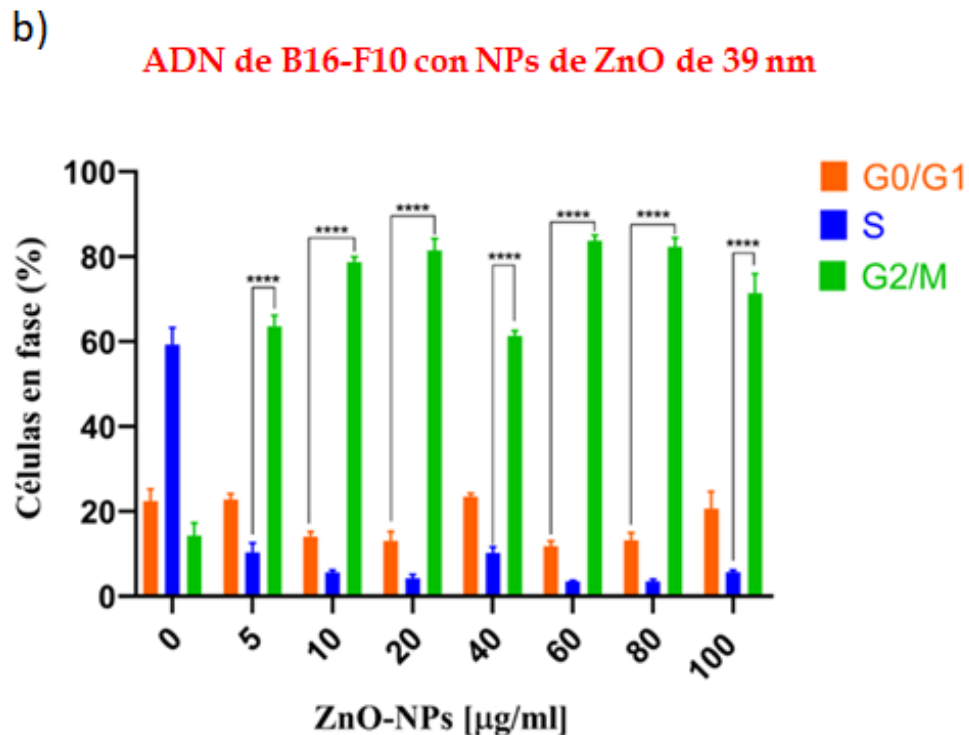
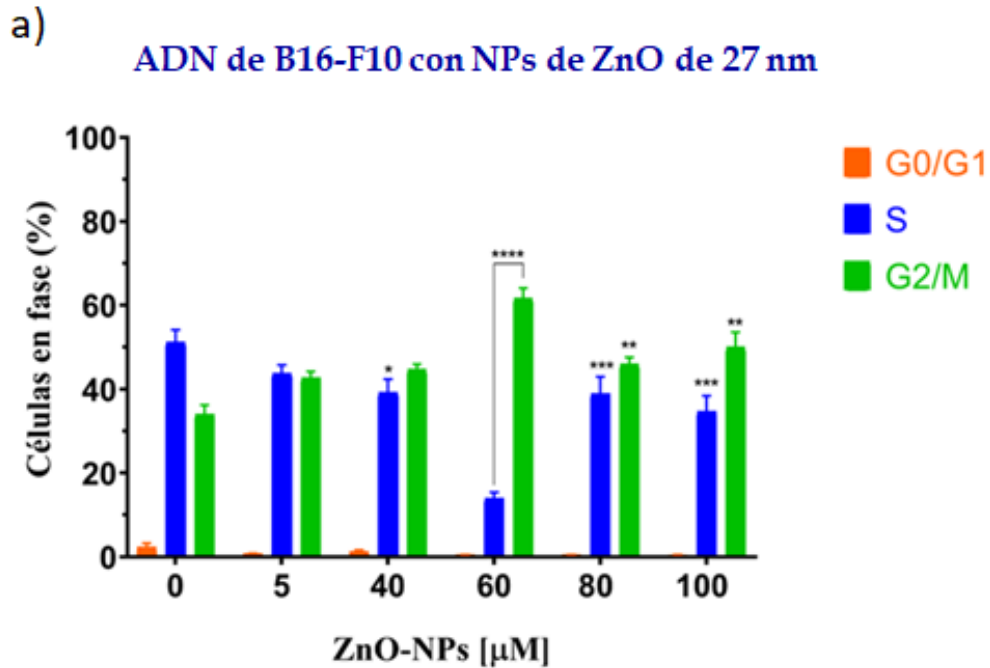


Figura 27. Evaluación del efecto de las NPs de ZnO de (a) 27 nm y (b) 39 nm en el ciclo celular de melanoma de ratón (B16-F10) expuestos por 24 horas a concentraciones de (5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μg/ml). El análisis estadístico que se realizó en ambas gráficas fue un ANOVA de dos vías, con el software GraphPad Prism 8.0.2, en donde la significancia estadística representa * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Capítulo 4. Discusión

4.1. Caracterización

Para este trabajo, se decidió utilizar diferentes protocolos para la dispersión de las NPs, la diferencia entre ellos consistía en la concentración de las NPs y el tiempo de ultrasonificación. Después de varias pruebas con distintos parámetros se observó que sólo dos de los cuatro protocolos utilizados al visualizar el histograma de distribución de los tamaños de las NPs de ZnO obtenidas por la dispersión ultrasónica y medidas por el DLS, se encontró que su promedio de tamaño hidrodinámico era alrededor de los 700 nm además de ello existía una gran variación en los tamaños de las NPs de ZnO lo cual se decidió utilizar los dos protocolos mencionados en la metodología de este trabajo. De esa forma, se caracterizaron dos muestras de las NPs de ZnO.

En la medición de la dispersión dinámica de la luz (DLS), las partículas tienden a aglomerarse en medio acuoso, midiendo así el tamaño de los agregados de partículas en lugar de las partículas individuales. Por lo tanto, la dispersión dinámica de luz provee de un diámetro hidrodinámico ponderado por intensidad para una colección de partículas, por lo que cualquier polidispersidad de la muestra sesgará el diámetro promedio hacia tamaños de partículas mas grandes.

Es importante mencionar que los resultados obtenidos en la caracterización por DLS mostraron que las muestras de NPs de ZnO dispersadas con el protocolo 1 y 2 tenían un tamaño grande de 255 y 622 nm, respectivamente. La dispersión dinámica de luz mide el movimiento browniano y la posterior distribución del tamaño de una colección de partículas en solución, y proporciona un diámetro hidrodinámico promedio que generalmente es mayor que el diámetro que puede obtenerse por medio de la microscopia electrónica de transmisión (TEM), ya que en el DLS, la medición que se realiza no sólo es del tamaño de la NP, si no del diámetro hidrodinámico, esto es porque incluye varias capas de solventes. En este sentido, se decidió medir las NPs de ZnO por TEM y el tamaño real promedio de las NPs de ZnO para el protocolo 1 fue de 27.2 ± 5 nm y para el protocolo 2 fue de 39.1 ± 3 nm. En las micrografías de TEM del protocolo 1 se pudo observar en el contorno de las NPs de ZnO un borde brillante el cual es característico de un recubrimiento por un polímero de polivinilpirrolidona (PVP). Sin embargo en el protocolo 2 este contorno brillante no se encuentra a simple

vista, por lo que se trata de una desestabilización de las NPs de ZnO debido al tiempo y frecuencia del ultrasonicado.

Los resultados de la dispersión dinámica de la luz permitieron determinar que el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las NPs de ZnO dispersadas con el protocolo 1 son muy similares a las NPs reportadas por Saud Alarifi *et al.* (2013).

Por otro lado el plasmón de resonancia superficial medido con el espectrofotómetro de UV-vis mostró una banda de absorción en la longitud de onda de 369 nm para las NPs de ZnO de 27 nm y de 370 nm para las de 39 nm, con una curva prolongada a lo largo del espectro. Estas características coinciden con las reportadas por Saud Alarifi *et al.* (2013); Namvar *et al.* (2015), en donde se reporta una banda de absorbancia máxima correspondiente al plasmón de resonancia superficial a los 370 nm.

4.2. Biocompatibilidad

Es importante mencionar que la decisión de estudiar el efecto de las NPs de ZnO en las líneas celulares de origen murino de fibroblastos (L929), pre-osteoblastos (MC3T3-E1) y melanoma (B16-F10), se debe a que es indispensable comparar los efectos toxicológicos de las NPs en líneas celulares normales o “sanas” y en líneas celulares provenientes de alguna patología, que en este caso, se derivan de una neoplasia de piel.

Debido a que una de las aplicaciones más utilizadas de las NPs de ZnO es en los bloqueadores solares, se decidió hacer este estudio usando células del tejido conectivo, para tratar de comprender los efectos ocasionados en un escenario real, por lo que éstas serían las primeras células en contacto con estos productos de uso diario. Como una primera aproximación a este análisis, se eligieron los fibroblastos (L929) y los pre-osteoblastos (MC3T3-E1) como las células provenientes del tejido conectivo. Además, se decidió comparar los efectos de las NPs en una línea celular con alguna patología pero que fuera derivada de tejido conectivo, por lo que se eligió el cáncer de piel o melanoma, además de ser uno de los más abundantes y agresivos que se reportan. Esto es importante de evaluar, ya que las respuestas celulares y moleculares a la exposición de las NPs pudieran ser diferentes en un modelo celular sano que en

uno derivado de una patología crónica.

Por lo tanto, en este trabajo de Nanotoxicología, se evaluó la biocompatibilidad *in vitro* a través de ensayos de citotoxicidad de dos diferentes tamaños de NPs de ZnO (27 y 39 nm) en las líneas celulares de ratón fibroblastos (L929), pre-osteoblastos (MC3T3-E1) y melanoma (B16-F10). Estos ensayos colorimétricos, se midieron a través de la reducción del reactivo MTT, el cual determina la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Cuando las células mueren, éstas pierden la capacidad de convertir el MTT a formazán, ya que las enzimas mitocondriales encargadas de ello se inactivan por efecto de la muerte celular.

Los resultados obtenidos muestran que las NPs de ZnO con un tamaño promedio de 27 nm, no mostraron ningún efecto tóxico en los fibroblastos (L929) y pre-osteoblastos (MC3T3-E1), por el contrario, el porcentaje de reducción del MTT para ambas líneas celulares es mayor que el control. Sin embargo, en la línea celular de melanoma, B16-F10 se observó claramente una afectación negativa en la viabilidad celular la cual es dependiente de la concentración, por lo tanto, las NPs de ZnO con un tamaño promedio de 27 nm son tóxicas para esta línea celular de cáncer de piel. La susceptibilidad de líneas celulares de cáncer respecto de el mismo tipo celular pero sano, ya ha sido descrito por Hanley *et al.* (2008), quien demostró que las células T humanas cancerosas tienen alrededor de 30 veces mas sensibilidad a las NPs de ZnO que las células T normales.

Para el caso de las ZnO NPs con un tamaño promedio de 39 nm, la línea celular de pre-osteoblastos de ratón (MC3T3-E1) fue la que tuvo una respuesta celular de toxicidad a la exposición a estas NPs, siendo el efecto citotóxico claramente dependiente de la concentración. Sin embargo, en líneas celulares de cáncer de piel (B16-F10) y de fibroblastos (L929), la viabilidad celular sólo disminuyó en las concentraciones más altas. Con esto se puede discutir que el tamaño de NPs de ZnO afecta de manera diferente a cada línea celular dependiendo de cada concentración.

Akhtar *et al.* (2012) reportaron el efecto de NPs de ZnO con diámetro hidrodinámico de 131 nm y potencial zeta de -31 mV, en tres líneas de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), adenocarcinoma de pulmón humano (A549) y epitelio bronquial humano (BEAS-2B), las cuales fueron susceptibles a la muerte celular por el

efecto de la incubación con las NPs de ZnO. Por el contrario, en células primarias de rata (astrocitos y hepatocitos) no se indujo la muerte celular por efecto de la exposición a esas mismas NPs. Ellos sugieren que la capacidad de las NPs para inducir toxicidad se ha atribuido a su mayor reactividad superficial, siendo las partículas más pequeñas la que tienen una mayor área de superficie por unidad de masa, lo que resulta en la producción de más especies reactivas de oxígeno en el entorno celular y por lo tanto una mayor muerte celular.

La disminución de la viabilidad celular podría atribuirse al estrés oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno, en las células de cáncer de piel (B16-F10) que fueron tratadas con las NPs de ZnO de 27 nm, se observó una muerte celular del 63 %, al correlacionar estos datos con la producción de ROS, se observó que en esa misma concentración de NPs, se inducía un incremento significativo de las ROS (59%). Además, para el caso de las líneas celulares de fibroblastos y osteoblastos, las NPs de ZnO de 27 nm, no fueron citotóxicas y al correlacionar estos datos con los resultados obtenidos de los ensayos de ROS, se observó que no existe un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ninguna de las concentraciones evaluadas. Por lo tanto, los resultados indican que el efecto citotóxico de las NPs de ZnO de 27 nm no está relacionado con el incremento en la producción intracelular de ROS.

Las ROS generadas por las NPs pueden agotar los antioxidantes endógenos, alterar la función mitocondrial y causar daño oxidativo al ADN (Birben *et al.*, 2012). Los desarrollos actuales en la investigación del cáncer sugieren que una serie de estímulos apoptóticos comparten mecanismos de acción comunes, caracterizados por la generación de ROS a través del estrés oxidativo. Akhtar *et al.* (2012) reportó que el contenido de ROS en las células HaCaT (queratinocitos de piel humana), aumentó después del tratamiento con 20 μ M de NPs de ZnO con tamaño de 100 nm durante 6 horas. Esto sugiere que las ROS se inducen como un evento temprano en respuesta al estrés inmediato provocado por la exposición a las NPs de ZnO, es importante precisar que este incremento en las ROS, ocurrió antes de que disminuyera la viabilidad de las células HaCaT.

Estudios previos han demostrado que las NPs de ZnO indujeron inmunotoxicidad en macrófagos murinos (RAW264.7), toxicidad celular y apoptosis, en células malignas de piel y en pacientes con enfermedades respiratorias a través de la generación de espe-

cies reactivas de oxígeno (ROS), daño en el ADN y activación de la vía de señalización de p53 (Gao *et al.*, 2016).

Además se ha reportado que la exposición a las NPs de ZnO por un largo plazo estimula la generación de ROS, iniciando procesos de muerte celular y afectando también las proporciones de las poblaciones en las diferentes etapas del ciclo celular (Lee *et al.*, 2020). Las NPs de ZnO pueden inhibir el crecimiento celular al reducir la proliferación, lo que se ha relacionado con la detención o arresto del ciclo celular en varias fases. Se sabe que la progresión del ciclo celular se bloquea en respuesta a diversas señales internas y externas. El supresor tumoral p53 puede activar los puntos de control del ciclo celular G₂/M, la reparación del ADN y las respuestas apoptóticas para mantener la estabilidad genómica Gao *et al.* (2016).

Otra consideración para la generación de ROS es la naturaleza de los iones metálicos en la superficie de la NP de ZnO. Los iones metálicos con valencia variable, como Fe²⁺, Cu⁺, Mn²⁺, Cr⁵⁺ y Ni²⁺, podrían contribuir a la generación de radicales libres a través de una reacción de tipo Fenton Sandström (1995). Sin embargo, el zinc no se considera un reactivo de Fenton debido a su valencia invariable (2⁺) (Nakamura *et al.*, 2007).

Yin *et al.* (2010) reportaron la relación entre la concentración media inhibitoria (IC₅₀) y los niveles de ROS en varios tipos de NPs de ZnO. Los resultados arrojaron que a excepción de las NPs recubiertas de polimetilmetacrilato (PMMA, por sus siglas en inglés), la (IC₅₀) mostró una relación inversa con los niveles de ROS, es decir una IC₅₀ más baja se correlacionó con los niveles de ROS más altos. En el caso de las NPs de ZnO sin recubrimiento, ocasionaron que los niveles más altos de ROS se presentaran desde una (IC₅₀) más baja, es probable que la captura de electrones en la superficie sin recubrimiento de las NPs, se vea menos obstaculizada que para las NPs recubiertas, lo que da como resultado la generación de más radicales hidroxilo y el consiguiente estrés oxidativo. Para las NP de ZnO recubiertas, los sitios donadores y aceptores de electrones activos en la superficie están protegidos por recubrimientos estables y, por lo tanto, la posibilidad de captura de electrones y generación de ROS puede reducirse eficazmente.

4.3. Ciclo celular

Aunque los ensayos de citotoxicidad de las NPs de ZnO se han reportado en diferentes líneas celulares, poco se sabe sobre el efecto en el ciclo celular. La citotoxicidad puede ser inducida por diferentes mecanismos moleculares. Se sabe que uno de los principales mecanismos de citotoxicidad de los NMs es a través de la generación de estrés oxidativo (Mendoza y Brown, 2019). Sin embargo, existen otros mecanismos como el daño al ADN y el arresto en el ciclo celular, que también pueden inducir la muerte celular programada (Pucci *et al.*, 2000). Por lo tanto, es importante determinar cuáles son los mecanismos moleculares asociados a las respuestas celulares inducidas por la exposición a los NMs. En este trabajo se le da importancia a uno de los tipos de NMs más utilizado en la industria cosmética que son las NPs de ZnO (Dréno *et al.*, 2019).

Debido a su capacidad para bloquear los rayos UV, las NPs de ZnO son ampliamente utilizadas en los bloqueadores solares, sin embargo, cada vez son mayores las evidencias que apuntan a su efecto fototóxico en células de piel (Wang *et al.*, 2013). Uno de los efectos colaterales de esta toxicidad, es el daño al ADN derivada del incremento en la producción de ROS (Heim *et al.*, 2015). La muerte de estas células además de estar ligada al estrés oxidativo, está relacionada con el arresto celular provocando por el efecto genotóxico de las NPs de ZnO (Gao *et al.*, 2016).

Por esta razón, uno de los objetivos centrales de este trabajo de tesis, fue el de evaluar el efecto de la exposición a dos diferentes tamaños de NPs de ZnO en las líneas celulares de tejido conectivo, como un modelo para entender los mecanismos moleculares y celulares que son inducidos por los NMs. Es importante resaltar que existen pocos trabajos que evalúen el efecto de los NMs en particular de las NPs de ZnO en el ciclo celular, por lo que este estudio contribuye para el conocimiento de los efectos toxicológicos promovidos por la exposición a los NMs de interés y uso comercial.

En este trabajo, se evaluó mediante citometría de flujo, el porcentaje de células en las diferentes etapas del ciclo celular de tres líneas celulares: fibroblastos (L929), pre-osteoblastos (MC3T3) y melanoma (B16-F10), en presencia de las diferentes concentraciones de los dos tamaños de NPs de ZnO.

La citometría de flujo es una herramienta indispensable en la Biología celular, los parámetros básicos de medición de la citometría de flujo incluyen la dispersión directa (FSC) y lateral (SSC) de la luz, que proporcionan información sobre el tamaño y la complejidad interna de la célula, respectivamente (Kang *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos del análisis del cambio en la proporción de células en las diferentes etapas del ciclo celular muestran que ambos tamaños de NPs de ZnO (TEM = 27 nm y 39 nm) en todas las concentraciones utilizadas modifican la proporción de células en las etapas del ciclo celular.

Para el caso de las células B16-F10 de melanoma, las gráficas de las fases del ciclo celular medidas por el contenido de ADN para ambos tratamientos con los dos tamaños de NPs de ZnO, indican que las células control B16-F10 no se detienen en la fase G1 y progresan a la fase S. Sin embargo, los tratamientos con las diferentes concentraciones y tamaños de NPs de ZnO inducen un arresto en la fase G₂/M del ciclo celular. Esto puede deberse a que las NPs de ZnO estén evitando que las células B16-F10 entren en la fase de mitosis, un factor para ello pudiera ser ocasionado por el daño al ADN (Gao *et al.*, 2016) al ser G₂/M un punto de control éste proporciona a las células una oportunidad de reparar el ADN dañado antes de propagar los defectos genéticos a las células hijas.

La proteína supresora de tumores p53 es un importante regulador del punto de control del ciclo celular tanto en G1/S como en G2/M. Las mutaciones en este gen están presentes en más de la mitad de todos los tumores humanos (Hollstein *et al.*, 1991).

Una de las funciones esenciales de p53 es detener las células en G1 después del daño genotóxico, para permitir la reparación del ADN antes de su replicación y de la división celular. En respuesta al daño masivo del ADN, la proteína p53 desencadena la vía de muerte celular apoptótica. Las células tumorales que carecen de la función normal de p53 no se detienen en G1 y tienen más probabilidades de progresar a S o G₂/ M y morir (Amundson *et al.*, 1998).

Se ha reportado que en células de cáncer de pulmón A549, las NPs de óxido metálico como las TiO₂, son capaces de inducir la fosforilación de p53 y la activación de la vía apoptótica mediada por esta proteína, ocasionando un arresto de esta línea celular

en la fase S y G₂/M (Biola-Clier *et al.*, 2020).

Se ha reportado que agentes quimioterapéuticos anticancerígenos de primera línea como el cisplatino y sus formulaciones encapsuladas en nanopartículas de albúmina sérica humana, inducen el arresto de las células B16-F10 en la fase G₂/M (Shrikhande *et al.*, 2015). Es importante mencionar que en ese estudio, correlacionan el arresto de las células de melanoma con el cambio en la morfología celular. Esos hallazgos también fueron encontrados en este trabajo (**Fotografías en Anexo 2**) en donde las células B16-F10 expuestas a concentraciones superiores de 60 µg/ml de NPs de ZnO, mostraban un cambio conformacional haciendo que las células fueran más redondas perdiendo así las prolongaciones de la membrana celular típicas necesarias para establecer las adhesiones focales en la superficie de la placa de cultivo y proliferar .

Por otro lado, en la línea celular sana de MC3T3 de pre-osteoblastos, las gráficas de las fases del ciclo celular medidas por el contenido de ADN por ambos tratamientos con los dos tamaños de NPs de ZnO, mostraron que en el control de MC3T3 hay una mayor población celular en la fase G₀/G₁. Por el contrario, con los tratamientos en las diferentes concentraciones y tamaños de NPs de ZnO inducen un arresto en la fase G₂/M del ciclo celular en una concentración de 80 µg/ml. Esto puede deberse a que las NPs de ZnO estén evitando que las células MC3T3 entren en la fase de mitosis, un factor que pudiera ser ocasionado por la genotoxicidad (Gao *et al.*, 2016) G₂/M es la segunda subfase de la interfase en el ciclo celular que procede directamente a la mitosis y el cual está ligado con un punto de control, éste proporciona señales en caso de que haya daño en el ADN celular y da oportunidad de reparar el ADN dañado antes de propagar los defectos a las células hijas. En donde podría tratarse de varios mecanismos de arresto celular como la disminución de la proteína p53, el proceso de dependencia en la fosforilación de las proteínas Hsp27-28 que conllevaría a estar participando en una vía de señalización apoptótica, así como también puede estar mostrando efectos debido al Zn²⁺.

El ciclo celular de los pre-osteoblastos MC3T3 pueden estar pasando por un proceso de dependencia en la fosforilación de Hsp27-28. HSP27-28 son proteínas que pertenece a una familia abundante de pequeñas proteínas de choque térmico de 28 kDa (sHSP, por sus siglas en inglés). Estas proteínas permiten que la célula sobreviva y se recupere de condiciones estresantes mediante mecanismos que aún no se

comprenden completamente. La proteína Hsp27-28 es importante porque se encuentra tanto en células humanas sanas como en células cancerosas (Ciocca *et al.*, 1993). Hsp27-28 se localiza en el citoplasma de las células no estresadas pero puede redistribuirse al núcleo en respuesta al estrés, donde puede funcionar para estabilizar el ADN y/o la membrana nuclear. Hsp27-28 participa también en la vía de señalización apoptótica por que interfiere con la activación del complejo citocromo C, inhibiendo así la activación de procaspasa-9. Se reporta que HSP27-28 puede estar involucrado en el proceso de diferenciación celular y es posible que pueda jugar un papel crucial en la interrupción del crecimiento (Sarto *et al.*, 2000).

Kato *et al.* (1993) reportaron que el estado de fosforilación endógena de HSP28 fue detectable en el fase G1 media y tardía, pero no en la fase G0. Estos estudios concluyen que el aumento en la fosforilación de HSP27-28 está estrechamente acoplado a la inhibición del crecimiento de esta línea celular de glioblastoma (cáncer de cerebro, U118 MG).

Yin *et al.* (2012) evaluaron la citotoxicidad y el ciclo celular en células de Schwann RSC96 (son las principales células de apoyo al sistema nervioso periférico y son responsables de la mielinización de los axones) como modelo expuestas a NPs de ZnO y Zn²⁺. Reportan que las NPs de ZnO mostraron efectos de citotoxicidad significativos a una concentración de 80 µg/ml en forma dependiente del tiempo y concentración. Ellos también observan que existe una alteración en la homeostasis intracelular del Ca²⁺ intracelular debido al Zn²⁺, y lo atribuyen a la generación de especies reactivas de oxígeno intracelular que posteriormente resulta en un daño oxidativo de organelos, apoptosis celular y arresto del ciclo celular en la fase G₂/M los cuales se asociaron con la descomposición jerárquica de NPs de ZnO y la posterior liberación de Zn²⁺ en el medio de cultivo.

En la línea celular sana de fibroblastos de ratón L929, las gráficas de la fase del ciclo celular medidas por el contenido de ADN en el citómetro de flujo con ambos tratamientos de NPs de ZnO con tamaños de 27 y 39 nm, mostraron que en el control de las células L929 hay una mayor población celular en la fase G₀/G₁. Por el contrario, con los tratamientos en las diferentes concentraciones a un tamaño de 27 nm de NPs de ZnO inducen un arresto en la fase S del ciclo celular en todas las concentraciones de NPs, mientras que a un tamaño de 39 nm de NPs ZnO inducen un arresto en la fase

G₂/M del ciclo celular en todas las concentraciones de NPs. Esto puede deberse en el tamaño de 39 nm de NPs ZnO estén evitando que las células de L929 entren en la fase de mitosis, un factor que pudiera ser ocasionado por la genotoxicidad, la fase G₂/M en el ciclo celular es un punto de control que consiste en una detención de la célula en esta fase justo antes de la entrada mitótica en respuesta al estrés oxidativo, alteración en la homeostasis intracelular del Ca²⁺ debido al Zn²⁺ en donde podría tratarse de una disminución de la proteína p53.

Yin *et al.* (2019) presentan un estudio en donde evalúan los efectos de varias concentraciones de NPs de ZnO en células de fibroblastos de Tenon humano (HTF, por sus siglas en inglés, estas células las aislaron de un tejido cicatricial de pacientes con glaucoma). Las células HTF son las principales células responsables del inicio y mediación de la cicatrización y cicatrización de heridas después de una cirugía. Ellos evaluaron la proliferación de las células HTF, la generación de ROS, y el arresto del ciclo celular y finalmente la apoptosis, los resultados reportados indican que las NPs de ZnO pueden inhibir eficazmente la proliferación de las células HTF, elevar el nivel de producción de ROS e inducir la detención del ciclo celular en la fase G₂/M, lo que conduce a la apoptosis de la línea celular HTF. Además, ellos reportan que puede disminuir las expresiones de TGF-1, ED-A y PICP a niveles de ARNm y proteínas y prevenir significativamente la contracción de la red de colágeno mediada por fibroblastos. Concluyen que las nanopartículas de ZnO pueden mejorar de manera eficiente la contracción de la red de colágeno en las células de HTF y puede ser un agente antifibrótico promotor en la cirugía de filtración de glaucoma, ya que se ha reportado que existe un fracaso a causa de la cirugía y suele deberse a la cicatrización postoperatoria, y la proliferación de fibroblastos, la producción de colágeno y la fibrosis subconjuntival las cuales desempeñan un papel importante en la obstrucción.

Huang *et al.* (2010) estudiaron la influencia de las nanopartículas de ZnO de 20 nm en la citotoxicidad, el estrés oxidativo, la homeostasis del calcio intracelular y la expresión génica en células epiteliales bronquiales humanas (BEAS-2B). Ellos reportaron que las NPs de ZnO provocaron una citotoxicidad dependiente de la concentración y el tiempo, asimismo al incrementarse el tiempo el estrés oxidativo se elevó provocando daños en la membrana (liberación celular de LDH). También reportaron que hubo una relación notablemente entre la concentración y la toxicidad a concentraciones de 5 a

10 ug/ml. La exposición a NPs de ZnO también aumentó los niveles de calcio intracelular Ca^{2+} (in) de una manera dependiente de la concentración y del tiempo que fue parcialmente atenuada por NAC. La nifedipina, un bloqueador de los canales de calcio, atenuó parcialmente el Ca^{2+} (in) elevado, lo que indica que parte del exceso de Ca^{2+} (in) es el resultado del influjo del exterior de la célula. Ellos aun discuten las relaciones entre el estrés oxidativo, Ca^{2+} (in) y la citotoxicidad; pero concluyen que la exposición a una concentración subletal de NPs de ZnO aumentó la expresión de cuatro genes que están involucrados en la apoptosis y las respuestas al estrés oxidativo BNIP, PRDX3, PRNP y TXRND1, al menos 2,5 veces. Por tanto, las NPs de ZnO alteran la regulación transcripcional en las células BEAS-2B.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo se dispersaron NPs de ZnO con dos protocolos de ultrasonificación diferentes con ajuste de parámetros establecidos de anteriores pruebas, de los cuales se llevó a cabo la caracterización por DLS, Uv-Vis y TEM. Se obtuvo un tamaño promedio hidrodinámico de 255 y 622 nm, un potencial zeta de -17.2 y -23.9 mV respectivamente. En la caracterización por Uv-Vis se obtuvo una banda de absorbancia de 370.23 nm para las NPs de ZnO con tamaños de 255 nm, mientras que para el tamaño de 622 nm se detectó una banda de absorbancia de 369.26 nm. En la caracterización por TEM se obtuvo un tamaño promedio para el protocolo 1 de: 27.2 nm y para el protocolo 2 de: 39.1 nm.

Los estudios de biocompatibilidad demostraron que las NPs de ZnO de un tamaño promedio de 27 nm inducen citotoxicidad dependiente de la concentración en la línea celular de cáncer B16-F10 (melanoma). Esta citotoxicidad generada está relacionada con el incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, este tamaño de NPs de ZnO induce un arresto de las células de melanoma en la fase de G₂/M del ciclo celular.

En las líneas celulares sanas L929 (fibroblastos) y MC3T3 (pre-osteoblastos), las NPs de ZnO de 27 nm, no son citotóxicas y no inducen un incremento en las especies reactivas de oxígeno, sin embargo a pesar de que no son citotóxicas promueven el arresto en la fase S y G₂/M respectivamente de las líneas celulares del ciclo celular. Estos resultados podrían inducirse por varios mecanismos de arresto celular como una disminución de la proteína p53, alteración en la homeostasis intracelular del Ca²⁺ debido al Zn²⁺ lo cual también se le atribuyen a la generación de ROS.

Se demostró que las NPs de ZnO de tamaño promedio de 39 nm inducen citotoxicidad dependiente de la concentración en la línea celular sana de pre-osteoblastos (MC3T3). Esta citotoxicidad no está relacionada con el incremento en la producción de ROS. Además, estas NPs inducen un arresto de las células de pre-osteoblastos en la fase G₂/M del ciclo celular. En las líneas celulares de cáncer de piel melanoma (B16-F10) y fibroblastos (L929) las NPs de ZnO con un tamaño de 39 nm, no inducen citotoxicidad y no existe un incremento en la producción de ROS, sin embargo a pesar de esto, sí promueven el arresto en ambas líneas celulares en la fase G₂/M del ciclo celular.

Capítulo 6. Perspectivas

La importancia de este estudio radica en el conocimiento de la bioseguridad nanotoxicológica de las NPs de ZnO en diferentes líneas celulares normales “sanas” (L929, MC3T3) y en líneas celulares provenientes de alguna patología (B16-F10). Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo sobre el efecto de las NPs de ZnO sobre células tumorales, podría favorecer el surgimiento de una nueva estrategia en terapia contra el cáncer o introducirse en otras modalidades de cáncer como lo es la terapia fotodinámica. El potencial del uso de las NPs de ZnO en biomedicina ayudarían a mitigar el crecimiento y dañar las células cancerosas. Sin embargo, aún queda un largo camino por recorrer en donde el ciclo celular es una clave para seguir dilucidando los mecanismos y respuestas celulares activadas por la exposición a las NPs de ZnO en las distintas líneas celulares.

Literatura citada

- Abdal Dayem, A., Hossain, M. K., Lee, S. B., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G.-M., Choi, H. Y., y Cho, S.-G. (2017). The role of reactive oxygen species (ros) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, **18**(1): 120.
- Akhtar, M. J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M. M., Ahmad, J., y Alrokayan, S. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International journal of nanomedicine*, **7**: 845.
- Amundson, S. A., Myers, T. G., y Fornace, A. J. (1998). Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene*, **17**(25): 3287–3299.
- Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., y Brunborg, G. (2012). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, **291**(1-3): 65–72.
- Banfalvi, G. (2017). Overview of cell synchronization. En: *Cell Cycle Synchronization*. Springer, pp. 3–27.
- Biola-Clier, M., Gaillard, J.-C., Rabilloud, T., Armengaud, J., y Carriere, M. (2020). Titanium dioxide nanoparticles alter the cellular phosphoproteome in a549 cells. *Nanomaterials*, **10**(2): 185.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., y Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, **5**(1): 9–19.
- Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., y Stark, W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental science & technology*, **40**(14): 4374–4381.
- Chen, Q., Kang, J., y Fu, C. (2018). The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal transduction and targeted therapy*, **3**(1): 1–11.
- Ciocca, D. R., Oesterreich, S., Chamness, G. C., MCGuire, W. L., y Fuqua, S. A. (1993). Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (hsp27): a review. *JNCl: Journal of the National Cancer Institute*, **85**(19): 1558–1570.
- Cormen, T. H. (2009). *Introduction to algorithms*. MIT press.
- Dickinson, B. (2002). Company. introduction to flow cytometry: A learning guide.
- Dréno, B., Alexis, A., Chuberre, B., y Marinovich, M. (2019). Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **33**: 34–46.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., y Vogelstein, B. (1993). Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**(4): 817–825.
- Eom, H.-J. y Choi, J. (2010). p38 mapk activation, dna damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in jurkat t cells. *Environmental science & technology*, **44**(21): 8337–8342.

- Fröhlich, E. y Salar-Behzadi, S. (2014). Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *International journal of molecular sciences*, **15**(3): 4795–4822.
- Fubini, B., Fenoglio, I., Tomatis, M., y Turci, F. (2011). Effect of chemical composition and state of the surface on the toxic response to high aspect ratio nanomaterials. *Nanomedicine*, **6**(5): 899–920.
- Gao, F., Ma, N., Zhou, H., Wang, Q., Zhang, H., Wang, P., Hou, H., Wen, H., y Li, L. (2016). Zinc oxide nanoparticles-induced epigenetic change and g2/m arrest are associated with apoptosis in human epidermal keratinocytes. *International journal of nanomedicine*, **11**: 3859.
- Gea, M., Bonetta, S., Iannarelli, L., Giovannozzi, A. M., Maurino, V., Bonetta, S., Hodoroba, V.-D., Armato, C., Rossi, A. M., y Schilirò, T. (2019). Shape-engineered titanium dioxide nanoparticles (tio2-nps): Cytotoxicity and genotoxicity in bronchial epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, **127**: 89–100.
- Givan, A. L. (2013). *Flow cytometry: first principles*. John Wiley & Sons.
- Golias, C., Charalabopoulos, A., y Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International journal of clinical practice*, **58**(12): 1134–1141.
- Hanley, C., Layne, J., Punnoose, A., Reddy, K. á., Coombs, I., Coombs, A., Feris, K., y Wingett, D. (2008). Preferential killing of cancer cells and activated human t cells using zno nanoparticles. *Nanotechnology*, **19**(29): 295103.
- Heim, J., Felder, E., Tahir, M. N., Kaltbeitzel, A., Heinrich, U. R., Brochhausen, C., Mailänder, V., Tremel, W., y Brieger, J. (2015). Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale*, **7**(19): 8931–8938.
- Hobson, D. y Guy, R. (2014). *Nanotoxicology*.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., y Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**(5015): 49–53.
- Huang, C.-C., Aronstam, R. S., Chen, D.-R., y Huang, Y.-W. (2010). Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to zno nanoparticles. *Toxicology in vitro*, **24**(1): 45–55.
- Innocente, S. A., Abrahamson, J. L., Cogswell, J. P., y Lee, J. M. (1999). p53 regulates a g2 checkpoint through cyclin b1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(5): 2147–2152.
- Jayat, C. y Ratinaud, M.-H. (1993). Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. *Biology of the Cell*, **78**(1-2): 15–25.
- Kang, K., Lee, S. B., Yoo, J.-H., y Nho, C. W. (2010). Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in hct116 cells. *Biotechnology letters*, **32**(8): 1045–1052.
- Kansara, K., Patel, P., Shah, D., Shukla, R. K., Singh, S., Kumar, A., y Dhawan, A. (2015). Tio2 nanoparticles induce dna double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, **56**(2): 204–217.

- Kato, K., Goto, S., Hasegawa, K., y Inaguma, Y. (1993). Coinduction of two low-molecular-weight stress proteins, α b crystallin and hsp28, by heat or arsenite stress in human glioma cells. *The Journal of Biochemistry*, **114**(5): 640–647.
- Kumar, V., Dasgupta, N., y Ranjan, S. (2018). *Nanotoxicology: toxicity evaluation, risk assessment and management*. CRC Press.
- Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G., y Hoet, P. (2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and fibre toxicology*, **6**(1): 14.
- Lee, C.-H., Lin, M.-S., Chi, C.-W., Chen, Y.-J., Wang, G.-S., Liao, K.-W., Chiu, L.-P., Wu, S.-H., Huang, D.-M., Chen, L., et al. (2020). Zn nanoparticles induced caspase-dependent apoptosis in gingival squamous cell carcinoma through mitochondrial dysfunction and p70s6k signaling pathway. *International journal of molecular sciences*, **21**(5): 1612.
- Lopez-Saez, J. (1998). de, la., torre, c., et al. *Cell proliferation and cancer, Histol Histopathol*, **13**(4): 1197–1214.
- Madhyastha, R. M. y Daima, H. K. (2018). Impact of physicochemical properties and surface chemistry of nanomaterials on toxicity. *Nanotoxicology: toxicity evaluation, risk assessment and management*, p. 35.
- Martinez, G. R., Loureiro, A. P. M., Marques, S. A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L. F., Onuki, J., Almeida, E. A., Garcia, C. C., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H., et al. (2003). Oxidative and alkylating damage in dna. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **544**(2-3): 115–127.
- Mendoza, R. P. y Brown, J. M. (2019). Engineered nanomaterials and oxidative stress: Current understanding and future challenges. *Current opinion in toxicology*, **13**: 74–80.
- Meyer, K., Rajanahalli, P., Ahamed, M., Rowe, J. J., y Hong, Y. (2011). Zn nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicology in vitro*, **25**(8): 1721–1726.
- Moos, P. J., Chung, K., Woessner, D., Honegger, M., Cutler, N. S., y Veranth, J. M. (2010). Zn particulate matter requires cell contact for toxicity in human colon cancer cells. *Chemical research in toxicology*, **23**(4): 733–739.
- Nakamura, M., Shishido, N., Nunomura, A., Smith, M. A., Perry, G., Hayashi, Y., Nakayama, K., y Hayashi, T. (2007). Three histidine residues of amyloid- β peptide control the redox activity of copper and iron. *Biochemistry*, **46**(44): 12737–12743.
- Namvar, F., Rahman, H. S., Mohamad, R., Azizi, S., Tahir, P. M., Chartrand, M. S., y Yeap, S. K. (2015). Cytotoxic effects of biosynthesized zinc oxide nanoparticles on murine cell lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**.
- Prober, D. A. y Edgar, B. A. (2001). Growth regulation by oncogenes—new insights from model organisms. *Current opinion in genetics & development*, **11**(1): 19–26.
- Pucci, B., Kasten, M., y Giordano, A. (2000). Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, **2**(4): 291–299.

- Pudukudy, M. y Yaakob, Z. (2015). Facile synthesis of quasi spherical zno nanoparticles with excellent photocatalytic activity. *Journal of Cluster Science*, **26**(4): 1187–1201.
- Qiu, T. A., Clement, P. L., y Haynes, C. L. (2018). Linking nanomaterial properties to biological outcomes: analytical chemistry challenges in nanotoxicology for the next decade. *Chemical Communications*, **54**(91): 12787–12803.
- Raja, G., Jang, Y.-K., Suh, J.-S., Kim, H.-S., Ahn, S. H., y Kim, T.-J. (2020). Microcellular environmental regulation of silver nanoparticles in cancer therapy: A critical review. *Cancers*, (3): 664.
- Sandström, B. (1995). Effects of quin2 acetoxymethyl ester on h2o2-induced dna single-strand breakage in mammalian cells: H2o2-concentration-dependent inhibition of damage and additive protective effect with the hydroxyl-radical scavenger dimethyl sulphoxide. *Biochemical Journal*, **305**(1): 181–185.
- Sarto, C., Binz, P.-A., y Mocarelli, P. (2000). Heat shock proteins in human cancer. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, **21**(6): 1218–1226.
- Saud Alarifi, D. A., Alkahtani, S., Verma, A., Ahamed, M., Ahmed, M., y Alhadlaq, H. A. (2013). Induction of oxidative stress, dna damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, **8**: 983.
- Shapiro, H. M. (2005). *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons.
- Sharma, V., Shukla, R. K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., y Dhawan, A. (2009). Dna damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology letters*, **185**(3): 211–218.
- Shrikhande, S. S., Jain, D. S., Athawale, R. B., Bajaj, A. N., Goel, P., Kamran, Z., Nikam, Y., y Gude, R. (2015). Evaluation of anti-metastatic potential of cisplatin polymeric nanocarriers on b16f10 melanoma cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **23**(4): 341–351.
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., y Kaus, N. H. M. (2016). Preferential cytotoxicity of zno nanoparticle towards cervical cancer cells induced by ros-mediated apoptosis and cell cycle arrest for cancer therapy. *Journal of Nanoparticle Research*, **18**(8): 219.
- Suh, W. H., Suslick, K. S., Stucky, G. D., y Suh, Y.-H. (2009). Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in neurobiology*, **87**(3): 133–170.
- Sutariya, V. B. y Pathak, Y. (2014). *Biointeractions of nanomaterials*. CRC Press.
- Syama, S., Reshma, S., Sreekanth, P., Varma, H., y Mohanan, P. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on cellular oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in mouse liver. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **95**(3): 495–503.
- Valdiglesias, V., Costa, C., Kiliç, G., Costa, S., Pásaro, E., Laffon, B., y Teixeira, J. P. (2013). Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environment international*, **55**: 92–100.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., y Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, **36**(3): 131–149.

- Wang, C.-C., Wang, S., Xia, Q., He, W., Yin, J.-J., Fu, P. P., y Li, J.-H. (2013). Phototoxicity of zinc oxide nanoparticles in hacat keratinocytes-generation of oxidative dna damage during uva and visible light irradiation. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, **13**(6): 3880–3888.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z.-S., y Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*, **20**(5): 595–601.
- Yin, H., Casey, P. S., McCall, M. J., y Fenech, M. (2010). Effects of surface chemistry on cytotoxicity, genotoxicity, and the generation of reactive oxygen species induced by zno nanoparticles. *Langmuir*, **26**(19): 15399–15408.
- Yin, X., Li, Q., Wei, H., Chen, N., Wu, S., Yuan, Y., Liu, B., Chen, C., Bi, H., y Guo, D. (2019). Zinc oxide nanoparticles ameliorate collagen lattice contraction in human tenon fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, **669**: 1–10.
- Yin, Y., Lin, Q., Sun, H., Chen, D., Wu, Q., Chen, X., y Li, S. (2012). Cytotoxic effects of zno hierarchical architectures on rsc96 schwann cells. *Nanoscale research letters*, **7**(1): 439.

Anexo 1

Preparación de reactivos y soluciones para cultivo celular

Buffer de Fosfatos (Solución salina) PBS 1X

Procedimiento:

1. Se pesan los reactivos en una balanza analítica y se agregan en un vaso de precipitados de 500 ml, al cual se le añadirá agua estéril, un agitador magnético y se colocará en una plancha con agitación para que se disuelvan por completo los reactivos, por último se mide el pH que esté en 7.4.

Tabla 2. Reactivos y concentraciones para la preparación de la solución salina.

Reactivo	Concentración	1 L	1.5 L
NaCl (Cloruro de Sodio)	137 mM	8 g	12 g
KCl (Cloruro de Potasio)	2.7 mM	0.2 g	0.3 g
Na₂HPO₄ (Fosfato de disodio)	10 mM	1.44 g	2.16 g
KH₂PO₄ (Fosfato de Potasio monobásico)	2 mM	0.24 g	0.36 g

Medio DMEM al 10%

Procedimiento:

1. Tomar 5ml de H₂O estéril y agregarlo al frasco de L-glutamina (G6392-1VL).
2. Agregar el reactivo de medio de cultivo (D5648-1L) y bicarbonato de sodio (2 g por cada litro de medio) y disolverlo con agua estéril.
3. Agregar la L-glutamina con una pipeta al frasco de agua estéril.
4. Añadir 10 ml de antibiótico/antimicótico por cada litro de medio.
5. Se mezclan todos los reactivos adicionados anteriormente, se agregan 10% de suero fetal bovino (SFB) v/v y se afora a 1 litro con agua estéril.
6. Se filtra todo el contenido usando un filtro de 0.22 μ m.
7. Listo para usar, almacenar hasta su uso a 4°C.

Tabla 3. Reactivos y concentraciones para la preparación del medio DMEM al 10% de 1 L.

No.	Reactivos para Medio de Cultivo de 1 L
1.	(2) Frascos estériles de 500 ml.
2.	(1) Frasco estéril de 1 L.
3.	Suero Fetal Bovino (10%)
4.	(1) Frasco de DMEM polvo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose D5648-1L).
5.	(1) Filtro
6.	Bicarbonato de Sodio (2 g).
7.	Antibiótico/Antimicótico (10 ml).
8.	L-glutamina (G6392-1VL.)

MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

Procedimiento:

1. En un frasco ámbar verter 3 ml de PBS y agregar 30 mg del reactivo MTT agitar vigorosamente.
2. Luego verter 3 ml y volver a agitar. NOTA: En teoría el MTT se disuelve rápido, pero en caso contrario resuspender con una micropipeta de 1000 μ l.

Tabla 4. Reactivos y cantidades específicas para preparar MTT.

MTT	PBS
15 mg	3 ml
30 mg	6 ml

Anexo 2

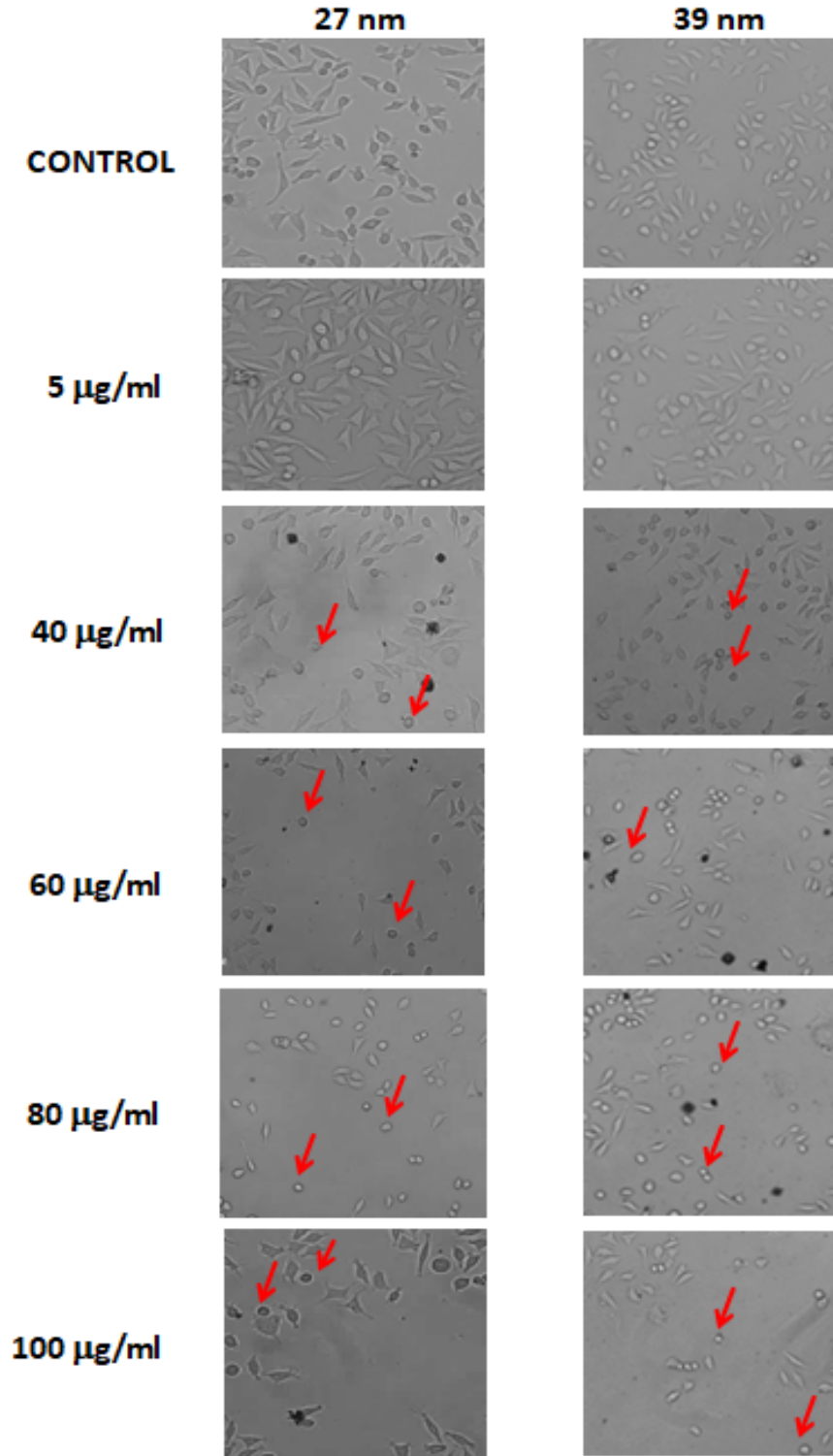


Figura 28. Fotografías de la línea celular de pre-osteoblastos (MC3T3) a diferentes concentraciones y tamaños de NPs de ZnO y su comparativa con el control sin ningún tratamiento. Las flechas color rojo muestran un cambio conformacional en las concentraciones.

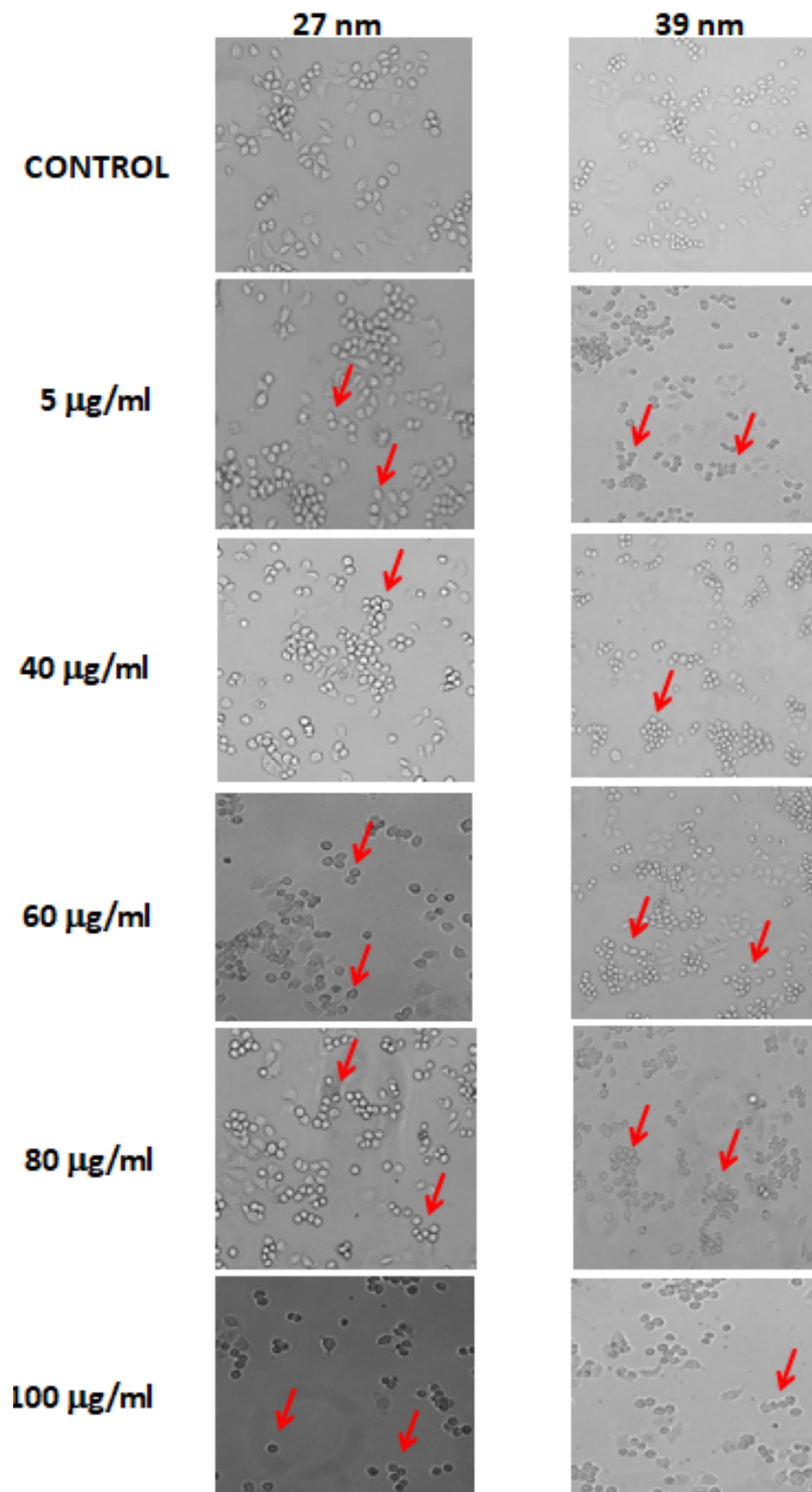


Figura 29. Fotografías de la línea celular de fibroblastos murinos (L929) expuestos durante 24 h a distintas concentraciones de NPs de ZnO de dos tamaños (27 nm y 39 nm) y la comparación con las células control sin ningún tratamiento. Las células redondas son señaladas con flechas rojas en las concentraciones lo cual indican un cambio conformacional en su estructura.

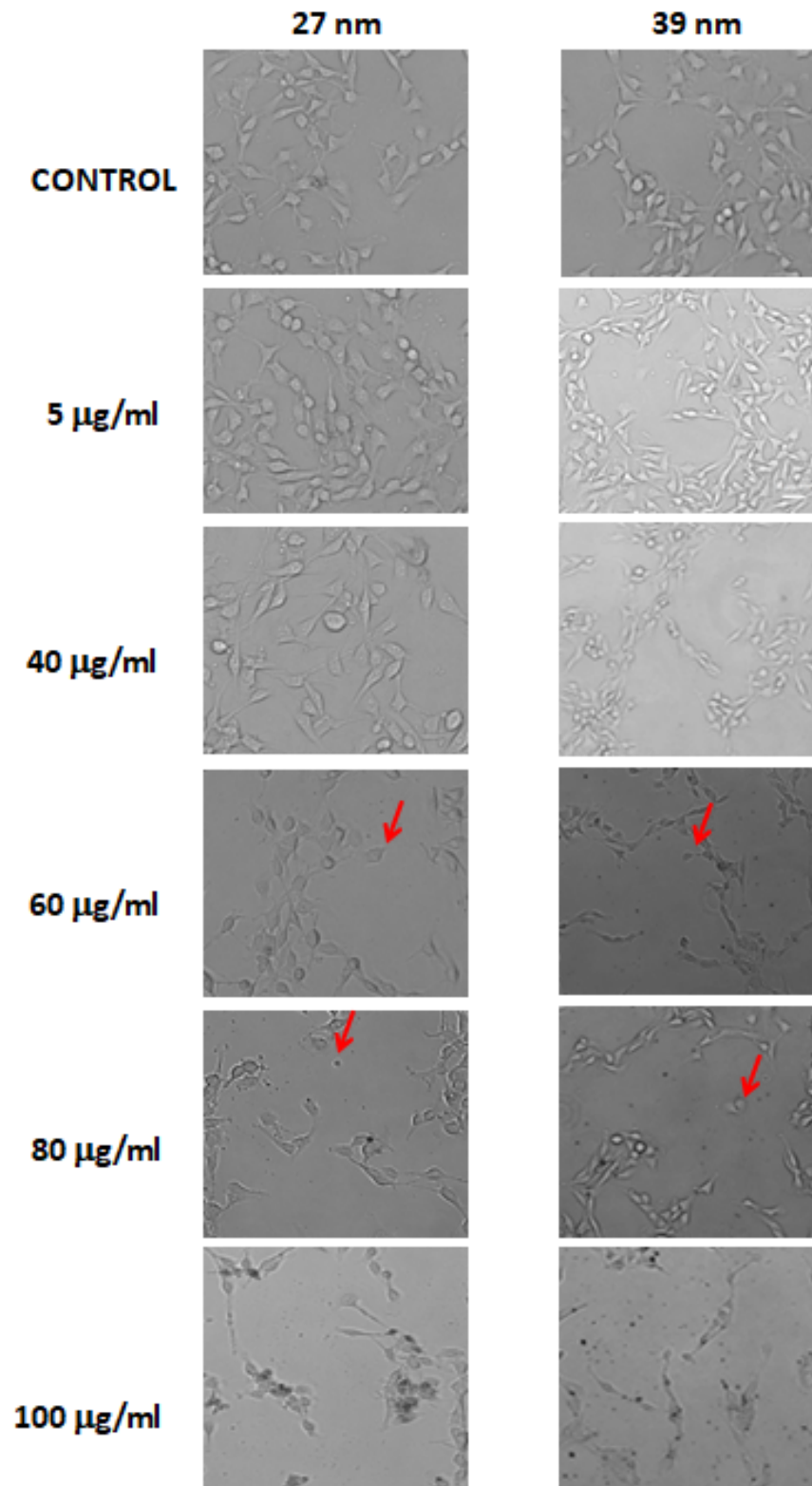


Figura 30. Fotografías de la línea celular de melanoma de ratón (B16-F10) con diferentes tratamientos y tamaños de de NPs de ZnO (27 nm y 39 nm), en comparación con el control en ambos tamaños. Las flechas color rojo señalan células redondas en donde se muestra un cambio conformacional en la estructura celular.