

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



**Efecto de la exposición aguda y subcrónica a
nanopartículas de óxidos metálicos en el sistema
antioxidante de células hepáticas**

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

Presenta:

Jesús Alberto Geraldo León

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Jesús Alberto Geraldo León

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Directora de tesis

Miembros del comité

Dr Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Ernestina Castro Longoria



Dr. José Manuel Romo Herrera

Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon

Director de Estudios de Posgrado

Jesús Alberto Geraldo León © 2021

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 tesis que presenta **Jesús Alberto Geraldo León** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Efecto de la exposición aguda y subcrónica a nanopartículas de óxidos metálicos en el sistema antioxidante de células hepáticas

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Directora de tesis

El aumento en los escenarios de exposición de las cada vez más utilizadas nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO), ha despertado el interés por estudiar su posible efecto tóxico en la salud. Diversos estudios han reportado que uno de los principales mecanismos de toxicidad de las NPsZnO es el estrés oxidativo, inducido cuando la célula presenta una producción excesiva de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) y su capacidad antioxidante no es suficiente para contrarrestarlo. En este estudio se evaluó la alteración del sistema antioxidante de hepatocitos a la exposición aguda y subcrónica de las NPsZnO en dos diferentes presentaciones: en polvo (NPsZnOp) y suspensión (NPsZnOd). Las NPsZnO fueron caracterizadas mediante dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectrofotometría UV-VIS. Se evaluó la citotoxicidad de las NPsZnO mediante el ensayo MTT, así como también la producción de ROS y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) de los hepatocitos utilizando métodos fluorimétricos y colorimétricos. Los resultados mostraron que las NPsZnOp usadas presentaron un tamaño promedio de 82 ± 22 nm y son más tóxicas para los hepatocitos que las NPsZnOd con un tamaño promedio de 47 ± 11 nm. La toxicidad superior de las NPsZnOp se asoció con su mayor capacidad para inducir la sobreproducción de ROS y para inhibir la actividad SOD y CAT de los hepatocitos, que a su vez se relacionaron con la internalización de las NPsZnOp. En exposiciones agudas ambas NPs provocaron efectos tóxicos dependientes de la producción de ROS que fueron generados por los iones Zn^{2+} liberados en el medio de cultivo. Sin embargo, se presentó un efecto hormético a largo plazo en los hepatocitos expuestos a NPsZnOd que se relacionó con la elevada actividad antioxidante de las enzimas SOD y CAT presentada a las 48 h de exposición. Estos resultados demuestran la gran influencia que tiene la actividad antioxidante en el grado de citotoxicidad provocado por las NPs y como las respuestas celulares pueden cambiar aun cuando las NPs evaluadas tengan el mismo compuesto, pero diferente tamaño y presentación.

Palabras clave: nanotoxicología, nanotoxicidad, nanopartículas de óxidos metálicos, hepatocitos, exposición aguda, exposición subcrónica, estrés oxidativo, actividad antioxidante.

Abstract of the thesis presented by Jesús Alberto Geraldo León as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanosciences.

Effect of acute and subchronic exposure to metal oxide nanoparticles on the antioxidant system of liver cells

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Thesis Director

The increment of exposure scenarios of the widely used zinc oxide nanoparticles (NPsZnO) has sparked interest in the study on their possible toxic effect on health. Several studies have reported that one of the main toxicity mechanisms of NPsZnO is the oxidative stress, induced when the cell presents an excessive production of highly reactive oxygen species (ROS), and its antioxidant capacity is not sufficient to contend with. In this study, the alteration of the hepatocyte antioxidant system upon acute and subchronic exposure to NPsZnO in two different presentations: powder (NPsZnOp) and suspension (NPsZnOd) was evaluated. The NPsZnO were characterized by dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), and UV-VIS spectrophotometry. The cytotoxicity of NPsZnO was evaluated by MTT assay, ROS production, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) enzyme activity in hepatocytes using fluorimetric and colorimetric methods were also evaluated. The results obtained herein showed that NPsZnOp have an average size of 82 ± 22 nm and they are more toxic to hepatocytes than the NPsZnOd showing 47 ± 11 nm in average size. The higher toxicity of NPsZnOp was associated with its ability to induce ROS overproduction and inhibit hepatocyte SOD and CAT enzymatic activities, which were linked to the internalization of NPsZnOp. In acute exposure scenarios, both NPs elicited toxic effects on hepatocytes by the ROS overproduction generated by the Zn^{2+} ions released in the culture medium. However, a long-term hormetic effect was presented in hepatocytes exposed to NPsZnOd related to the increased antioxidant activity of SOD and CAT enzymes presented at 48 h of exposure. These results demonstrate the significant influence of antioxidant activity on cytotoxicity triggered by NPs from the same chemical composition but different size and commercial presentation.

Keywords: nanotoxicology, nanotoxicity, metal oxide nanoparticles, hepatocytes, acute exposure, subchronic exposure, oxidative stress, antioxidant activity.

Dedicatoria

Dedicado a mi papá, a los apasionados de la ciencia y amantes de la sabiduría.

Agradecimientos

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) y al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad de cursar el posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para estudiar la maestría con el número de CVU 995168.

Al SINANOTOX (CONACYT PN-2017- 01-4710) y al proyecto CONACYT 269071 y Cátedras No. 53, así como al Departamento de Bionanotecnología CNyN-UNAM, por los fondos e infraestructura para la realización del proyecto.

A la Dra. Katrin Quester y a la Mtra. Itandehui Betanzo por la ayuda técnica. Al Dr. Diego Delgado del Laboratorio Nacional de Microscopía (LNMA-CICESE) por la adquisición de las imágenes en el confocal. A la Dra. Ernestina Castro Longoria (CICESE) y al Dr. Josué Mota Morales del CFATA-UNAM, por las micrografías del TEM.

A la Psic. Laura Rosales por la atención recibida en relación a los procesos administrativos realizados durante la maestría. A la Dra. Rufina Hernández por dar seguimiento a mi caso y ayudarme a conseguir la beca y a mis profesores por el recurso intelectual brindado.

Agradezco a los miembros de mi comité de tesis, el Dr Rafael Vázquez Duhalt y la Dra. Ernestina Castro Longoria por sus valiosas aportaciones al proyecto.

Agradezco a mi asesora la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno por su orientación profesional, el tiempo dedicado, la paciencia y su preocupación activa por mi aprendizaje. Gracias por su enorme apoyo en todos los aspectos del proyecto, por incentivar el compañerismo entre los estudiantes y por fortalecer mi sentido de compromiso y responsabilidad.

Al grupo grupo Nanotox Lab, en especial a Elizabeth y Melissa por auxiliarme en situaciones inconvenientes dentro del laboratorio y retroalimentar mis conocimientos

Quiero agradecer a Ivonne Pintor por su invaluable compañía desde el día uno. Por ser mi compañera de estudio, mi compañera de fiestas y mi compañera de vida. Por su actitud solícita y aliviar los momentos difíciles vividos durante estos años.

Agradezco a mis amigos Ivonne Julieta, Luis y Laura por hacer del posgrado algo inolvidable. Gracias por su preocupación, su disposición constante de ayudarme y hacer el posgrado más ameno.

Agradezco eternamente a mi papa, por su confianza, apoyo incondicional y por darme seguridad para afrontar los nuevos retos.

A mi amiga Mariana por ser un soporte emocional y auxiliarme en momentos de inestabilidad durante la maestría.

Gracias a mi amiga Celsa y el resto de compañeros de la maestría por todos los ratos agradables y las buenas convivencias a lo largo de estos años.

Tabla de contenido

Resumen en español	i
Resume en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Nanomateriales.....	2
1.1.2 Nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) en productos de la vida diaria.....	4
1.1.3 Toxicidad de las nanopartículas	6
1.1.4 Toxicidad de las nanopartículas de óxido de zinc	7
1.1.6 Toxicidad de nanopartículas de óxidos metálicos en células hepáticas	12
1.1.7 Alteraciones del sistema antioxidante por las nanopartículas de ZnO.....	13
1.2 Hipótesis.....	15
1.3 Objetivos	16
1.3.1 Objetivo general	16
1.3.2 Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2. Metodología.....	17
2.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO)	17
2.1.1 Plasmón de resonancia superficial de NPsZnO por espectrofotometría de luz UV-vis.....	17
2.1.2 Tamaño, distribución y potencial Z de las NPsZnO por dispersión de luz dinámica.	17
2.1.3 Morfología y tamaño de las NPsZnO por microscopía electrónica de transmisión	18
2.1.4 Disolución de las NPsZnO en medio de cultivo.	18
2.2 Cultivo celular.....	18
2.2.1 Cultivo de hepatocitos AML-12.....	18
2.2.2 Criopreservación de células	19
2.2.3 Descongelamiento de células criopreservadas	19
2.2.4 Subcultivo celular	20

2.2.5	Conteo celular por exclusión de azul tripano.....	20
2.3.1	Ensayo colorimétrico de viabilidad celular por reducción del MTT	22
2.4	Producción de ROS	23
2.4.1	Cuantificación de las ROS mediante espectrofluorometría.	23
2.4.2	Visualización de las ROS intracelulares por microscopía confocal.....	24
2.5	Internalización de NPsZnO	24
2.6	Actividad de enzimas antioxidantes.....	25
2.6.1	Obtención de proteína total mediante lisis celular.....	25
2.6.3	Evaluación de la actividad catalasa (CAT).	28
Capítulo 3.	Resultados	30
3.1	Caracterización fisicoquímica de las NPsZnO.....	30
3.1.1	Plasmón de resonancia superficial.....	30
3.1.2	Distribución del radio hidrodinámico y el potencial Zeta de las NPsZnO.	30
3.1.3	Morfología y distribución de la frecuencia de los tamaños de las NPsZnO	32
3.1.4	Disolución de las NPsZnO	34
3.2	Viabilidad celular por ensayo MTT	35
3.2.1	Viabilidad celular de hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.....	36
3.2.2	Comparación de la viabilidad celular de hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.....	38
3.3	Producción de ROS	40
3.3.1	Producción de ROS en los hepatocitos expuestos a las NPsZnO en polvo y en suspensión.	41
3.3.2	Comparación de la producción de ROS en hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.....	43
3.3.3	Detección de ROS en hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión mediante microscopía confocal.....	44
3.4	Internalización de NPsZnO en hepatocitos	47
3.4.1	Cambios en la complejidad celular de hepatocitos AML-12 expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.....	47
3.5	Actividad antioxidante	48
3.5.1	Actividad SOD de hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.....	48
3.5.2	Actividad enzimática de CAT en hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión...	49
Capítulo 4.	Discusión	51
4.1	Propiedades fisicoquímicas de las NPsZnO	51

4.2 Efecto de la incubación durante 24 horas con NPsZnO en polvo y suspensión en hepatocitos.....	52
4.3 Efecto de la incubación durante 48 horas con NPsZnO en polvo y suspensión en hapatocitos.....	54
4.4 Efecto de la incubación durante 72 horas con NPsZnO en polvo y suspensión en hapatocitos.....	56
4.5 Comparación entre los efectos de las NPsZnO en polvo y suspensión.....	57
Capítulo 5. Conclusiones	60
Literatura citada	61
Anexos	68

Lista de figuras

Figura 1. Efectos dañinos de los ROS generados por nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos.	10
Figura 2. Reacciones principales del sistema de defensa antioxidante celular	11
Figura 3. Absorbancia de las NPsZnO en suspensión y en polvo	30
Figura 4. Distribución del tamaño de las NPsZnO en solución acuosa con base en su intensidad y número de partículas.....	31
Figura 5. Potencial Zeta de las NPsZnO en suspensión y en polvo	32
Figura 6. Micrografías obtenidas por TEM y distribución de la frecuencia de los tamaños de las NPsZnO.	34
Figura 7. Disolución de las NPsZnO en medio DMEM.....	35
Figura 8. Viabilidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo y en suspensión.....	37
Figura 9. Comparación de la viabilidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo y en suspensión.....	39
Figura 10. Comparación de la viabilidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos durante 24 h a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo y en suspensión	40
Figura 11. Producción de ROS en los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo y en suspensión	42
Figura 12. Comparación de la producción de ROS de los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo y en suspensión.....	43
Figura 13. Visualización de la producción de ROS en los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo durante 24 h	45
Figura 14. Visualización de la producción de ROS en los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en suspensión durante 24 h.	46
Figura 15. Complejidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos durante 24 h a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo y en suspensión.....	48
Figura 16. Actividad de la enzima SOD en los hepatocitos AML-12 expuestos durante 24h, 48h y 72h a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo y en suspensión	49

Figura 17. Actividad de la enzima CAT en los hepatocitos AML-12 expuestos durante 24h, 48h y 72h a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo y en suspensión	50
Figura 18. Curva estándar de la enzima catalasa.....	71
Figura 19. Fotografías de la línea celular AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo durante 24 h.....	72
Figura 20. Fotografías de la línea celular AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO suspendidas durante 24 h.....	72

Lista de tablas

Tabla 1. Aumento en la actividad de antioxidantes en diferentes líneas celulares expuestas a NPsZnO ...	14
Tabla 2. Disminución en la actividad de antioxidantes en diferentes líneas celulares expuestas a NPsZnO.	15
Tabla 3. Cantidades utilizadas de cada reactivo para la medición de la actividad SOD	27
Tabla 4. Cantidades utilizadas de cada reactivo para la medición de la actividad CAT.....	28
Tabla 5. Cantidades utilizadas de cada reactivo para la curva estándar de H ₂ O ₂	71

Capítulo 1. Introducción

La nanotecnología es un campo que se desarrolla rápidamente, siendo cada vez mayores las demandas en innovaciones y en el mercado, de productos que utilicen o implementen nanomateriales (NM) en la industria, ciencia, farmacia, medicina, electrónica y comunicación, entre otros (Kumar et al., 2018). Este aumento en la fabricación y demanda de NM, hacen que exista una mayor interacción con el ambiente y los humanos. Al incrementar la cantidad de escenarios de exposición humana a los NM, como por ejemplo los puestos de trabajo, en los lugares de su síntesis y desecho, y en los usuarios del producto final, se vuelve importante garantizar la bioseguridad de los NM y si ese fuera el caso, conocer los posibles efectos adversos que éstos pueden tener en la salud. Esto ha llamado la atención de la comunidad científica, agencias regulatorias, representantes de la industria y el público, que concuerdan en que se requieren más esfuerzos para garantizar el desarrollo responsable y seguro de las nuevas nanotecnologías. La preocupación en ese sentido ha permitido crear una disciplina científica llamada nanotoxicología, que fue nombrada como tal por Ken Donaldson en 2004 por primera vez (Donaldson et al., 2004) y seleccionada como una nueva disciplina por Gunter Oberdörster un año después (Oberdörster et al., 2005). La nanotoxicología es un subcampo de la toxicología que estudia los efectos tóxicos potenciales de las estructuras a nanoescalas o sustancias que tienen partículas con al menos una dimensión de 1-100 nm de longitud, con el fin de saber si pueden representar una amenaza ambiental o social y en qué medida.

Los NM tienen características físicas y químicas muy distintivas, como magnéticas, ópticas, térmicas, mecánicas, eléctricas que las hacen útiles en muchas aplicaciones, pero también tienen otras propiedades que pueden representar inconvenientes por su potencial para causar daño y afectar de manera adversa a los humanos y al medio ambiente. Empezando con lo evidente, que es su pequeño tamaño, esto le permite penetrar tejidos, barreras biológicas y membranas celulares (Singh & Maurya, 2019). Pero la propiedad particular de los materiales a escala nanométrica es su alta relación superficie-volumen, la cual lo puede hacer altamente reactivo y más tóxico que los materiales respectivos convencionales de mayor tamaño. Debido a esto, es importante comprender las relaciones existentes entre las características de cada NM con sus efectos inducidos en un medio de importancia ecológica o médica, para así conocer la naturaleza de sus posibles interacciones e impactos ambientales y biológicos, en un mundo con mayor auge nanotecnológico.

Uno de los enfoques de estudio particularmente importante, es la comprensión de las interacciones de los NM con los sistemas biológicos. Los humanos pueden estar expuestos a los NM generalmente por tres

rutas de entrada; inhalación, contacto con la piel e ingestión. La ruta de exposición junto a los parámetros fisicoquímicos del NM define los tipos de interacciones moleculares que se presenten y éstos a su vez, determinan la toxicidad de los NM. Aquellos NM que ingresan a la célula pueden interactuar con diferentes organelos, como las mitocondrias y provocar uno de los mecanismos de nanotoxicidad frecuentemente observado, que es la generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species). Las células pueden eliminar estas sustancias mediante diferentes compuestos y enzimas, moléculas que forman parte del sistema antioxidante celular. Pero cuando los niveles de ROS superan la capacidad antioxidante de la célula, surge una condición llamada estrés oxidativo (Fu et al., 2014). En este estado pueden presentarse daño oxidativo en las diferentes biomoléculas y/o estructuras celulares que repercuten en su función normal. El estrés oxidativo se genera ya sea por una alta producción de ROS, inhibición en el sistema antioxidante, o una combinación de ambos. Hay muchos estudios que reportan la generación de ROS por las NPs, incluso se han sugerido algunos mecanismos, pero no se ha prestado atención sobre si las NPs son capaces de alterar el sistema antioxidante de la célula.

En este trabajo, se tiene el interés de estudiar si las NPs comerciales a base de óxido metálico (ZnO) con diferentes presentaciones, y determinar si son capaces de provocar un cambio en el sistema antioxidante. El modelo conveniente para el estudio son los hepatocitos debido a que estas células están en constante exposición a las ROS y debido a su función desintoxicante, poseen un sistema antioxidante bastante activo y especializado. Con este estudio se pretende brindar elementos que ayuden a explicar los mecanismos moleculares de la toxicidad celular inducida por NPs.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Nanomateriales

Se dice que la nanotecnología es la tecnología del siglo XXI porque actualmente existe un auge nanotecnológico en el mundo. Ha recibido mucha atención y se ha expandido su desarrollo debido a su versatilidad para aplicarse en diferentes sectores de la sociedad. La nanotecnología según la Fundación Nacional de Ciencia y la Iniciativa Nanotecnológica Nacional, es la habilidad de entender, controlar y manipular la materia a nivel atómico y molecular (Goddard III et al., 2007). Los productos que son generados por esta tecnología son llamados nanomateriales y son cada vez más utilizados.

Para entender que es un nanomaterial se parte del hecho de que el sistema internacional de unidades considera nano como un prefijo que indica 10^{-9} partes de una unidad. En este caso la unidad es el tamaño medido en metros, por tanto, aquí el término nano se refiere a la mil millonésima parte de un metro. Los nanomateriales son definidos como materiales que miden al menos en una de sus dimensiones entre 1 y 100 nanómetros (nm). El límite de 100 nm es aceptado por la ISO, ASTM, Royal Society-SCENIHR, ETC group y Swiss Re (Klaessig et al., 2011). De acuerdo con la Recomendación de la Comisión Europea, un "nanomaterial" se define como *un material natural, accidental o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado, y en el que el 50 % o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más de las dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre un nanómetro y 100 nanómetros. En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones de medio ambiente, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50 % puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1 % y el 50 %* (Commission, 2011).

Existen diferentes tipos de nanomateriales según la cantidad de dimensiones que presentan la escala nanométrica. Se clasifican en (Kolahalam et al., 2019) :

Nanomateriales cero dimensionales: Las tres dimensiones del nanomaterial están en la escala nanométrica. A esta clasificación pertenecen las nanopartículas.

Nanomateriales uni dimensionales: solo una dimensión se encuentra en el rango nanométrico y las otras dos dimensiones se encuentran fuera de ese rango. Incluye nanotubos, nanohilos y nanovarillas.

Nanomateriales bi dimensionales: solo dos dimensiones están en la escala nanométrica y el restante no. Aquí se incluyen a los nanocapas, nanopelículas y nanorevestimientos.

Nanomateriales tridimensionales: ninguna dimensión está en el rango de la escala nanométrica. Se pueden encontrar aquí nanocompositos, "core shell"s y multi nanocapas.

De forma general y resumida, los nanomateriales se pueden dividir en nanoplacas, nanofibras y nanopartículas, presentando 1, 2 y 3 dimensiones en la escala nanométrica, respectivamente.

Los nanomateriales no solo son producidos por nanotecnología. Existen en la tierra de forma natural. Pueden originarse a partir del polvo volatilizado, el rocío del océano, el hollín de los incendios forestales o las erupciones volcánicas (Trotta & Mele, 2019).

El gran interés por los nanomateriales parte de la observación de que los materiales cambian sus propiedades básicas cuando alcanzan el nivel de la nanoescala. Por lo que sus propiedades se afectan incluyendo la mejora de la dureza, la resistencia, disminución del punto de fusión, el aumento de la capacidad calorífica, disminución de la temperatura de Debye, el aumento de la conductividad de los nanometales, la disminución de la temperatura de Curie, la aparición de propiedades ópticas no lineales, la mejora de la actividad catalítica, el intercambio de solubilidad, e incluso la variación de color en función del tamaño de partícula (Trotta & Mele, 2019). Estas propiedades tan diversas las vuelven útiles en múltiples aplicaciones en diferentes campos. Los productos que suelen implementar nanomateriales, son productos cosméticos y de cuidado personal, pinturas y revestimientos, productos para el hogar, catalizadores y lubricantes, productos deportivos, textiles, productos médicos y de cuidado de la salud, ingredientes alimentarios y nutricionales, envasado de alimentos, agroquímicos, medicamentos veterinarios, materiales de construcción, armas y explosivos (Trotta & Mele, 2019)

1.1.2 Nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) en productos de la vida diaria

Hoy en día, las propiedades únicas de los nanomateriales han motivado a los investigadores a desarrollar muchas técnicas más simples y económicas para producir nanoestructuras de materiales tecnológicamente importantes. Dentro de los nanomateriales que más atención han demandado en la industria y en la ciencia para posibles aplicaciones futuras, son las nanopartículas de óxidos metálicos. Entre ellos, los de óxido de zinc se considera uno de los más y mejores explotados. El óxido de zinc es un compuesto inorgánico con la fórmula molecular ZnO. Se presenta como un polvo blanco, térmicamente estable, casi insoluble en agua y se puede encontrar en la corteza terrestre como mineral de zincita (Sabir et al., 2014). Aunque la mayor parte del ZnO utilizada con fines comerciales se produce de forma sintética.

Las nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) es un semiconductor de banda ancha que debido al menor tamaño de la partícula y al aumento de la reactividad de la superficie presenta propiedades especiales como transparencia, estabilidad fotoquímica, luminiscencia fuerte a temperatura ambiente y alta movilidad de electrones. Además tiene una biocompatibilidad potencial sobre muchos otros óxidos metálicos y presenta actividad antimicrobiana (Reviews et al., 2011). Entre las propiedades importantes para las aplicaciones científicas e industriales destacan su ancho de banda libre y la gran energía de enlace excitónica.

Sus propiedades físicas y químicas las hacen especiales para aplicaciones comerciales en diferentes campos de la industria como la electrónica y magnética en sensores, ventanas protectoras del calor, celdas solares, equipos fotovoltaicos y electroluminiscentes, láseres, dispositivos eléctricos, registrador de imágenes, motores de turbina de gas lubricante de alta temperatura, electrodos transparentes en pantallas de cristal líquido que ahorran energía, diodos emisores de luz y transistores de película delgada. También se aplica en gran medida en el campo de la cosmética, biomédica y farmacéutica en medicamentos, pastas dentales, absorbentes de radiaciones UV, componentes de cremas, ungüentos, polvos, micronutrientes para humanos, plantas y animales, tratamiento del cáncer, administración de fármacos y en usos terapéuticos (Ali et al., 2018). En la industria textil también se utiliza principalmente como absorbente de radiaciones UV en tejidos de algodón y lana, autolimpiante y repelente al agua (Milani & McLaughlin, 2011). El polvo de óxido de zinc se utiliza ampliamente como aditivo en muchos productos y materiales que incluyen cerámica, caucho, cemento, lubricantes, vidrio, pinturas, adhesivos, ungüentos, plásticos, pigmentos, selladores, alimentos, ferritas, baterías y retardadores de fuego (Azeez et al., 2020).

Todas estas aplicaciones hacen que el mercado de las NPsZnO esté en constante crecimiento en todo el mundo. La principal demanda en la investigación son los filtros UVA/B y en los mercados son los cosméticos y protectores solares. Es importante señalar que la administración de medicamentos y alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) ya aprobó el uso de estas NPs en los filtros solares y las consideró de naturaleza altamente estable y no tóxica (Zhang et al., 2013). Debido a esto, los mercados asociados a los protectores solares y cosméticos se han posicionado como uno de los principales productos en donde se utilizan NPsZnO.

El mercado de las NPsZnO está liderado por varias empresas multinacionales de materiales y productos químicos que suministran NPsZnO en toneladas a los propietarios de marcas de protectores solares y cosméticos. También venden sus nanopartículas a los sectores académico, automotriz y de nanomedicina, que son mercados secundarios para NPsZnO. Además se emplean a menudo en las industrias de pinturas, revestimientos y textiles (Nanotech Magazine, 2014) o sectores que incluyen la electrónica (varistores, condensadores, electrofotografía, etc.), sensores y catálisis. El uso de NPsZnO en diodos emisores de luz (LED) y celdas solares se encuentra en una etapa preliminar. Los principales fabricantes que generan productos basados en nanopartículas de ZnO son Hikusui Tech Co.Ltd., Elementis, Showa Denko, Sakai Chemical Industry Co.Ltd, Nanophase / BASF, Umicore, etc (Nanotech Magazine, 2014).

1.1.3 Toxicidad de las nanopartículas

La amplia gama de aplicaciones que otorgan las propiedades únicas de los nanomateriales hace que se abran muchas oportunidades de desarrollo tanto en el ambiente científico como industrial. Esto conlleva a que se incremente la producción de nanomateriales sintéticos. Su producción, uso posterior y eliminación conduce a su disposición en el suelo, aire y sistemas acuáticos. De esta forma, hay una mayor exposición de los nanomateriales con el medio ambiente, animales y los seres humanos. Esto resulta en un problema ya que al ser materiales relativamente “nuevos” y muy diversos en cuanto a su composición, forma y propiedades, no se conoce aún como pueden impactar en los diferentes ambientes. Por si fuera poco, se sabe que cuando un material se aproxima en una de sus dimensiones a la escala nanométrica, su energía superficial aumenta exponencialmente, lo cual hace que también incremente su reactividad. Así, el uso indiscriminado de nanomateriales podría plantear una variedad de peligros, principalmente para el ambiente y la salud. Por lo tanto, es crucial la comprensión científica de sus posibles impactos para tener herramientas que ayuden a los investigadores a elegir materiales que sean ambientalmente inertes y priorizar la investigación para mitigar los riesgos asociados con el medio ambiente y la salud humana. Además, puede promover una correcta legislación para su manejo y diferentes acciones que ayuden a prevenir o combatir sus efectos. Bajo este panorama se ha impulsado la creación de un subcampo de la toxicología llamado nanotoxicología, la cual es una rama moderadamente nueva encargada de estudiar la toxicidad inducida por los nanomateriales (Ganguly et al., 2018). Incluye la comprensión básica de sus efectos fisicoquímicos, sus rutas de exposición y mecanismos de absorción con el fin de evaluar la toxicidad en los seres humanos y el medio ambiente.

Para que un nanomaterial con propiedades tóxicas pueda llevar a cabo sus efectos dañinos, debe ingresar primero al organismo. Se han reportado 3 vías principales para que esto suceda: inhalación, ingestión y contacto con la piel. Algunos logran atravesar el tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y la piel debido principalmente a su tamaño y sus propiedades químicas. Los nanomateriales tienen diferentes propiedades que se han reportado que tienen relación con su toxicidad. Entre los más importantes se encuentran su tamaño, forma y carga superficial.

El tamaño nanométrico de un material puede incrementar su reactividad superficial y promover que sea capaz de dañar biomoléculas al penetrar las diferentes barreras biológicas e ingresar a las células. Al entrar en contacto con células o moléculas propias de un organismo, la forma del nanomaterial puede definir el grado y tipo de interacción que se lleve a cabo, como por ejemplo un efecto tóxico.

La forma que posee un nanomaterial controla la superficie que entra en contacto con las demás sustancias y a partir de ahí pueden surgir distintas respuestas. La carga del nanomaterial puede definir el tipo de interacción con los sistemas biológicos. Al ingresar al torrente sanguíneo, un nanomaterial es capaz de atraer sustancias de carga opuesta, que normalmente son proteínas, formando lo que se conoce como “corona de proteínas”, la cual hace que cambie sus propiedades superficiales originales y por tanto el tipo de interacción con otras moléculas o células. En el caso de las células, poseen una membrana plasmática con carga negativa, por lo que los nanomateriales con carga positiva son atraídos electrostáticamente y pueden ser capaces de penetrarla, y una vez dentro unirse al ADN o proteínas cargadas negativamente afectando su función o dañándolas.

Los efectos negativos que se reportan normalmente para indicar si una NP en determinadas condiciones, es tóxica o no, son la citotoxicidad, genotoxicidad e inflamación. La genotoxicidad es la capacidad de una sustancia de provocar daño al material genético, mientras que la citotoxicidad es la propiedad de una sustancia, célula o proceso que da como resultado final el daño o muerte a las células. Identificar los mecanismos por los cuales algunos NM inducen estos efectos tóxicos, es uno de los mayores retos de la nanotoxicología.

1.1.4 Toxicidad de las nanopartículas de óxido de zinc

Las nanopartículas de óxidos metálicos son uno de los nanomateriales que más se utilizan en la actualidad y de los que mayor proyección tienen para implementarse en diversas aplicaciones, aunque también es uno de los que más han presentado efectos tóxicos en diferentes líneas celulares. La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (USFDA, por sus siglas en inglés) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), consideran que las NPsZnO son una sustancia segura. Sin embargo, muchos estudios demuestran que estas nanopartículas tienen efectos adversos en diferentes tipos de células. Se ha demostrado que las NPsZnO tienen un efecto citotóxico en células Hep-G2 después de que han sido expuestas durante 24 y 48 h a diferentes concentraciones de estas nanopartículas (Osman et al., 2010). Este efecto citotóxico fue demostrado en células de pulmón derivadas de la pleura MSTO-211H y células de fibroblastos 3T3 de roedores en diferentes concentraciones de NPsZnO después de 3 días de exposición (Brunner et al., 2006). Por otro lado, se reportó que la línea celular de neuroblastoma de ratón expuesta a NPsZnO, presentó una morfología anormal, encogimiento celular, disminución de la función mitocondrial y aumento significativo de la enzima lactado deshidrogenasa (LDH)

después de 24–48 h de exposición (Jeng & Swanson, 2006). Bajas concentraciones de NPsZnO, inducen efectos genotóxicos mediados por la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo (Osman et al., 2010). Estos estudios revelan que las NPsZnO presentan toxicidad en diferentes líneas celulares.

La causa de estos efectos citotóxicos puede estar relacionados con la capacidad de las NPsZnO de liberar iones Zn^{2+} en solución acuosa. Los Zn^{2+} puede penetrar la membrana celular y una vez dentro de la célula provocar la desnaturalización de las proteínas y la pérdida de la proliferación celular. Además, el Zn^{2+} también puede desacoplar el sistema de transporte de electrones, provocando un trastorno respiratorio celular. La liberación de Zn^{2+} puede ser afectada por las características de la nanopartícula de ZnO, como puede ser su morfología, concentración, tamaño, porosidad y por la química de los medios como pH, luz UV, tiempos de exposición y presencia de diferentes componentes (Singh, 2019). Otro de los factores por los cuales las NPsZnO pueden ser tóxicas es su banda prohibida. Ésta es la energía mínima que se necesita para que un electrón situado en la banda de valencia se excite hasta la banda de conducción (Travizano et al., 2002). Esta energía puede ser proporcionada por los rayos UV y cuando esto sucede los e^- movilizados a la banda de conducción dejan “agujeros” cargados positivamente (H^+). Los e^- y H^+ migran a la superficie de la NP y una vez ahí pueden ser capaces de reaccionar con los iones de oxígeno e hidroxilo, respectivamente. Esto conduce a la formación de ROS como radicales superóxido e hidroxilo (Mishra et al., 2017). Además el potencial de reducción de los huecos generados en la banda de valencia es termodinámicamente adecuado como para oxidar cualquier molécula orgánica como las proteínas (Candal et al., 2001) y así dañar el funcionamiento normal de la célula. Al mismo tiempo, el potencial redox del electrón promovido a la banda de conducción es también termodinámicamente adecuado para reducir oxígeno u otros oxidantes moderados para inducir la generación adicional de ROS.

Se ha descrito que la producción de ROS inducida por la exposición celular a las NPsZnO, incrementa de manera dependiente de la concentración, y que las ROS mitocondriales son responsables de la citotoxicidad de las NPsZnO en células de cáncer de hígado (HepG2) lo que ocasiona una disfunción mitocondrial (Sharma et al., 2009). Parece ser también que una mayor concentración de NPsZnO conduce a una mayor liberación de iones Zn^{2+} , lo que aumenta la producción de ROS. Es la generación de estas moléculas oxidativas uno de los mecanismos de nanotoxicidad frecuentemente observado.

1.1.5 Estrés oxidativo como principal mecanismo de nanotoxicidad

Las ROS constituyen un conjunto de especies de oxígeno molecular altamente reactivas, que también son denominadas radicales libres. Entre ellos se encuentran el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas se generan de forma intrínseca o extrínseca dentro de la célula, siendo bioproductos naturales del metabolismo oxidativo celular, donde la mayoría de ellos son producidos a través de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, es decir, como producto de la respiración celular.

Las ROS, desempeñan papeles fisiológicos importantes en la modulación de la supervivencia, muerte, diferenciación y señalización celular, así como en la producción de factores que regulan la inflamación (Sharifi et al., 2012). Sin embargo, las ROS pueden ser nocivas para los organismos cuando son producidas de forma anormal y excesiva y la capacidad antioxidante celular no es suficiente para contrarrestarlo. En estas condiciones, la célula presenta lo que se denomina como estrés oxidativo, que básicamente es un desbalance entre la producción de ROS y la capacidad de las células para reducirlos.

El estrés oxidativo afecta negativamente el mantenimiento y regulación de las funciones fisiológicas importantes. Algunos de estos daños en la función celular se muestran en la Figura 1 que incluyen la oxidación de proteínas, daños en el ADN (genotoxicidad), peroxidación lipídica e inflamación (Zhao & Nalwa, 2007). Además, el estrés oxidativo está relacionado con enfermedades degenerativas como esclerosis lateral amiotrófica, artritis, enfermedad cardiovascular, inflamación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes y cáncer (Tan et al., 2018). Es importante resaltar que los daños en las células y en la salud mencionados anteriormente no dependen solo de la capacidad oxidativa de los ROS, sino que es desencadenado por un desbalance intracelular entre los niveles de ROS y la actividad antioxidante, así que la toxicidad relacionada a la producción de ROS debe percibirse desde un punto de vista de desequilibrio redox.

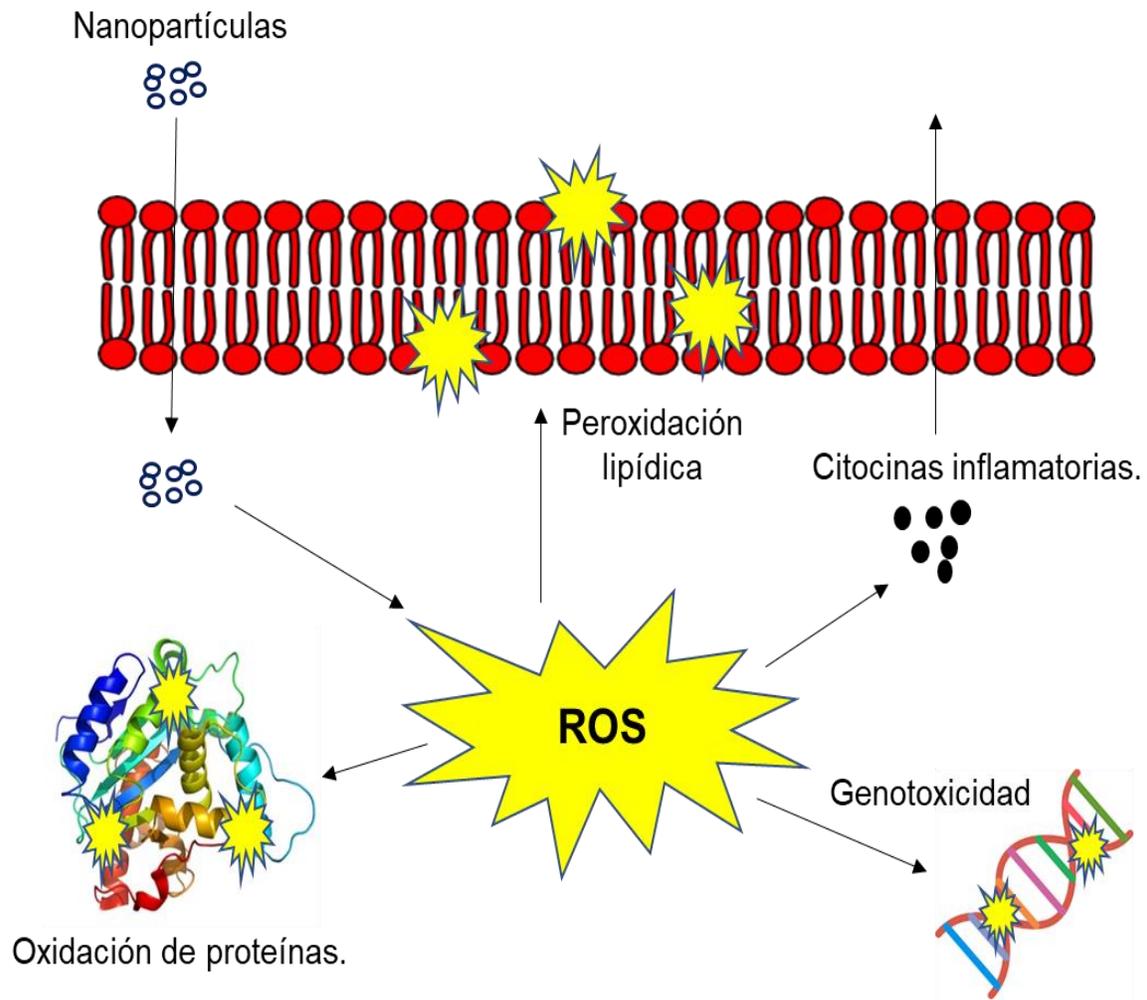


Figura 1. Efectos dañinos de los ROS generados por nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos.

Todos estos efectos adversos relacionados a la sobreproducción de las ROS, se debe a que éstas son moléculas reactivas con casi todos los tipos de biomoléculas, pueden oxidar componentes estructurales y otros componentes vitales. Para minimizar los riesgos que conlleva el estrés oxidativo a los componentes celulares, los organismos han desarrollado una gran variedad de sistemas antioxidantes complejos comprendido por mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos que se coordinan cooperativamente (figura 2).

Los antioxidantes son esencialmente agentes reductores; participan en reacciones de óxido-reducción (redox) al donar electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres (Monteiro-Riviere & Tran, 2007). De esta manera el sistema de defensa antioxidante logra disminuir la reactividad de moléculas altamente

inestables, volviéndolas inocuas para que así haya un equilibrio entre la producción y eliminación de las ROS.

Entre los antioxidantes celulares destacan las que presentan actividades enzimáticas como el superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR); además de otros mecanismos no enzimáticos como el ácido ascórbico (vitamina C), glutatión (GSH), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos fenólicos. La SOD transforma el anión superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual puede ser catalizado a un producto inocuo como el agua, por la CAT o GPx, éste último utiliza al GSH como donador de electrones, que una vez donado puede reaccionar con otro GSH sin un electrón para formar disulfuro de glutatión (GSSG). El GSSG puede ser reducido después por GR para formar de nuevo GSH. La protección que estas moléculas antioxidantes conceden al organismo para contrarrestar los daños oxidativos, permite que las células funcionen normalmente y previene su destrucción prematura por mal funcionamiento.

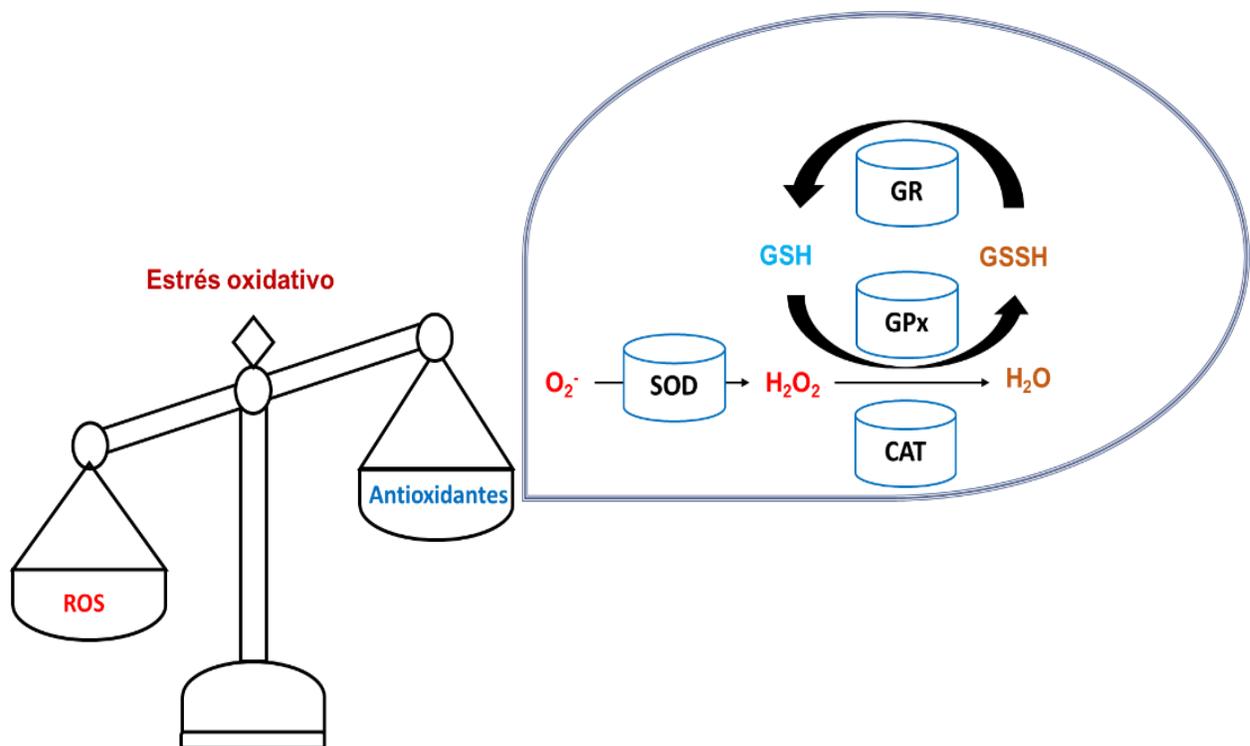


Figura 2. Reacciones principales del sistema de defensa antioxidante celular para reducir y eliminar los radicales libres y especies de oxígeno altamente reactivas.

Con este contexto es posible suponer que las NPs que inducen estrés oxidativo, además de producir un aumento en la cantidad basal de ROS, también podrían alterar la actividad del sistema antioxidante de la

célula. Es importante señalar que el desbalance entre la generación de ROS y la capacidad antioxidante puede originarse de forma distinta entre las diferentes NPs y líneas celulares expuestas a dichas NPs. Cada línea celular presenta un estado metabólico específico, que involucra un patrón característico en su actividad antioxidante, en tanto que cada NP tiene propiedades específicas que pueden inducir una respuesta determinada en cada línea celular.

1.1.6 Toxicidad de nanopartículas de óxidos metálicos en células hepáticas

El hígado es uno de los órganos más importantes por sus capacidades de desintoxicación, almacenamiento de glucógeno y síntesis de proteínas secretadas. Además, actúa como barrera biológica al aislar y eliminar diversos compuestos exógenos a través de la fagocitosis (Yao et al., 2019). Debido a la función desintoxicante, este órgano es uno de los más afectados por la sobreproducción de ROS (Sánchez-Valle et al., 2012) debido a que metaboliza varios compuestos que producen radicales libres (Rojas Lemus et al., 2017). Para realizar esto, los hepatocitos contienen altos niveles de enzimas antioxidantes con una gran actividad para metabolizar agentes tóxicos. Los xenobióticos prácticamente se producen de forma constante a lo largo de toda la vida (Suárez Cunza, 1995), así que, si estos mecanismos protectores son agotados, ocurrirá un desbalance. De esta manera, el sistema antioxidante del hígado debe ser muy especializado y cuidadosamente regulado para mantener el equilibrio redox.

En experimentos *in vivo*, las NPsZnO han demostrado ser capaces de acumularse en el hígado (Umrani & Paknikar, 2014). Esto sugiere que logran traspasar la pared intestinal y entrar al torrente sanguíneo para así distribuirse en este órgano. Además, se ha reportado la acumulación preferencial de las NPs de óxidos metálicos (NPs-OM) en el hígado en cantidades mucho más altas en comparación con otros órganos (Almeida et al., 2011). Una vez allí, se pueden eliminar por la secreción biliar hacia el intestino delgado (Ganguly et al., 2018); por lo tanto, el sistema biliar también es expuesto a el efecto de estas NPs.

Sin embargo, las nanopartículas de óxidos metálicos (NPsOM) acumuladas en el hígado causan estrés oxidativo alterando el contenido y la actividad de las enzimas antioxidantes. Existen reportes que demuestran que diferentes nanopartículas metálicas pueden alterar la actividad de las enzimas antioxidantes. Por ejemplo, en células de hígado de rata expuestas por 14 días a NPsOM, se observó que la actividad de las enzimas CAT y GPx incrementó, mientras que la GST disminuyó al ser incubadas con NPsCuO. Sin embargo, las NPs de TiO₂ indujeron un incremento en la GST. Esto indica que cada

nanopartícula es capaz de inducir cambios diferenciales en la actividad de las distintas enzimas antioxidantes. En este mismo estudio se demostró que todas las NPs utilizadas se acumularon en el hígado, incluso a las dosis más bajas. También se observó que las enzimas antioxidantes del hígado de las ratas fueron afectadas por todas las NPs (Canli et al., 2019).

Para el caso de las NPsZnO, se ha reportado que la actividad de GR, GPx y SOD incrementa de manera dependiente de la dosis (Syama et al., 2013). En células de cáncer de hígado se ha observado que las enzimas GSH, CAT, SOD, GPx y GR disminuyen su actividad. (Akhtar et al., 2012). En otro trabajo se evaluó el efecto de la exposición subaguda de nanopartículas de TiO₂, ZnO y Al₂O₃ en hígado y cerebro de ratón, encontrando que todas las NPs inducen una disminución significativa de la actividad de SOD, GPx y CAT. Sin embargo, la mayor disminución fue provocada por las NPsZnO, sugiriendo que son más tóxicas que las NPs de TiO₂ y Al₂O₃. La actividad de la enzima GST permaneció inalterada en todos los grupos, excepto aquellos que fueron expuestos a las NPsZnO, los cuales tuvieron una disminución significativa en esta actividad enzimática (Shrivastava et al., 2014). De esta manera, las NPs de óxidos metálicos pueden inducir el estrés oxidativo mediante la alteración en el sistema antioxidante.

1.1.7 Alteraciones del sistema antioxidante por las nanopartículas de ZnO

La exposición de las células a las NPsZnO además de inducir estrés oxidativo, también puede aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes. Se ha reportado un incremento de la actividad de GSH, GR, GPx y CAT y de su expresión de mRNA incluyendo a la enzima SOD en adipocitos (Muthuraman et al., 2014). En células epidérmicas de piel humana se ha detectado el aumento en la actividad de las enzimas SOD y GPx (Lee et al., 2012.), y en fibroblastos el incremento en la actividad de las enzimas GR, GPx y SOD (Syama et al., 2013). En la tabla 1 se presenta un resumen sobre el incremento en la actividad de algunas enzimas antioxidantes en diferentes líneas celulares expuestas a NPsZnO de diferentes tamaños. Estos resultados indican que al incrementar la cantidad de ROS, la célula debe aumentar por consiguiente, la actividad de la defensa antioxidante para contrarrestar el daño oxidativo y mantener el equilibrio redox. En estos estudios la capacidad del sistema antioxidante no fue suficiente para revertir el estrés oxidativo y sus efectos, alcanzando sólo a aminorarlos.

Tabla 1 Aumento en la actividad de antioxidantes en diferentes líneas celulares expuestas a NPsZnO

Tipo de célula	Tamaño de NP	Actividad de antioxidantes					Referencias
		GSH	GPx	GR	SOD	CAT	
Adipocitos (3T3-L1)	20-50 nm	Aumenta	Aumenta	Aumenta	Aumenta	Aumenta	Muthuraman et al., 2014
Epidermis (HaCaT)	20 nm	-	Aumenta	-	Aumenta	-	Lee et al.,2012.
Fibroblastos (L929)	40 nm	-	Aumenta	Aumenta	Aumenta	-	Syama et al.,2013

Por otro lado, se ha reportado que la exposición de diferentes células a las NPsZnO puede disminuir la actividad de algunas enzimas antioxidantes. En células de carcinoma hepatocelular humano HepG2, adenocarcinoma de pulmón humano A549, y epitelial bronquial humano BEAS-2B) se presentó una disminución en la actividad de GSH, CAT, SOD, GPx y GR al ser expuestas a NPsZnO de 20 nm(Akhtar et al., 2012). Por otro lado, las enzimas GSH, CAT y SOD disminuyeron su actividad catalítica en células epidérmicas expuestas a NPs de ZnO 30 nm de tamaño (Sharma et al.,2009). Además, se ha encontrado que en los hepatocitos se induce la disminución en la actividad de SOD, CAT, GPx y GST al ser expuestos a NPs de ZnO 80-100 nm (Shrivastava et al., 2014). En la tabla 2 se muestran los antioxidantes que disminuyen su actividad en las diferentes células al ser expuestas a NPs de ZnO. Estas enzimas y moléculas reductoras forman parte del sistema antioxidante que combate el daño oxidativo, así que una disminución en su actividad puede provocar un desequilibrio redox importante que puede desencadenar daños oxidativos en las estructuras celulares.

En estos estudios en donde las células son expuestas a NPsZnO, la respuesta del sistema antioxidante celular es inhibida significativamente. Por lo que las NPsZnO no solo son capaces de incrementar la producción de ROS, sino también de bloquear las defensas antioxidantes y de esta manera inducir efectos adversos.

Tabla 2. Disminución en la actividad de antioxidantes en diferentes líneas celulares expuestas a NPsZnO.

Tipo de célula	Tamaño de NP	Actividad de antioxidantes						Referencias
		GSH	GPx	GR	SOD	CAT	GST	
Cáncer de hígado (HepG2), pulmón (A549), y epitelio bronquial (BEAS-2B)	20 nm	Disminuye	Disminuye	Disminuye	Disminuye	Disminuye	-	Akhtar et al., 2012
Epidermis (A431)	30 nm	Disminuye		-	Disminuye	Disminuye		Sharma et al., 2009
Hepatocitos	80-100 nm	-	Disminuye		Disminuye	Disminuye	Disminuye	Shrivastava et al., 2014

Los antioxidantes que se evaluaron tanto en los estudios de la tabla 1 como en los de la tabla 2, presentaron un aumento y disminución en su actividad. Esto indica que las NPsZnO son capaces de inducir una respuesta diferencial en el sistema antioxidante dependiendo del tipo de célula estudiada, además de las propiedades fisicoquímicas de las NPs. Por lo tanto para determinar si una NP ocasiona efectos dañinos provocados por el estrés oxidativo, es necesario evaluar a detalle las condiciones en la que determinadas enzimas del sistema antioxidante de la célula disminuyen su actividad. Esto permitirá correlacionar la inhibición de la actividad catalítica y el bloqueo de la defensa antioxidante como un mecanismo de toxicidad asociado a las propiedades fisicoquímicas de las NPsZnO y sus diferentes concentraciones en células de hígado.

1.2 Hipótesis

La exposición subcrónica de las células hepáticas a NPsZnO, disminuye la viabilidad celular, aumenta la producción de ROS y altera la actividad de las enzimas CAT y SOD de una manera dependiente del tiempo de exposición.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Estudiar la alteración del sistema antioxidante de las células de hepatocitos expuestos a diferentes concentraciones subcrónicas de nanopartículas de ZnO.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el tamaño, potencial zeta y el plasmón de resonancia superficial de las NPsZnO.
2. Evaluar el efecto citotóxico de la exposición subcrónica de células hepáticas a diferentes concentraciones de NPsZnO.
3. Cuantificar la producción de especies de oxígeno altamente reactivas en células de hígado expuestas subcrónicamente a diferentes concentraciones de NPsZnO
4. Determinar la internalización de las NPsZnO en células hepáticas expuestas sub-crónicamente a diferentes concentraciones de NPs.
5. Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa en hepatocitos expuestos a concentraciones subcrónicas a NPsZnO.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO)

En este trabajo se utilizaron dos diferentes presentaciones de NPsZnO (Número de catálogo 721077-100G), que fueron obtenidas de la compañía Sigma-Aldrich. La presentación de una de ellas estaba en suspensión (NPsZnOd) con 20% en peso en agua y sin ningún material estabilizador. El fabricante reporta un tamaño promedio ≤ 40 nm. Para trabajar con estas NPs, se tomaron 5 mL del envase de NPsZnO y se colocaron en un frasco ámbar, se agitó mediante vortex por 6 segundos, para mezclar las NPs, las cuales fueron posteriormente diluidas en agua milliQ a una concentración de 1 mg/mL (stock). Esta solución stock fue ultrasonificada en hielo a 30 W y una amplitud del 30% por 10 minutos de forma intermitente, 10 segundos encendido con 10 segundos apagado en un ultrasonificador modelo YM-1000Y. La segunda presentación de NPsZnO (Número de catálogo 544906-10G) estaban en polvo (NPsZnOp) y sin un recubrimiento estabilizador. El fabricante reporta un tamaño promedio < 100 nm. Se preparó un stock de 0.5 mg/mL en agua milliQ y se ultrasonificaron utilizando los mismos parámetros que en el caso de las NPsZnOd. La preparación y ultrasonificación de las NPs se realizaba cada que se llevaba a cabo un experimento.

2.1.1 Plasmón de resonancia superficial de NPsZnO por espectrofotometría de luz UV-vis.

Se mezclaron 100 μ L del stock ultrasonificado en 1 mL de agua milliQ y se midió la absorbancia de la muestra desde 200 nm hasta 600 nm en el espectrofotómetro MULTISKAN GO (Thermo Scientific ,USA). Como blanco se utilizó 1 mL de agua milliQ , los resultados se graficaron como la absorbancia de NPsZnO en relación a la longitud de onda.

2.1.2 Tamaño, distribución y potencial Z de las NPsZnO por dispersión de luz dinámica.

La dilución utilizada en el espectrofotómetro se midió por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) en el equipo Zetasizer (Nano-ZS DTS 1060, Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom) para así determinar la distribución del tamaño hidrodinámico de las NPs y su potencial Z.

2.1.3 Morfología y tamaño de las NPsZnO por microscopía electrónica de transmisión

Se colocaron 10 μ L de la solución stock de NPsZnO en rejillas de cobre recubiertas de formvar/carbón (malla 75, TedPella inc.). Se dejó reposar a temperatura ambiente aproximadamente 1 hora y posteriormente se analizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés "Transmission Electron Microscopy), en un microscopio marca Hitachi modelo H-7500 a 100 kV.

El tamaño de las NPs fue medido con la ayuda del programa ImageJ y posteriormente, mediante el programa GraphPad Prism se tomaron los datos de los tamaños de 100 partículas individuales y se graficó un histograma de distribución de frecuencia de los tamaños.

2.1.4 Disolución de las NPsZnO en medio de cultivo.

Para conocer si las NPsZnO liberan iones zinc al medio, se utilizó el reactivo naranja de xilenol como indicador, el cual reacciona con iones metálicos como el Zn^{2+} y forma un compuesto de color amarillo-verdoso con un máximo de absorción a 570 nm (Díaz & Alvarez, 2004; Benamor et al., 2000)

Se preparó una solución con 6, 8, 10, 12, 14 y 16 μ g/mL de NPsZnO con medio DMEM sin rojo fenol . Se agregó 40 μ M de naranja de xilenol y después se agregaron 100 μ L de la solución a cada pozo de una placa de 96 pocillos, y se leyó la absorbancia a 570 nm. El experimento se realizó por triplicado y se utilizó como blanco el medio sin NPs, restando el promedio de su absorbancia a los demás tratamientos.

2.2 Cultivo celular

2.2.1 Cultivo de hepatocitos AML-12

La línea celular de hepatocitos murinos AML-12 (ATCC, CRL-2254) se obtuvo del American Type Culture Collection ATCC. AML-12 es una línea celular epitelial adherente que fue extraída de hepatocitos de ratón. Los hepatocitos fueron cultivados en medio HAM-F12 (Número de catálogo 12500062, Thermo Scientific) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino, reactivo insulina-transferrina-selenito de sodio (Sigma, I1884) el cual contiene 10 μ g/mL de insulina, 5.5 μ g/mL de transferrina y 5 ng/mL de selenio y 40 ng/mL dexametasona.

Las células se descongelaron a temperatura ambiente, se resuspendieron y se trasladaron a un tubo de microcentrífuga donde se centrifugaron a 1250 rpm por 5 min a 25°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo, luego se centrifugó nuevamente con los mismos parámetros. Una vez más se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo, el cual fue colocado en una caja de Petri para cultivo celular. Las células fueron incubadas hasta alcanzar una confluencia del 80% a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂.

2.2.2 Criopreservación de células

Para tener suficientes células para trabajar, diferentes pases de éstas se conservaron en medio de criopreservación que contenían 50 % (v/v) de Suero Fetal Bovino, 40 % (v/v) de DMEM suplementado y 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). Para esto se procedió de la misma forma que el subcultivo celular, solo que después del conteo celular, ahora se realizaron los cálculos para obtener el volumen de solución celular que tengan al menos 1 millón de células. Se alicuotó con medio HAM-F12 hasta 1 mL y se centrifugó a 1250 rpm, 25°C por 5 minutos. El pellet se resuspendió con 1 mL de medio de criopreservación y el contenido se vació en un criotubo, el cual se rotuló con el nombre de la línea celular, número de pase y fecha, los criotubos fueron almacenados a -80°C.

2.2.3 Descongelamiento de células criopreservadas.

Las células criopreservadas se descongelaron a temperatura ambiente, se resuspendieron y pasaron a un tubo de microcentrífuga de 1 mL que se centrifugó a 1250 rpm, 25°C por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio HAM-F12 para después volver a centrifugar, decantar y resuspender en las mismas condiciones. Se agregaron 5 µL de células resuspendidas en una placa Petri con 5 mL de medio HAM-F12 y se rotuló con el nombre de la línea celular, número de pase, fecha y nombre del usuario. Finalmente, las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Se le dio seguimiento a su crecimiento y morfología mediante su visualización en un microscopio óptico invertido.

2.2.4 Subcultivo celular

Al observar con el microscopio una confluencia del 80% de las células creciendo en la caja de Petri, se procedió a separarlas de la superficie, a lo que también se le conoce como subcultivo celular. Para esto se retiró el medio de la placa y se lavó con 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Luego se agregó 1 mL de tripsina y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 5 minutos. Transcurrido el tiempo con la finalidad de favorecer que las células dejen de adherirse a la caja Petri, se agitó la tripsina contenida con ligeros golpes a la caja de cultivo y se redistribuyó suavemente sobre la superficie con una pipeta. Esto para ayudar a separar mecánicamente las células. El volumen conteniendo las células separadas de la caja de cultivo, fue trasladado a un tubo eppendorf de 1 mL y se centrifugó a 1250 rpm, 25°C y 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo HAM-F12. Se volvió a centrifugar y resuspender en las mismas condiciones anteriores. Con base en el conteo celular, se determinó la cantidad de células para cultivar en otra caja de cultivo. Se agregó el volumen de la suspensión celular a una nueva caja Petri que contenía 5 mL de medio de cultivo y se rotuló con nombre de la línea celular, número de pase, fecha y nombre del usuario. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y se revisaron diariamente hasta que alcanzaran una confluencia del 70 al 80%.

2.2.5 Conteo celular por exclusión de azul tripano.

El conteo celular por exclusión de azul tripano, es una técnica colorimétrica utilizada para la cuantificación de las células viables, ya que el azul tripano es un colorante que no penetra en la membrana plasmática íntegra de las células, por tanto, las células viables cuya membrana plasmática se encuentra íntegra, excluyen el colorante y no se tiñen, por lo que en el microscopio se observan redondas y translúcidas. Mientras que las células muertas o cuya membrana plasmática está dañada, captan el azul tripano y se tiñen de azul. La tinción de las células se realizó agregando 10 µL de la solución celular a 40 µL de azul tripano, se mezcló y se tomaron 10 µL de la mezcla y se colocó sobre una cámara de Neubauer con un cubreobjetos encima.

Se contaron las células viables presentes en los cuatro cuadrantes inferior y superior, para determinar la concentración de células viables se consideró el promedio del conteo de los cuadrante, el factor del volumen de la cámara de Neubauer (10000) y el factor de dilución (5), según la siguiente ecuación:

$$\text{Número de células / mL} = \text{Promedio del conteo de células} \times \text{factor de dilución} \times 10000 \quad (1)$$

2.3 Viabilidad celular

2.3.1 Ensayo colorimétrico de viabilidad celular por reducción del MTT

Se evaluó la viabilidad celular por medio del ensayo MTT, que es un método colorimétrico enzimático, en el que ocurre la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) debido a la acción de enzimas mitocondriales presentes en células vivas, generando formazán, que son cristales púrpuras. Después de disolver los cristales con isopropanol, se obtiene un color que es medido por espectrofotometría, siendo la intensidad del color púrpura, proporcional al porcentaje de células viables.

Para el ensayo de viabilidad celular, se cultivaron 5,000 hepatocitos AML-12 en 100 μL de medio de cultivo HAM-F12 en cada pozo de una caja de cultivo celular de 96-pozos, las células se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente, se descartó el medio de cultivo y se agregó 100 μL de medio HAM-F12 que contenían 6, 8, 10, 12, 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPsZnO. Para la evaluación del efecto de los iones en la viabilidad celular se incubó la solución de las diferentes concentraciones de NPs con 1 mM de EDTA por 1 hora, posteriormente se agregó esta mezcla a los hepatocitos. Las células fueron incubadas en presencia de las NPs durante 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Como control positivo de viabilidad celular, se cultivaron las células en medio HAM-F12 sin NPs, y como control negativo de viabilidad celular se incubaron las células en presencia de 0.5% de Triton X-100 como inductor de muerte celular. Al término del tiempo de cada tratamiento se descartó el medio de cultivo y las placas de cultivo se lavaron tres veces con 200 μL de solución PBS 1X. Posteriormente, se adicionaron 10 μL del reactivo MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich M-8910) y 90 μL del medio HAM-F12, la placa se incubó en oscuridad durante 4 horas a 37°C con 5 % de CO_2 . Posteriormente se adicionó 100 μL de isopropanol y por pipeteo se disolvieron los cristales de formazán y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se midió la absorbancia de la placa con un espectrofotómetro a 570 nm, tomándose como referencia (blanco) una longitud de onda de 690 nm. El valor registrado a longitud de onda de 690 nm fue restado de los valores de la absorbancia a 570 nm de cada medición. El promedio de las lecturas de las células del control negativo de viabilidad celular tratadas con Triton X-100, (células muertas), se restaron a todos demás valores. Se tomó el valor promedio de la absorbancia de las células sin NPs como el 100% de viabilidad para calcular el porcentaje de viabilidad de todas las muestras, como se observa en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{[\text{Abs muestra } (\lambda 570 - \lambda 690) - \text{Promedio Abs Ctrl neg.} (\lambda 570 - \lambda 690)] * 100}{\text{promedio Abs Ctrl posit.} (\lambda 570 - \lambda 690)} \quad (2)$$

Por último, se graficaron los resultados, situando en las abscisas la concentración de las NPs en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en las ordenadas la viabilidad celular en porcentaje.

2.4 Producción de ROS

2.4.1 Cuantificación de las ROS mediante espectrofluorometría.

La generación de ROS es imprescindible para muchos procesos celulares de los hepatocitos sanos, pero son producidos a un ritmo controlado. En condiciones de estrés oxidativo, la producción de ROS aumenta notablemente, lo que resulta en daño oxidativo a las biomoléculas. La producción de ROS intracelulares por los hepatocitos expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO durante 24, 48, y 72 horas, se midió usando el compuesto diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFDA) (Cat. 35845, Sigma Aldrich), el cual es una sonda fluorogénica que se usa para detectar la presencia de ROS, ya que es permeable a la membrana plasmática de las células. Dentro de la célula, la moléculas de DCFDA no fluorescente son oxidadas por las ROS intracelulares generando el 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF), un producto altamente fluorescente que puede analizarse por espectrofluorometría; siendo la intensidad de fluorescencia un valor proporcional a los niveles intracelulares de ROS.

Para medir la producción de ROS en los hepatocitos, se cultivaron 3000 células AML-12 en 100 μL de medio de cultivo HAM-F12 en cada pozo de una caja de cultivo celular de 96-pozos y luego se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente, se descartó el medio de cultivo y se agregó 100 μL de medio HAM-F12 que contenían 6,8, 10, 12, 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPsZnO. Las células fueron incubadas en presencia de las NPs durante 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Al finalizar los tiempos de incubación, se descartó el medio con NPs de todos los pozos, y la placa se lavó 3 veces con solución PBS 1X. Después se agregó a cada pozo 100 μL de solución de medio HAM-F12 (sin SFB) con DCFDA 20 μM y se incubó durante 1 hora a 37 °C y 5 % de CO_2 . Finalizado el tiempo de incubación se removió el medio y se lavó 3 veces con PBS 1X y se agregaron 100 μL de medio de cultivo. Por último, se realizó la lectura de la fluorescencia con una longitud de onda de excitación/emisión de 485/530 nm utilizando un espectrofluorómetro Cary Eclipse (Agilent), tomando como control la fluorescencia de las ROS producidas de forma endógena, es decir en células no expuestas a NPs.

2.4.2 Visualización de las ROS intracelulares por microscopía confocal.

Para tener evidencia cualitativa de la sobreproducción de ROS de los hepatocitos expuestos a NPsZnO, se implementó la técnica de microscopía confocal. Se utilizó como indicador de ROS el reactivo DCF, cuya fluorescencia se contrastó con la del núcleo celular de los hepatocitos teñidos con el reactivo NucRED (Número de catálogo R37106, Thermo Scientific). Este reactivo es capaz de penetrar las células y producir fluorescencia cuando se une al ADN, siendo de esta manera un buen indicador del núcleo celular. Se visualizaron las células expuestas a NPsZnO durante 24h, ya que en este tiempo las NPsZnO de ambas presentaciones lograron inducir altos niveles de ROS.

Después de que las células fueron expuestas durante 24 horas a las NPsZnO, se desechó el medio de los pozos y la placa con células se lavó 3 veces con PBS 1X. Luego se agregó a cada pozo 100 μ L de solución de medio HAM-F12 (sin SFB) con DCFDA 20 μ M y se incubó durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Finalizado el tiempo se agregaron 2 gotas/mL de el reactivo NucRED para teñir el núcleo celular y se incubó durante 30 minutos a 37°C y 5 % de CO₂. Las células se lavaron con PBS 1X y se agregó medio HAM-F12. Se observaron las células con un microscopio confocal invertido Olympus Fluoview FV1000, usando el objetivo 20X. Las ROS y el núcleo celular se observaron con los filtros FITC (excitación/ emisión: 488/515 nm) y CY5 (excitación/emisión: 651/670 nm), respectivamente. Las micrografías se capturaron utilizando el software FV-10 ASW y se analizaron con el software Visor FV-10ASW versión 3.1 de Olympus.

2.5 Internalización de NPsZnO

2.5.1 Determinación de la complejidad celular mediante citometría de flujo.

Para determinar si las NPs logran internalizarse en los hepatocitos, se utilizó el citómetro de flujo, el cual permite examinar células y partículas en un flujo laminar. Al ser excitados mediante un láser, la desviación de la luz se puede clasificar en 2 señales diferentes: dispersión frontal (por sus siglas en inglés Forward Scatter light, FSC) y dispersión lateral (por sus siglas en inglés Side Scatter light, SSC) de la luz. El parámetro de medición FSC indica el tamaño de la célula, mientras que el SSC brinda información sobre la complejidad interna de la célula; este último parámetro es el que se utiliza para determinar las variaciones en la complejidad celular y por lo tanto en los procesos de internalización de NPs.

Las células que fueron expuestas por 24 horas a las ZnONPs, se separaron por tripsinización, agregando 100 μ L de tripsina a cada pozo e incubando por 5 minutos a 37°C y 5 % de CO₂. Las células que se separaron de la caja de cultivo fueron colocadas en un tubo que se centrifugó a 1250 rpm por 5 minutos. Se retiró el medio sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS 1X. Éste último paso de lavado, se realizó 1 vez más y las células obtenidas se analizaron por citometría de flujo con un citómetro Attune NxT (Thermofisher). Para la potencia en la luz de dispersión lateral (SSC) y frontal (FSC) se utilizó un parámetro de 500 voltios, colectando para cada muestra 10 mil eventos con sus respectivos triplicados. Se tomó como control del tamaño y complejidad basal los parámetros de FSC y SCC obtenidos de las células que no fueron expuestas a NPs.

2.6 Actividad de enzimas antioxidantes

2.6.1 Obtención de proteína total mediante lisis celular

Para determinar la actividad de las enzimas SOD y CAT en los hepatocitos que fueron expuestos a los diferentes tratamientos de ZnONPs, es indispensable aislar la proteína total de las células, este procedimiento se realiza mediante la lisis de las células y después se cuantifica la cantidad de proteína total obtenida. Para ello, se cultivaron 3000 hepatocitos AML-12 en 100 μ L de medio de cultivo HAM-F12 en cada pozo de una caja de cultivo celular de 96-pozos y luego se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se descartó el medio de cultivo y se agregó 100 μ L de medio HAM-F12 que contenían 6,8, 10, 12, 14 y 16 μ g/mL de NPsZnO. Las células fueron incubadas en presencia de las NPs durante 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Al finalizar los tiempos de incubación, se descartó el medio con NPs de todos los pozos y la placa se lavó 3 veces con solución PBS 1X. Después se agregaron 100 μ L de tripsina a cada pozo y se incubó por 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Las células desprendidas de la caja de cultivo celular, fueron colocadas en un tubo que se centrifugó a 1250 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS frío y se centrifugó a 1250 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 930 μ L de agua milliQ y se agregó 70 μ L de RIPA buffer. Se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos. Se agitó por vortex durante 3 minutos, la muestra se sonicó en baño por 5 minutos, y posteriormente se congeló a -70°C por 10 minutos. Luego la muestra se atemperó manualmente y se agitó por vortex por 3 minutos. Este ciclo de congelamiento/descongelamiento/agitación, se realizó 4 veces. Finalmente, los tubos que contenían los lisados celulares

se centrifugaron a 12500 rpm por 15 minutos a 4°C y se vació el sobrenadante a un tubo limpio. El homogenizado se utilizó para realizar los ensayos de actividad SOD y CAT.

2.6.2 Evaluación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa fue determinada mediante un kit llamado SOD assay kit (19160, Sigma-Aldrich). Es un ensayo indirecto basado en la sal de tetrazolio WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno] que produce un compuesto de formazan por la reducción con el anión superóxido, el cual tiene una coloración púrpura. La tasa de reducción del WST-1 es inhibida por la actividad de la SOD, la cual puede ser medida por la disminución en la absorbancia del formazán del WST-1 que absorbe a 440 nm y por lo tanto, es proporcional a la cantidad de anión superóxido.

Tabla 3. Cantidades utilizadas de cada reactivo para la medición de la actividad SOD

Reactivos	Tratamiento de NPsZnO	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Homogenizado	100 µL	-	100 µL	
H2O ultrapuro	-	100 µL		100 µL
Solución WST	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL
Solución enzimática	20 µL	20 µL	-	-
Dilución buffer	-	-	20 µL	20 µL

Para realizar el ensayo de actividad de SOD, se agregaron los siguientes reactivos en una placa de 96 pocillos de acuerdo a la tabla:

Las muestras se incubaron a 37°C por 20 minutos y luego se leyó su absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro. Para calcular la actividad SOD (% de inhibición) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad SOD (\% de inhibición)} = \frac{(\text{Ablanco1} - \text{Ablanco2}) - (\text{Amuestra} - \text{Ablanco2})}{(\text{Ablanco1} - \text{Ablanco3})} \times 100 \quad (3)$$

La actividad de la SOD se reportó como el porcentaje de inhibición por la fracción de células viables de la muestra correspondiente. Se utilizó como referencia de los niveles basales de la actividad de SOD a los valores obtenidos de las células que no fueron expuestas a NPsZnO.

2.6.3 Evaluación de la actividad catalasa (CAT).

La actividad de la enzima catalasa fue medida utilizando el kit llamado Catalase assay kit (CAT100, Sigma-Aldrich), a través de un ensayo colorimétrico basado en la disminución del peróxido de hidrógeno después de la acción de la catalasa. Se utiliza un fenol sustituido (ácido 3-5 dicloro-2-2, hidroxibencenosulfónico), que se acopla oxidativamente a la 4-aminoantipirina en presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasa de rábano (por sus siglas en inglés horseradish peroxidase, HRP) para dar un tinte rojo de quinoneimina (N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinona-monoimina) que absorbe en los 520 nm, a las reacciones se le agregaron los reactivos según la siguiente tabla:

Tabla 4. Cantidades utilizadas de cada reactivo para la medición de la actividad CAT.

	Volúmen de muestra	Buffer ensayo 1X	Solución H ₂ O ₂ (200 mM)
Tratamiento	75 µL	0	25 µL
Blanco	0	75 µL	25 µL

Las reacciones se mezclaron por inversión y se incubaron por 3 minutos, luego se añadió 900 µL de solución de paro de la reacción y se mezcló por inversión. Se tomaron 10 µL y se pasaron a un tubo nuevo, al cual se le agregó 990 µL del reactivo color y se mezcló por inversión. La reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color y se midió la absorbancia a 520 nm. Se calculó la concentración de H₂O₂ correspondiente a una curva estándar presentada en los anexos. La concentración de H₂O₂ del blanco fue restado a todas las muestras. Se calculó la actividad catalasa mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad catalasa } (\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}) = \frac{\mu\text{molesH}_2\text{O}_2 \times d \times 100}{V \times t} \quad (4)$$

Donde:

d = dilución de la muestra original para la reacción catalasa.

t = duración de la reacción catalasa.

V = volumen de la muestra para la reacción catalasa

100 = dilución de la alícuota de la reacción catalasa en la reacción colorimétrica (10 µL de 1 ml)

Una unidad es definida como una unidad de catalasa que descompondrá 1.0 micromol de peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua por minuto a un pH 7.0 en una temperatura de 25°C y a una concentración de sustrato (H_2O_2) de 50 mM. La actividad se reportó como la actividad catalasa por fracción de células viables de la muestra correspondiente. Se utilizó como referencia de la concentración basal de la catalasa las muestras de células no expuestas a NPsZnO.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización fisicoquímica de las NPsZnO

3.1.1 Plasmón de resonancia superficial

Una característica especial de las nanopartículas metálicas es la existencia de la resonancia de plasmón de superficie localizada. Para verificar que las NPs utilizadas fueran efectivamente hechas a base de ZnO tal como lo reporta el fabricante, se midió su absorbancia en un rango de longitud de onda de 200-600 nm. La absorción máxima de las NPsZnO en suspensión y en polvo se presentó a los 360 nm (Figura 3).

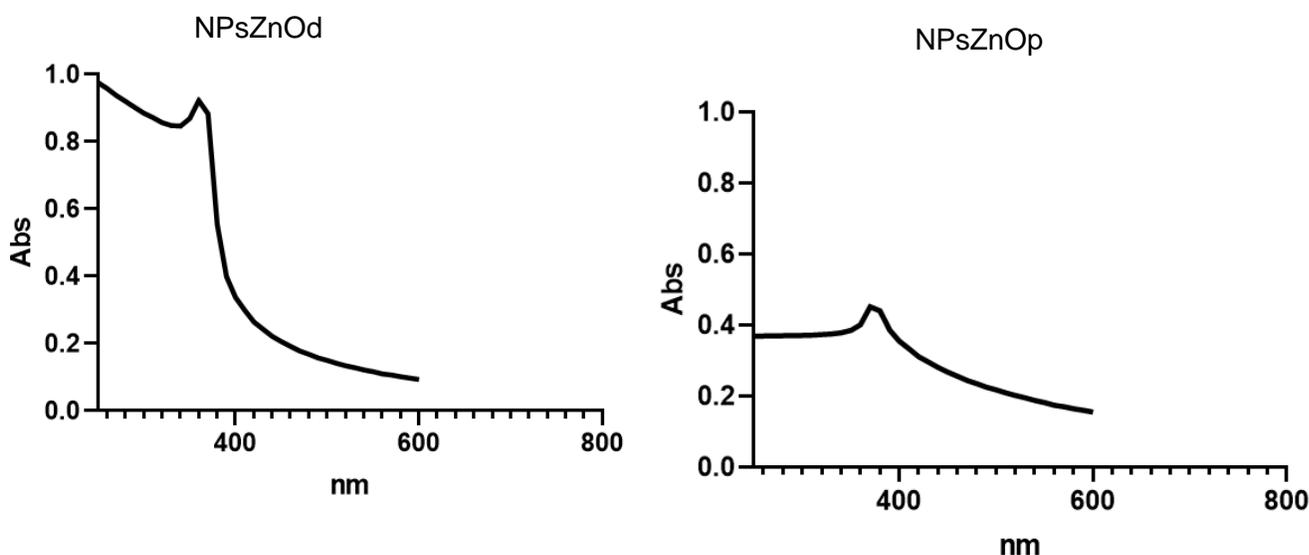


Figura 3. Absorbancia de las NPsZnO en suspensión (NPsZnOd) y en polvo (NPsZnOp).

3.1.2 Distribución del radio hidrodinámico y el potencial Zeta de las NPsZnO.

La dispersión dinámica de la luz es una herramienta importante para caracterizar el radio hidrodinámico y el potencial Zeta de las nanopartículas en solución. Para determinar el tamaño de las nanopartículas se incide un láser sobre la solución y se miden las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada en función del tiempo, con la cual se obtiene la velocidad del movimiento browniano y mediante la relación de Stokes-Einstein se calcula el tamaño hidrodinámico de las partículas (Composix, 2012). Por otro lado, para medir el potencial Zeta, también se hace incidir un láser a través de la muestra y se mide la velocidad de las partículas en un campo eléctrico aplicado de un valor conocido (movilidad electroforética)(Murdock et al.,

2008). El ultrasonido previamente aplicado a las NPsZnO se utilizó para dispersarlas en el medio. El tamaño del radio hidrodinámico y la estabilidad resultante de las NPs se evaluó por DLS.

La distribución de los diferentes tamaños de las NPsZnO fue medida según la intensidad de luz dispersada y el número de partículas. En las gráficas de distribución de tamaño por intensidad, las NPsZnO en suspensión mostraron un pico máximo de absorbancia en 222 nm (Figura 4a) mientras que las NPsZnO en polvo presentaron 2 picos máximos, a 209 nm y 715 nm (Figura 4b). Por otro lado, en las gráficas de distribución de tamaño por número de partículas, las NPsZnO en suspensión presentaron dos tamaños principales: 42 nm y 148 nm, con un promedio de 92 nm (Figura 4c), mientras que las NPsZnO en polvo mostraron un pico máximo en 191 nm (Figura 4d). Esos resultados indican que las NPsZnO en la presentación de polvo, son más grandes que sus homólogas presentadas en suspensión.

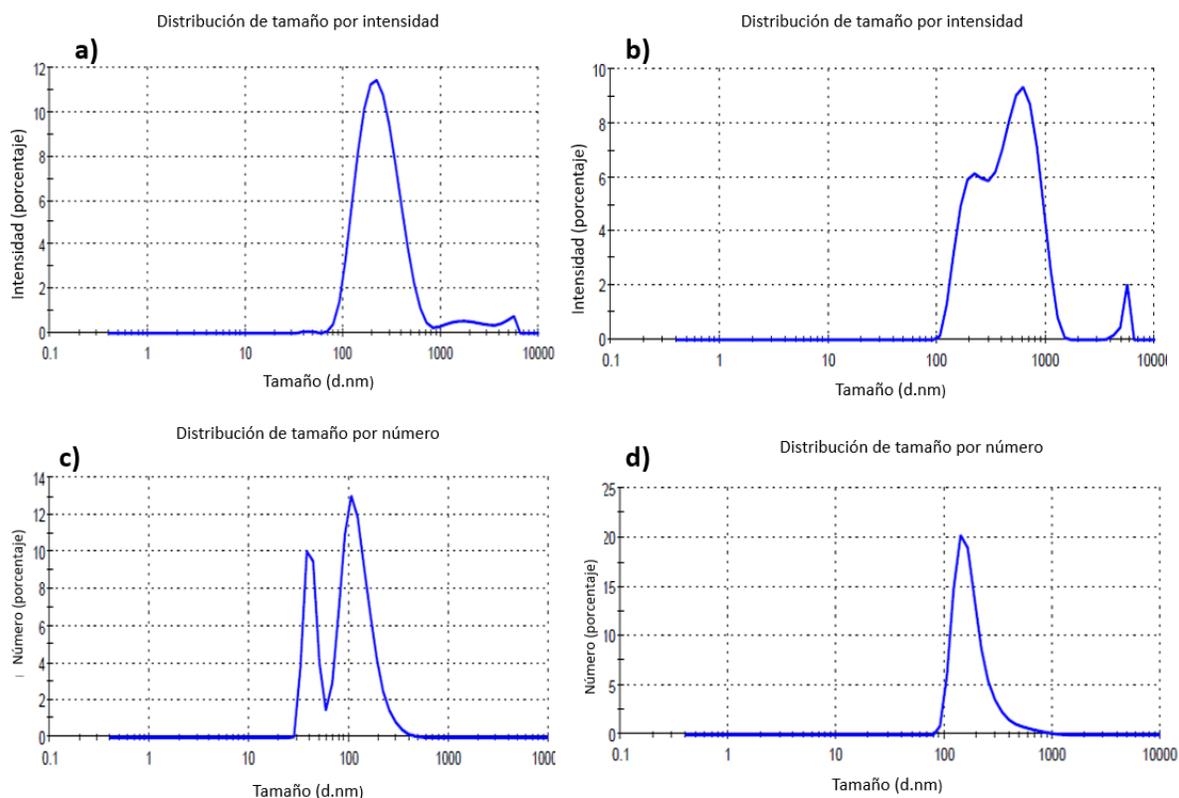


Figura 4. Distribución del tamaño de las NPsZnO en solución acuosa con base en su intensidad (a y b) y número de partículas (c y d). En la sección izquierda se presentan los resultados referentes a las NPsZnO en suspensión (a y c) y en la sección derecha el de las NPsZnO en polvo (b y d).

El potencial Z de las NPsZnO de ambas presentaciones se muestra en la Figura 5, en la cual las NPsZnO en suspensión y en polvo presentaron un potencial Zeta de -24mV (Figura 5a) y -22 mV (Figura 5b), respectivamente. Ambas NPs presentaron una estabilidad similar en medio acuoso.

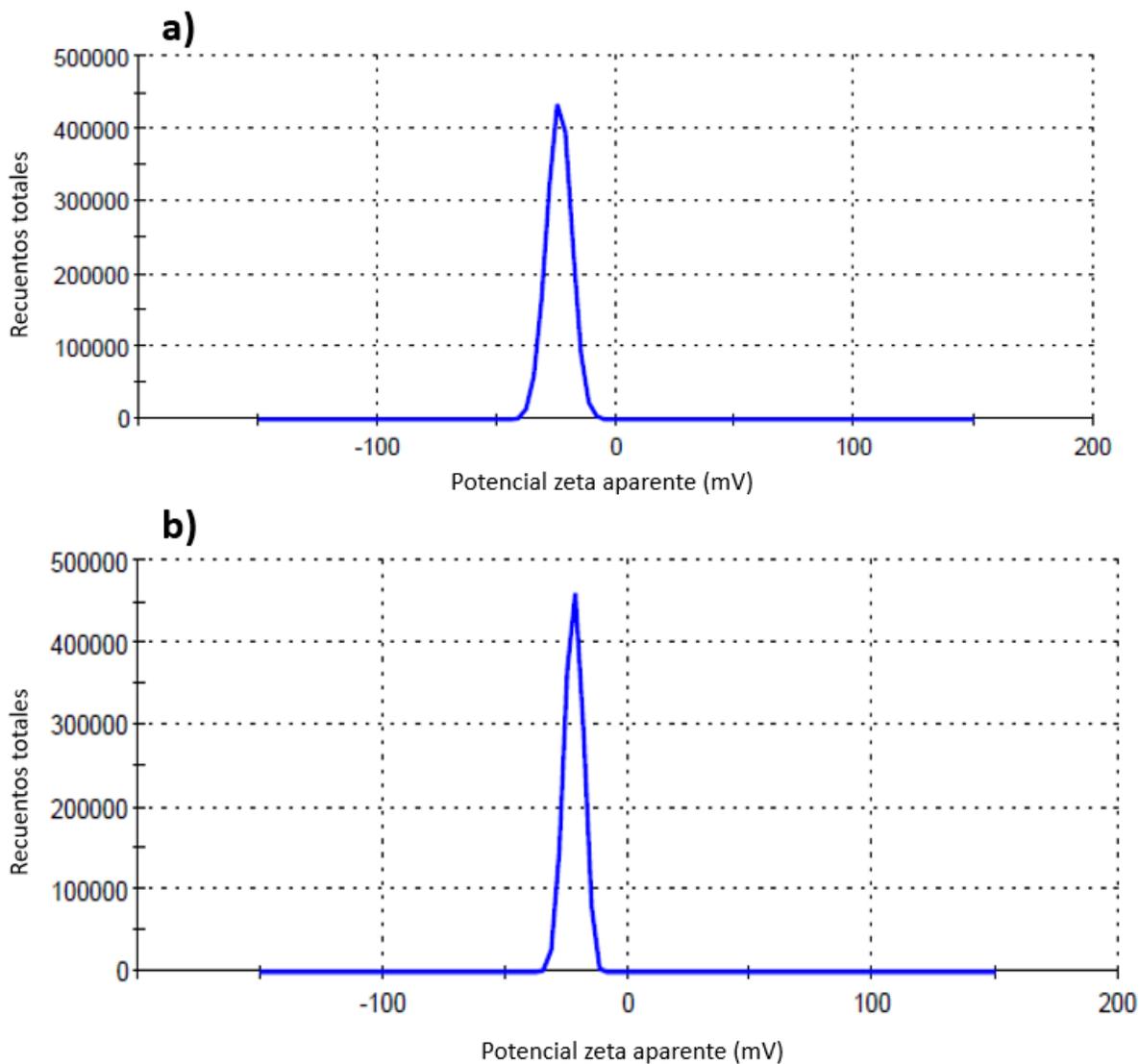


Figura 5. Potencial Zeta de las NPsZnO en suspensión (a) y en polvo (b).

3.1.3 Morfología y distribución de la frecuencia de los tamaños de las NPsZnO

La microscopía electrónica de transmisión es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de NPs. Su funcionamiento se basa en hacer incidir un haz de electrones de alta energía a una muestra muy delgada (en este caso con NPsZnO), de esta manera los electrones que atraviesan la muestra son

recopilados y procesados hasta obtener una imagen de alta resolución, la cual es aumentada y proyectada sobre una pantalla fluorescente formando una imagen visible.

La micrografía presentada en la figura 6a muestra que la mayoría de las NPsZnO en polvo tienen una morfología irregular. El diámetro de las NPsZnO en polvo va desde los 30 nm hasta los 120 nm, resultando estar los tamaños muy heterodispersos (Figura 6c). El tamaño promedio de las NPsZnO en polvo fue de 82 ± 22 nm.

En la figura 6 se observa que no hay diferencias apreciables entre la morfología de las NPsZnO en polvo y en suspensión. Las NPsZnO en suspensión demostraron tener una forma irregular (Figura 6b) con diámetros que oscilan entre los 30 nm hasta los 90 nm con un promedio de 47 ± 11 nm (Figura 6d). En cambio, el tamaño de las NPsZnO en polvo si fueron mas heterodispersas y casi el doble de grandes que las NPsZnO en suspensión. En la figura 6 se observa que no hay diferencias apreciables entre la morfología de las NPsZnO en polvo y en suspensión. Las NPsZnO en suspensión demostraron tener una forma irregular (Figura 6b) con diámetros que oscilan entre los 30 nm hasta los 90 nm con un promedio de 47 ± 11 nm (Figura 6d). En cambio, el tamaño de las NPsZnO en polvo si fueron más heterodispersas y casi el doble de grandes que las NPsZnO en suspensión.

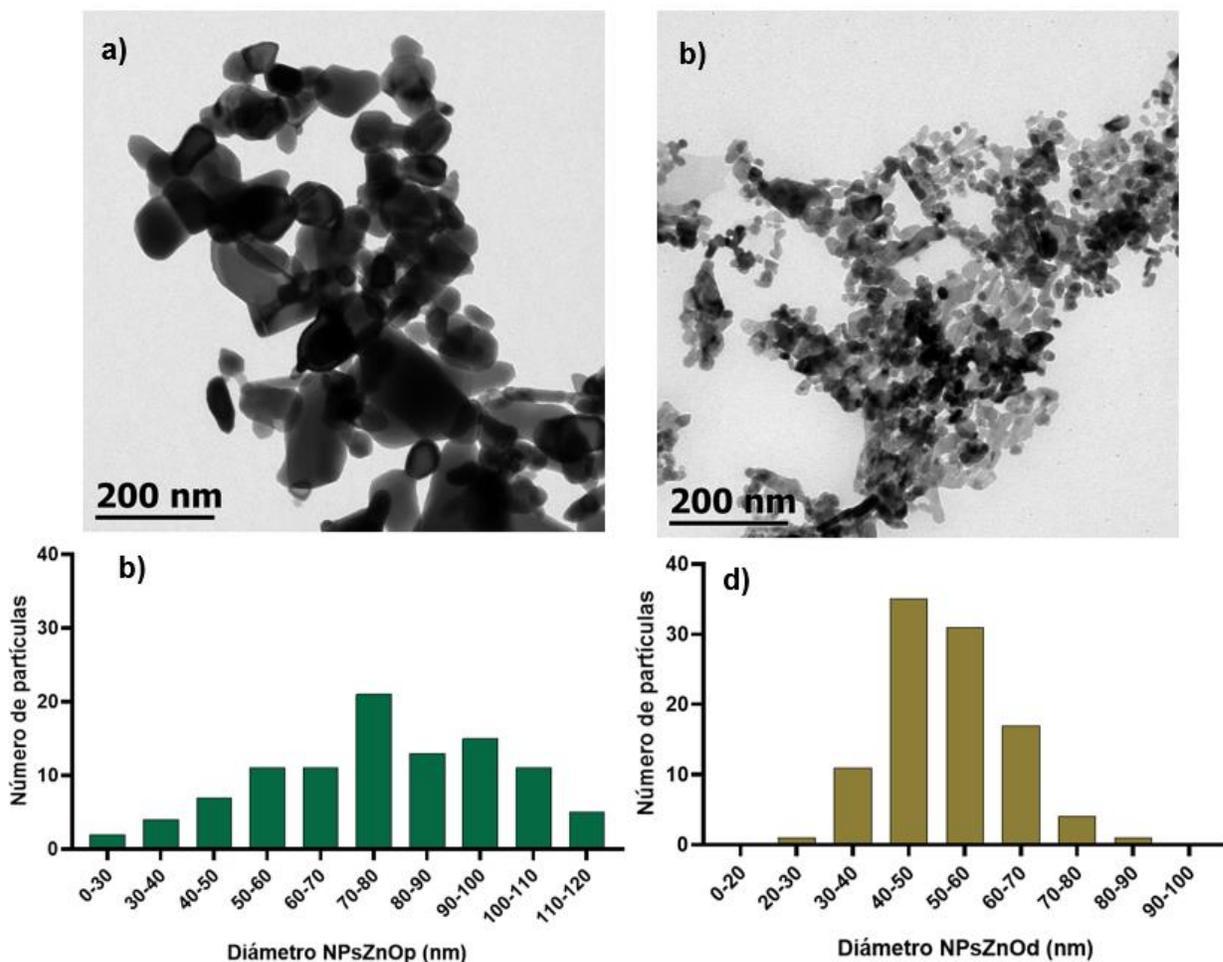


Figura 6. Micrografías obtenidas por TEM y distribución de la frecuencia de los tamaños de las NPsZnO. En la parte superior se muestran las micrografías electrónicas de las NPsZnO en polvo (a) y en suspensión (b). En la parte inferior se muestran los histogramas de la distribución de la frecuencia de los tamaños de las NPsZnO en polvo (c) y en suspensión (d).

3.1.4 Disolución de las NPsZnO

La liberación de iones es uno de los mecanismos por los cuales las NPs pueden resultar tóxicas, en especial aquellas fabricadas a partir de metales y de óxidos metálicos, por esto es importante conocer la capacidad de disolución de las NPsZnO en el medio de cultivo.

La disolución de las NPsZnO en el medio de cultivo se expresó en unidades arbitrarias (u.a) de absorbancia, el cual se procesó restando el promedio de la absorbancia del medio de cultivo sin NPsZnO a los tratamientos. De esta manera se excluyeron los iones pertenecientes al propio medio de cultivo y se tomaron en cuenta solo los iones liberados por la disolución de las diferentes concentraciones de NPsZnO.

En la Figura 7 se muestra la absorbancia asociada a los iones zinc liberados, en donde tanto las NPsZnO suspendidas ($D = 47 \pm 11$ nm) como las de polvo ($D = 82 \pm 22$ nm) generan entre 0.07 u.a y 0.1 u.a más de iones zinc respecto al medio de cultivo sin NPs en todas las concentraciones. En su capacidad de disolución, ninguna NP presenta alguna tendencia conforme aumenta la concentración, y entre ellas no hay diferencias significativas

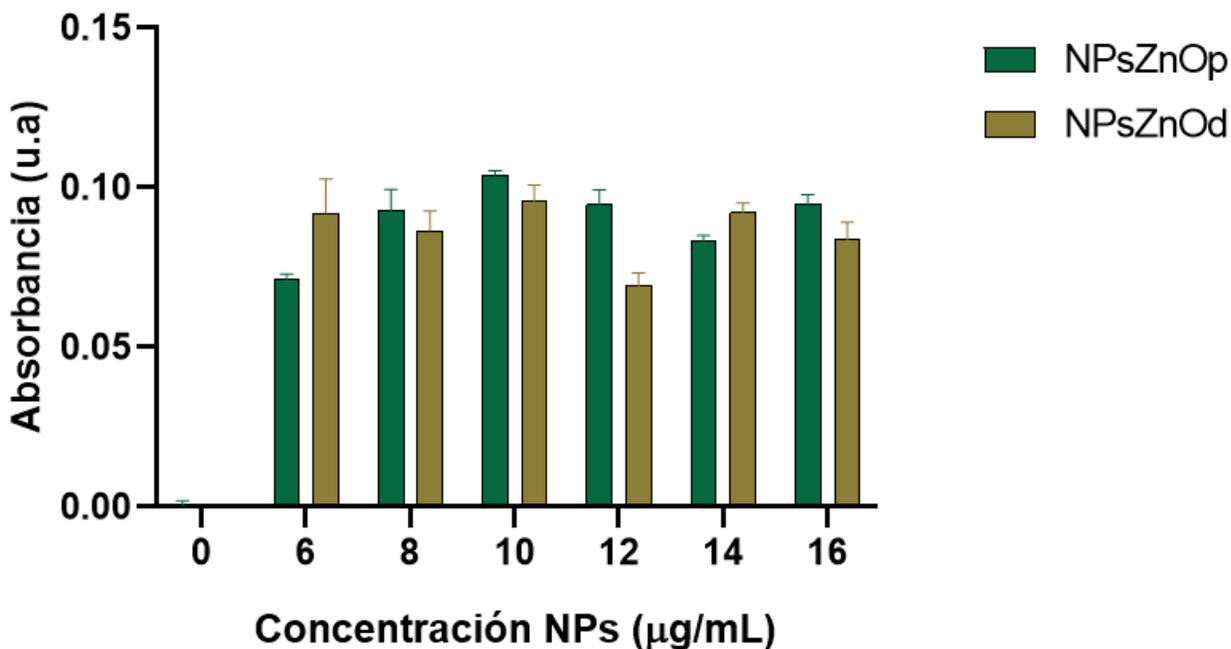


Figura 7. Disolución de las NPsZnO en medio DMEM. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración de NPs por triplicado. Se realizó un ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

3.2 Viabilidad celular por ensayo MTT

La viabilidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO por 24 h, 48 h y 72 h fue evaluada con el ensayo MTT. El control con células sin NPs se utilizó como base para representar el 100% de viabilidad. Las fotos de las células expuestas a las NPsZnO de polvo y suspendidas por 24 h, tomadas con el software Lumaview720, se encuentran en el anexo 2.

En este trabajo se evaluarán dos tipos de presentaciones de NPsZnO que difieren en sus tamaños y la forma en cómo el proveedor las distribuye; la primera de ellas está en polvo (NPsZnOp). En la segunda presentación, las NPsZnO estaban suspendidas (NPsZnOd). Los resultados de los ensayos de viabilidad celular se presentan a continuación.

3.2.1 Viabilidad celular de hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.

En la figura 8a se muestra que la viabilidad celular disminuye conforme aumenta la concentración de NPsZnO en polvo, siendo el efecto citotóxico claramente perceptible y mayor en las concentraciones de 12 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en todos los tiempos de exposición de las células. Por otro lado, parece ser que el efecto citotóxico de las NPsZnO en polvo es mayor en las primeras 24 h.

Las concentraciones de NPsZnO en polvo de 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ocasionan en los hepatocitos un efecto citotóxico muy leve en todos los tiempos de exposición. Sin embargo, durante las primeras 24 h a partir de la concentración de NPZnOp de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ocurre una disminución del 72% en la viabilidad celular, este efecto tóxico se observa hasta los 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en donde la viabilidad de los hepatocitos es del 41%. A las 48 h de exposición, el primer efecto tóxico de las NPsZnOp, se observa a partir de los 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y tiene un efecto citotóxico máximo en los 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentración en la que solamente se tiene un 19% de viabilidad celular. Sorprendentemente, después de que los hepatocitos han sido expuestos por 72 h a las diferentes concentraciones de NPsZnOp, la viabilidad celular se recuperó casi en su totalidad, y solamente se presenta un efecto claramente citotóxico en las concentraciones de NPsZnOp de 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en donde se tiene una viabilidad celular del 52% y 30% respectivamente. Después de comparar los valores de la viabilidad de los hepatocitos expuestos a las diferentes concentraciones de NPs a través del tiempo, es posible identificar que las concentraciones de 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son levemente citotóxicas, mientras que las de 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son claramente citotóxicas, pues la viabilidad celular es menor al 60% en todos los tiempos de exposición (figura 8a).

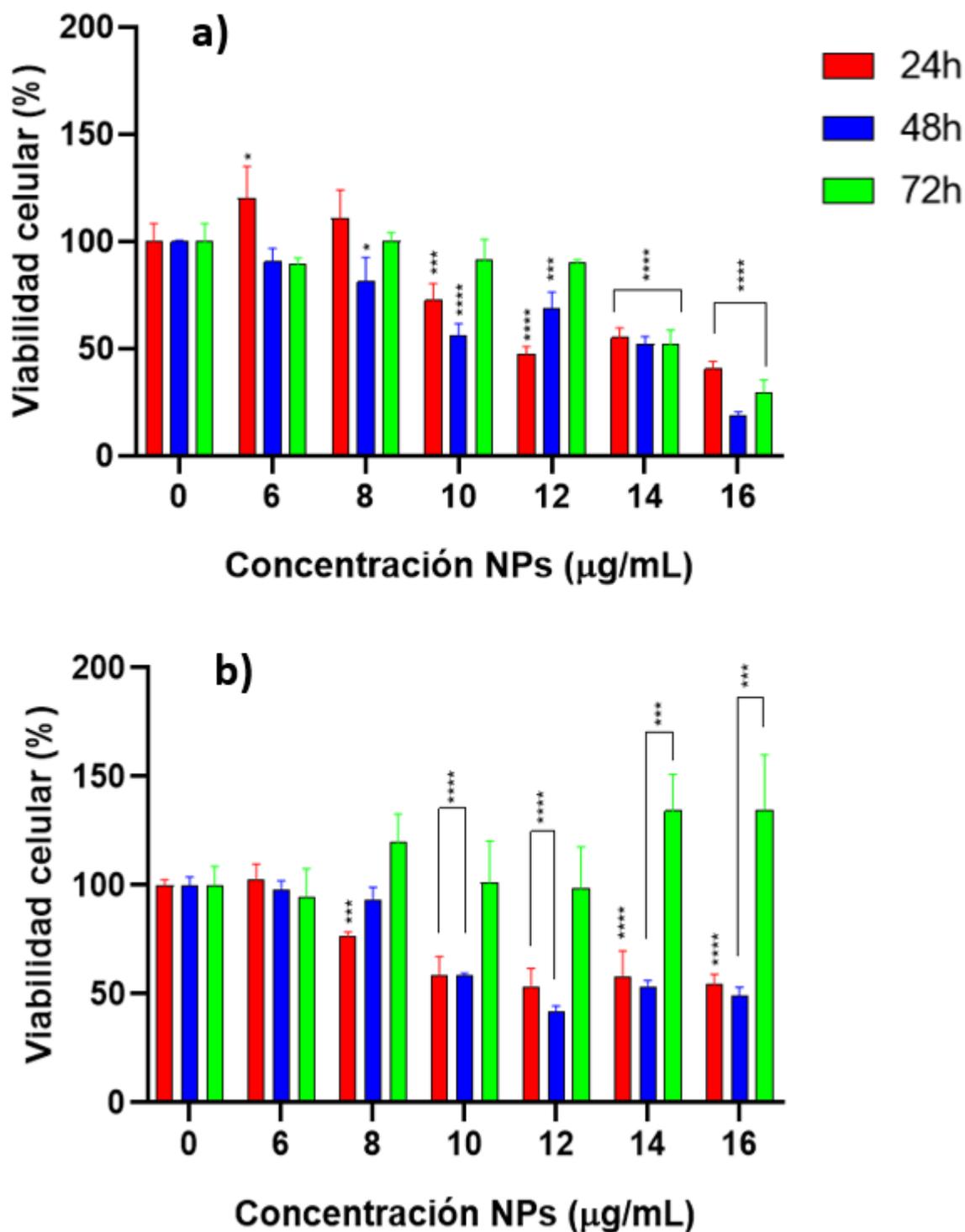


Figura 8. Viabilidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (a) y en suspensión (b) durante 24h, 48h y 72h. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración por triplicado. Se realizó un ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

3.2.2 Comparación de la viabilidad celular de hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.

Debido a que el comportamiento citotóxico puede depender de más de una característica de las NPs, es importante determinar cuál es la influencia de esos parámetros en la viabilidad celular. En este trabajo, se quiere conocer si las diferentes presentaciones (suspendidas y en polvo) de NPs a base de ZnO, inducen un efecto distinto en células hepáticas. De esta manera, se podrán identificar algunos parámetros que participan en la citotoxicidad de las NPsZnO.

Al comparar el efecto citotóxico de ambas presentaciones de NPs a través del tiempo, es posible observar en la Figura 9, que los hepatocitos disminuyen su viabilidad conforme aumenta la concentración de ambas NPs. En las primeras 24 h que las células han estado expuestas a las NPs, las NPsZnO en suspensión son más citotóxicas que las de polvo a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cambio, después de la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el efecto citotóxico que ambas NPs presentan es similar.

Una vez que las células hepáticas han sido expuestas durante 48 h a las diferentes concentraciones de ambas presentaciones de NPsZnO, se observa (Figura 9b) que para ambos casos el efecto citotóxico inicia a partir de los 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, conforme aumenta las concentraciones de las NPsZnOp, es evidente que éstas resultan ser más tóxicas que las NPsZnOd. Es importante destacar, que a las 48 h las NPsZnOp logran disminuir aún más la viabilidad de los hepatocitos en la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respecto a las 24h. Esto no sucede con las NPsZnO presentadas en suspensión, por lo que aparentemente, su toxicidad no es dependiente del tiempo.

Después de que los hepatocitos han estado expuestos por 72h a las dos presentaciones de NPsZnO, es posible observar (Figura 9c), que ocurren diferencias significativas en la viabilidad celular, sobre todo en las últimas dos concentraciones de NPs (14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$); resultando que las NPsZnOp son más tóxicas. Mientras que las NPsZnOd a esas mismas concentraciones ocasionan un efecto opuesto, ya que la viabilidad celular aumenta inclusive más que el control, presentando un efecto proliferativo. Por lo que es posible destacar que los hepatocitos AML-12, demostraron tener una capacidad para sobreponerse al daño tóxico ocasionado durante las primeras 24 horas de exposición por las NPsZnOd.

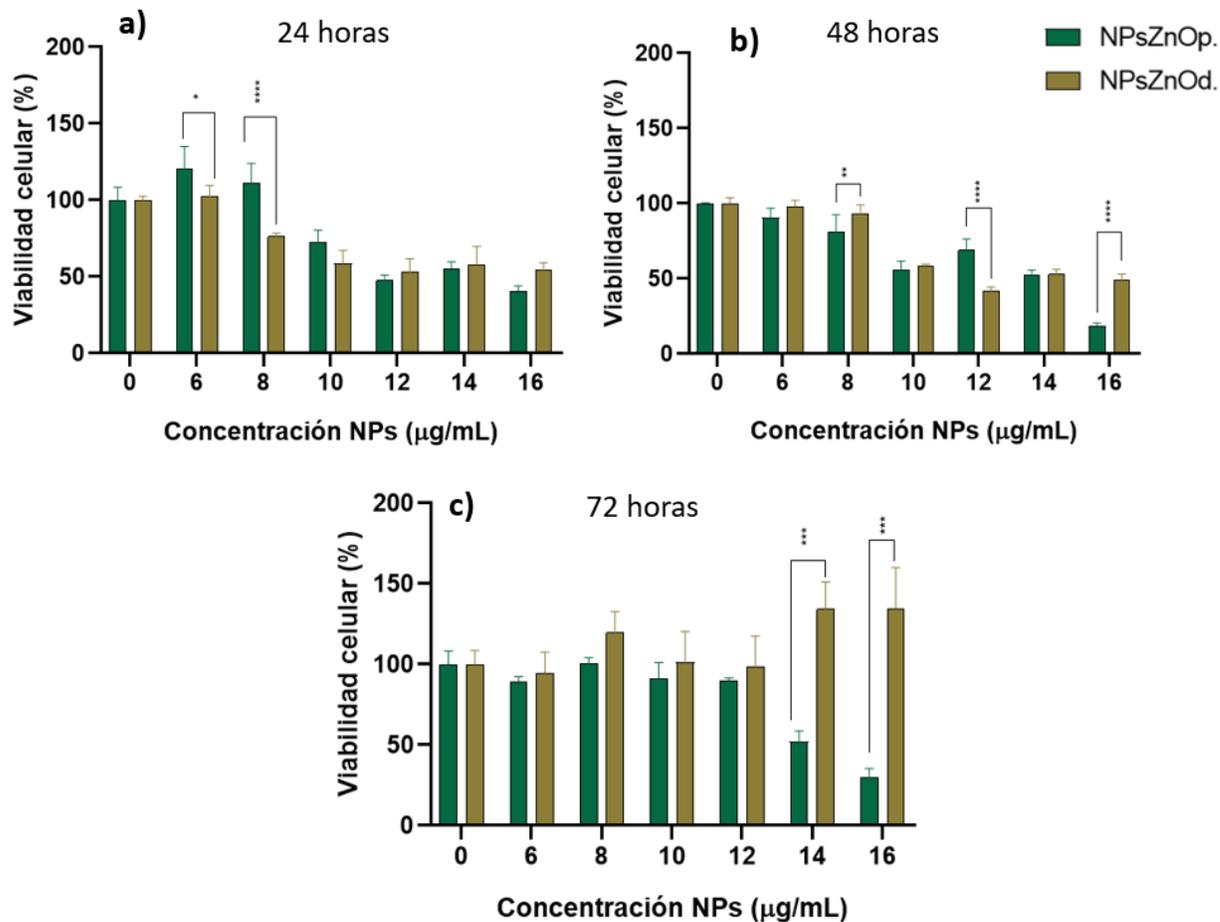


Figura 9. Comparación de la viabilidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (NPsZnOp) y en suspensión (NPsZnOd) durante 24h (a), 48h (b) y 72h (c). Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración por triplicado. Se realizó un ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Para conocer la influencia que pueden tener los iones zinc en la toxicidad de los hepatocitos, las células se expusieron a las mismas concentraciones de NPsZnO más EDTA, el cual es un reactivo que forma complejos (quelación) con iones metálicos como el Zn^{2+} , siendo capaz de secuestrar a los iones generados por la disolución de las NPs en el medio. En la Figura 10 se observa que la viabilidad de los hepatocitos expuestos por 24 h a las diferentes concentraciones de NPsZnO tratadas con EDTA, no sufre cambios significativos respecto al control. De esta manera, se puede comprobar que, al secuestrar con el EDTA a los iones

liberados por la disolución de las NPsZnO en ambas presentaciones, no se afecta la viabilidad celular, por lo que es altamente probable que los iones Zn^{2+} jueguen un papel fundamental en la toxicidad de las NPs.

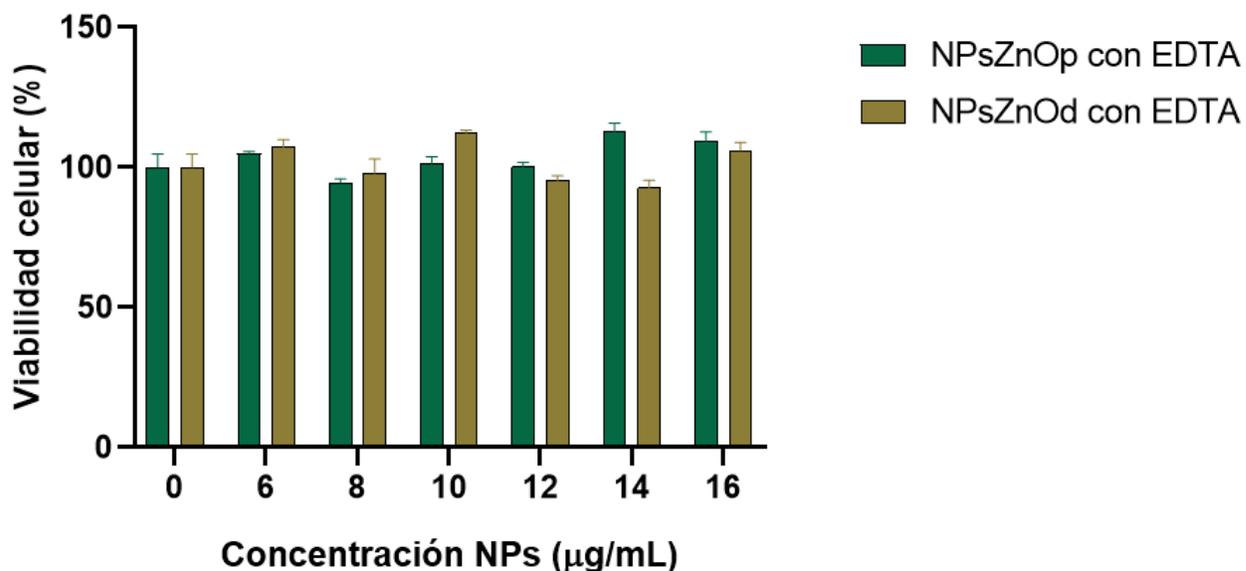


Figura 10. Comparación de la viabilidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos durante 24 h a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (NPsZnOp) y en suspensión (NPsZnOd) previamente incubadas con EDTA (1mM). Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración por triplicado. Se realizó un ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

3.3 Producción de ROS

La disminución en la viabilidad celular en presencia de NPs indica un claro daño citotóxico, el cual puede ser provocado por algún mecanismo inducido por las NPs. La generación de ROS es uno de los principales mecanismos por el cual las NPs causan daño celular, además, es un gran modulador de las funciones celulares. Por esto, es importante comparar la producción de ROS y la viabilidad celular para así conocer si existe una relación entre ellos, y si así fuera, determinar de que manera la cantidad de ROS afecta la viabilidad celular en cada concentración de NPs a lo largo del tiempo.

Los ROS producidos por los hepatocitos a diferentes concentraciones de NPsZnO por 24, 48 y 72 horas se midieron indirectamente por la fluorescencia generada por el reactivo DCF. Es importante señalar que las gráficas de esta sección representan los ROS intracelulares de cada concentración dividido entre el porcentaje de viabilidad celular, con la finalidad de normalizar la producción de ROS por célula viable.

3.3.1 Producción de ROS en los hepatocitos expuestos a las NPsZnO en polvo y en suspensión.

Las NPsZnO en polvo lograron inducir la generación de ROS en los hepatocitos de una forma dependiente de su concentración en todos los tiempos de exposición, siendo a las 24 horas de exposición donde se presentaron mayores niveles de producción de ROS (Figura 11a).

Durante las primeras 24 horas de exposición de hepatocitos a las NPsZnO en polvo, se incrementó la producción de ROS de las células de una forma dependiente del aumento en la concentración de las NPs. A partir de la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPsZnO en polvo la producción de ROS intracelular incrementó significativamente respecto al control.

Después de que los hepatocitos fueron incubados con las NPsZnO en polvo por 48 h, la generación de ROS incrementa en 10 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, las células que han estado expuestas a las NPs por 72 h presentan un incremento significativo en la producción de ROS en 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras en el resto de concentraciones no hay cambios respecto al control (Figura 11a). De forma general las NPsZnO en polvo en concentraciones de 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no inducen la sobreproducción de ROS en los hepatocitos, mientras que si lo hacen a los 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en todos los tiempos de exposición.

Por otro lado, las NPsZnO en suspensión indujeron la sobreproducción de ROS en los hepatocitos sin una dependencia clara con su concentración. Los mayores niveles de ROS intracelulares inducidos por las NPsZnOd se presentaron en las primeras 24 h. En la Figura 11b se grafica las ROS producidas en los hepatocitos que fueron expuestas a NPsZnO suspendidas. En las primeras 24 h de exposición a las NPs, se induce en las células una sobreproducción de ROS en todas las concentraciones a partir de los 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los niveles de ROS sobreproducidos no tienen diferencias significativas, por lo que no hay una dependencia del aumento de la concentración de NPs con el aumento en la generación de ROS. A las 48 h de que las células fueron expuestas a las diferentes concentraciones de NPsZnOd, existe una sobreproducción de ROS en las concentraciones de 10 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de 72 h de exposición de los hepatocitos a las NPsZnOd, ya no se observa la sobreproducción de ROS en ninguna concentración, es importante destacar que inclusive los niveles de ROS disminuyeron respecto del control en las células expuestas a las concentraciones desde los 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

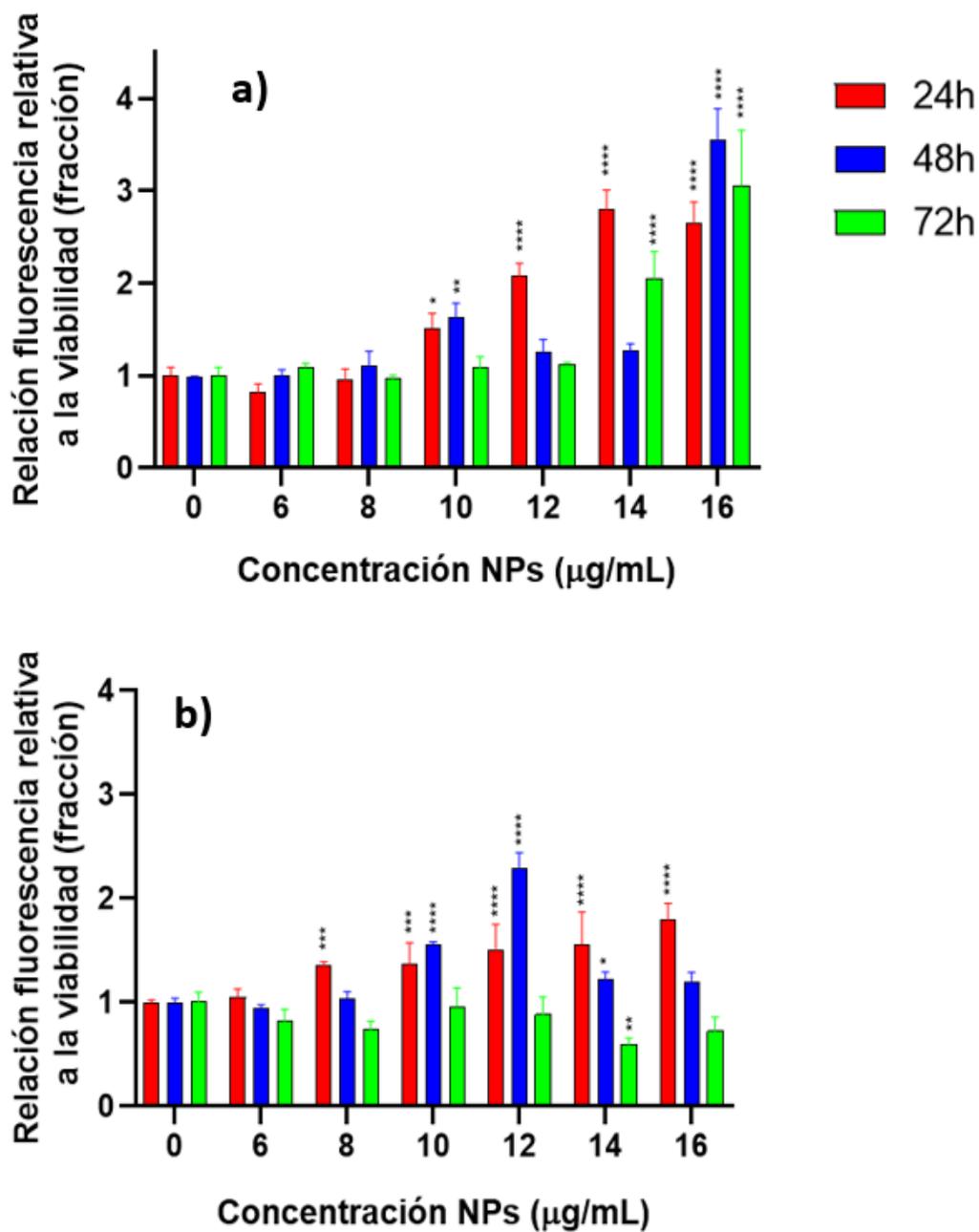


Figura 11. Producción de ROS en los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (a) y en suspensión (b) durante 24h, 48h y 72h. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración por triplicado. Se realizó un ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

3.3.2 Comparación de la producción de ROS en hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.

La sobreproducción de ROS inducida en los hepatocitos AML-12 por la exposición a las nanopartículas, indica un posible mecanismo de toxicidad, por lo que es importante comparar este incremento tomando en cuenta no sólo el tipo de presentación de las NPsZnO, si no también las concentraciones y el tiempo.

Los hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo durante 24 h presentaron una sobreproducción de ROS significativamente mayor que los inducidos por las NPsZnO en suspensión a partir de los 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 12a). A las 48h de exponer los hepatocitos a NPs, las NPsZnO en polvo lograron inducir una sobreproducción de ROS mayor que las NPsZnO en suspensión en la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 12b).

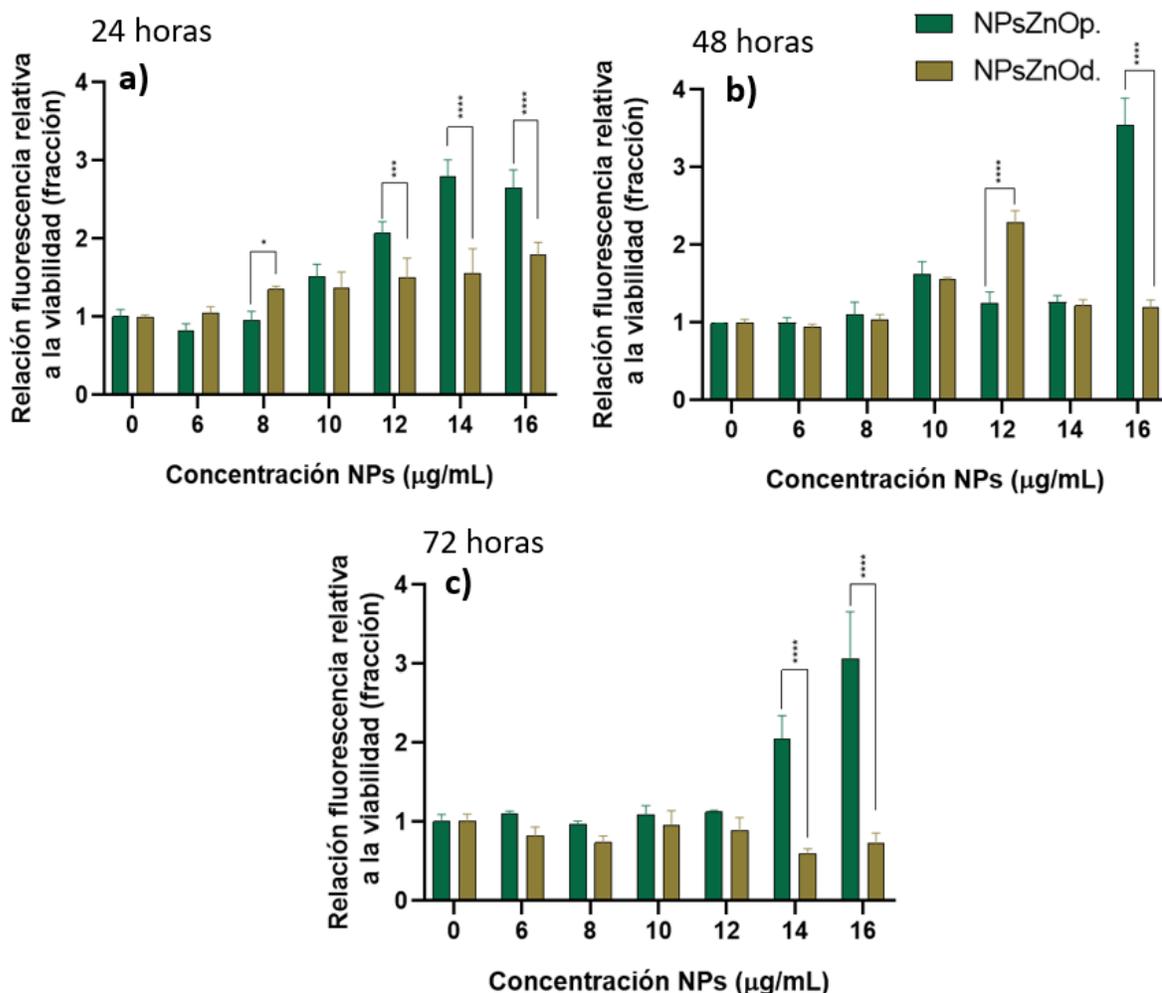


Figura 12. Comparación de la producción de ROS de los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (NPsZnOp) y en suspensión (NPsZnOd) durante 24h (a), 48h (b) y 72h (c). Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración por triplicado. Se realizó un ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$.

De la misma forma, después de 72h de exposición de los hepatocitos a NPs, las NPsZnO en polvo indujeron una sobreproducción de ROS significativamente mayor que los inducidos por las NPsZnO en suspensión en la concentración de 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 12c). Estos resultados muestran que la exposición de los hepatocitos a NPsZnO en polvo y suspensión en concentraciones de 6 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inducen una cantidad de ROS similar en todos los tiempos de exposición. En cambio, cuando las células se expusieron a NPs a partir de los 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las NPsZnO en polvo fueron capaces de producir una mayor cantidad de ROS en los hepatocitos comparados por las generadas con las NPsZnO en suspensión en todos los tiempos de exposición.

3.3.3 Detección de ROS en hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión mediante microscopía confocal.

La microscopía confocal es un método ideal para tener evidencia cualitativa de la producción de ROS. Según los resultados anteriores, se optó por visualizar las ROS intracelulares en los hepatocitos expuestos a 8, 10 y 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPsZnO durante 24 horas ya que fueron las concentraciones y tiempo de exposición donde se presentó una mayor sobreproducción de ROS inducida por las NPsZnO de ambas presentaciones.

La intensidad de los ROS producidos por los hepatocitos expuestos a NPsZnO se compararon con un control de células no expuestas a NPsZnO, el cual representa el nivel basal endógeno de ROS intracelular. La visualización de los ROS es indirecta ya que la fluorescencia asociada a los ROS presentada en las figuras 13 y 14 como puntos luminosos blancos, es resultado de la oxidación del reactivo DCFDA cuya reacción es favorecida en presencia de ROS. Para observar si dicha oxidación se produce dentro de las células se compararon los puntos luminosos blancos con un recuadro mas pequeño que contiene el núcleo de los hepatocitos teñido de rojo. De esta manera en la Figura 13 se puede apreciar que los puntos fluorescentes de color blanco correspondiente a la presencia de ROS en los hepatocitos expuestos a las NPsZnO en polvo, aumentan conforme la concentración de NPs incrementa, por ejemplo, en el recuadro correspondiente a la concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observan menos puntos blancos que a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando que entre mayor es la concentración de NPsZnO en polvo, mayor es la producción de ROS en los hepatocitos. De esta manera, las células expuestas a 10 y 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPsZnO en polvo, mostraron la presencia de puntos luminosos blancos evidentemente mayores al control, indicando que en estas concentraciones de NPs, aparentemente, la producción de ROS de los hepatocitos es mayor a las basales.

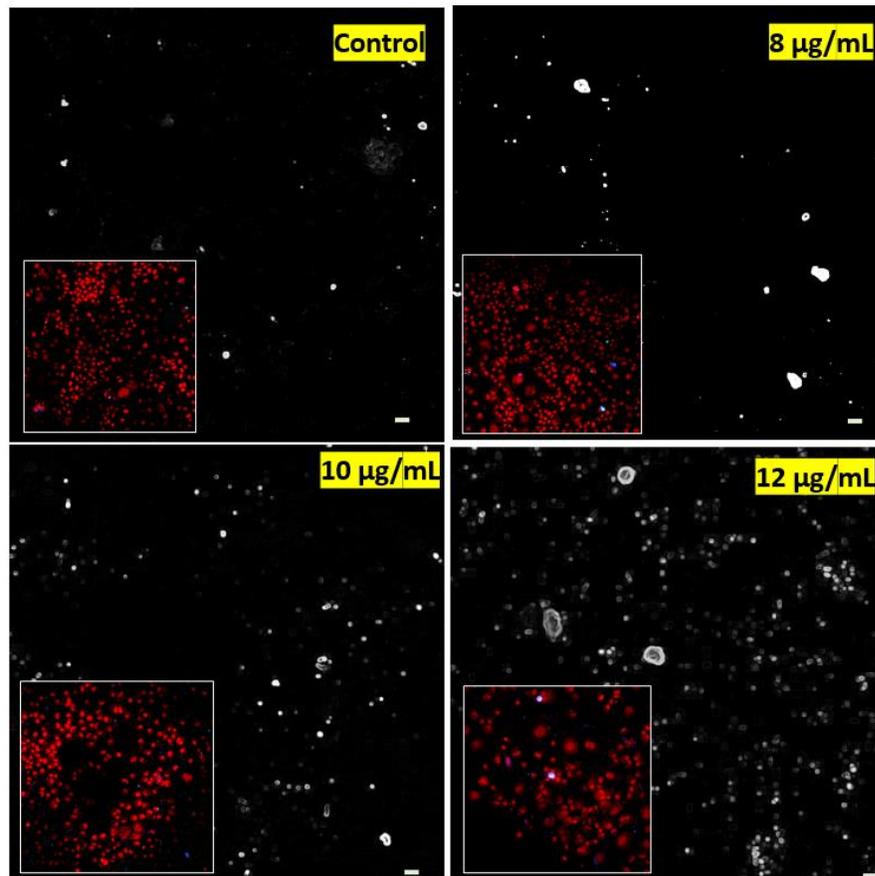


Figura 13. Visualización de la producción de ROS en los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (NPsZnOp) durante 24h. Los puntos blancos representan la fluorescencia del DCF generado por los ROS. En el recuadro localizado dentro de cada imagen se enfatizan los núcleos celulares de los hepatocitos, los cuales fueron teñidos de rojo con el reactivo NucRED.

En la figura 14, se presentan las micrografías obtenidas con el microscopio confocal. Para el caso de las células expuestas a las NPsZnO en suspensión a una concentración de 12 µg/mL, y en comparación con el resto de concentraciones y el control, se presenta una mayor presencia de puntos fluorescentes blancos, que corresponden a las ROS, aunque la diferencia no es tan grande, por lo que, aparentemente la presencia de ROS en los hepatocitos expuestos a 8, 10 y 12 µg/mL de NPsZnOd es similar. Esto indica que las NPsZnO en suspensión no inducen una producción de ROS tan diferenciada a los hepatocitos no expuestos.

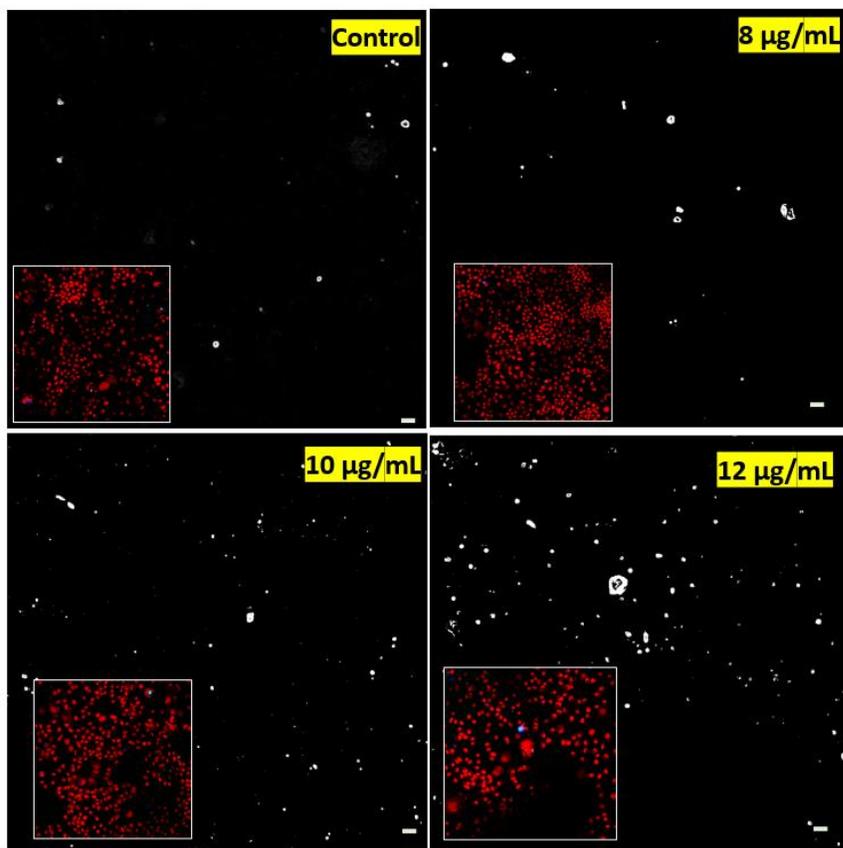


Figura 14. Visualización de la producción de ROS en los hepatocitos AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en suspensión (NPsZnOd) durante 24h. Los puntos blancos representan la fluorescencia del DCF generado por los ROS. En el recuadro localizado dentro de cada imagen se enfatizan los núcleos celulares de los hepatocitos, los cuales fueron teñidos de rojo con el reactivo NucRED.

De forma general, los hepatocitos expuestos a 12 µg/mL de NPsZnO en polvo muestran una mayor presencia de puntos fluorescentes correspondientes a la presencia de ROS, que los hepatocitos expuestos a las NPsZnO en suspensión a la misma concentración. Esta diferencia puede indicar que las NPsZnO en polvo, son capaces de inducir una mayor producción de ROS intracelulares, comparado con las inducidas por las NPsZnO en suspensión.

3.4 Internalización de NPsZnO en hepatocitos

3.4.1 Cambios en la complejidad celular de hepatocitos AML-12 expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.

Las NPs pueden ser capaces de modificar la complejidad de la célula, la cual está relacionada con la presencia de vesículas y endosomas internos. En el caso de que las NPs se internalicen en las células, suelen hacerlo por medio de vacuolas a partir de la membrana celular, y pueden manifestarse como un aumento en la cantidad de vesículas internas, y por tanto, de complejidad celular. De esta manera, la alteración en la complejidad de las células expuestas a NPs, está asociada con su internalización.

La complejidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos a NPsZnO, se comparó con un control de células sin NPs, la cual representa la complejidad basal. Cuando los hepatocitos fueron expuestos a NPsZnO en polvo durante 24h, su complejidad aumentó significativamente respecto al control en todas las concentraciones (Figura 15a). En cambio, cuando las células se expusieron a las NPsZnO en suspensión durante 24h, la complejidad no cambió de manera significativa para ninguna concentración (Figura 15b). Parece ser que, a diferencia de las NPsZnO en suspensión, las NPsZnO en polvo aumentan la presencia de vesículas internas en los hepatocitos, lo que estaría relacionado con la internalización de las NPsZnOp en los hepatocitos.

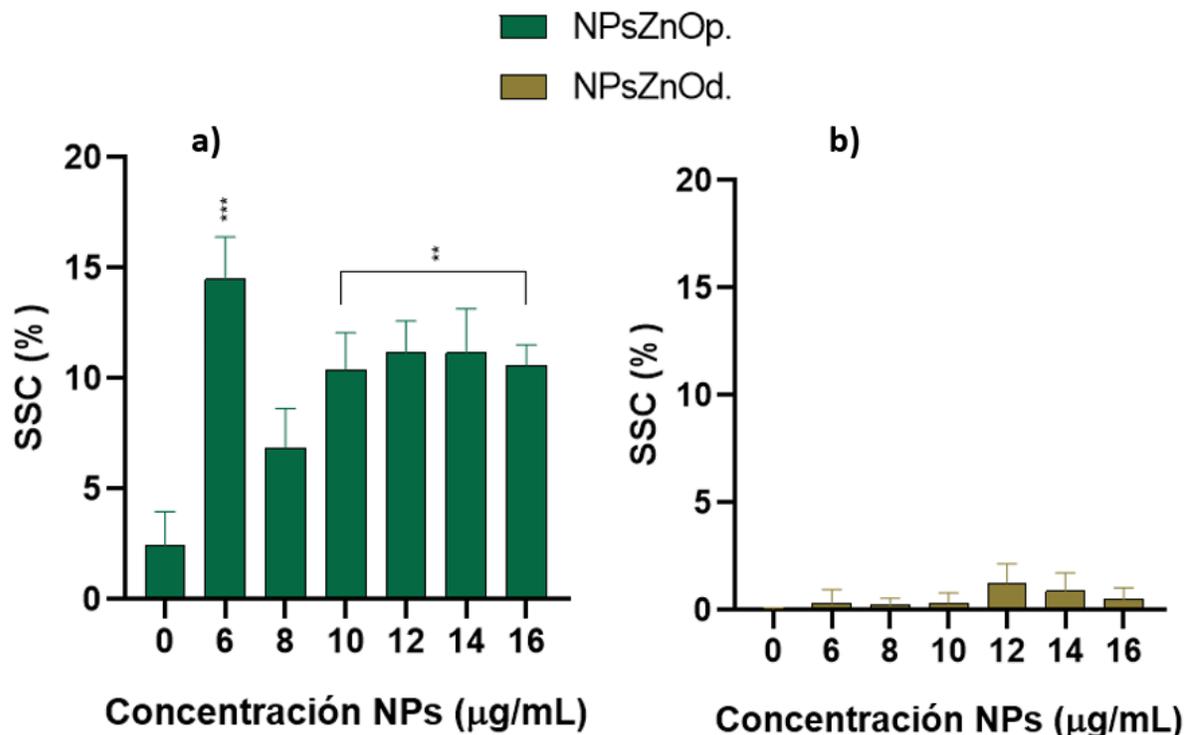


Figura 15. Complejidad celular de los hepatocitos AML-12 expuestos durante 24h a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (a) y en suspensión (b). Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración por triplicado. Se realizó ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

3.5 Actividad antioxidante

3.5.1 Actividad SOD de hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión.

Las células tienen un sistema antioxidante encargado de neutralizar las ROS y así reducir el daño oxidativo para así lograr mantener el equilibrio redox. Conocer si la actividad de enzimas antioxidantes tiene alguna alteración en las células expuestas a las NPsZnO a lo largo del tiempo, aproximará a descubrir si dichas NPs pueden llegar a tener un impacto negativo en la respuesta celular que pueda ser crítico para el desequilibrio redox y la viabilidad celular.

La actividad de la enzima SOD de los hepatocitos expuestos durante 24h a NPsZnO en polvo no tuvo ningún cambio significativo respecto al control en todas las concentraciones de NPs utilizadas (Figura 16a). Sin embargo, después de que las células se expusieron por 48 h a las NPsZnO en polvo, la actividad SOD incrementó significativamente a partir de los 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPsZnOp, presentando una actividad similar hasta los 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPsZnOp, la actividad SOD de las células fue significativamente mayor que en el resto de las concentraciones. Después de que los hepatocitos fueron expuestos a las NPsZnO en polvo durante 72h, la actividad SOD aumentó significativamente respecto al control en las concentraciones de 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos datos muestran que las NPsZnO en polvo en concentraciones de 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no afectan la actividad SOD de los hepatocitos en ningún tiempo de exposición, mientras que la actividad SOD de los hepatocitos expuestos a las NPsZnOp, aumenta hasta las 48h a partir de los 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs, siendo las concentraciones de 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las que inducen una mayor actividad de la enzima SOD. Por otro lado, el tiempo de exposición a las NPsZnOp donde la enzima SOD de los hepatocitos presentó mayor actividad fue a las 48 h (Figura 16a).

Con respecto a las células control, la actividad de la enzima SOD de los hepatocitos expuestos por 24 h a las NPsZnO en suspensión aumenta en las concentraciones de 10 y 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 16b). Por otro lado, después de que las células han estado expuestas por 48 h a las NPsZnO en suspensión, la actividad SOD disminuyó en las células expuestas a las concentraciones de 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; pero incrementó significativamente a partir de los 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPsZnOd.

En cambio, después de que los hepatocitos fueron expuestos por 72h a las NPsZnO en suspensión, la actividad SOD ya no presentó ningún aumento significativo en ninguna concentración de NPs utilizadas, por el contrario, disminuye ligeramente a partir de los 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente, la actividad de la enzima SOD de los hepatocitos expuestos a NPsZnO mostraron una mayor actividad enzimática a las 48 h comparado con el resto de los tiempos de exposición.

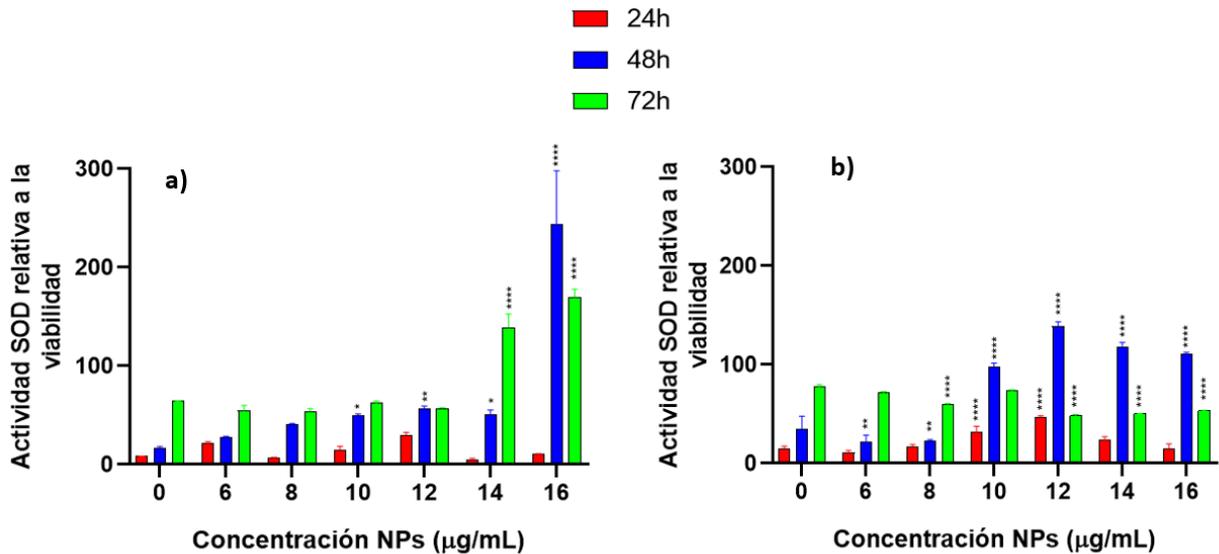


Figura 16. Actividad de la enzima SOD en los hepatocitos AML-12 expuestos durante 24h, 48h y 72h a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (a) y en suspensión (b). Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración por triplicado. Se realizó ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

3.5.2 Actividad enzimática de CAT en hepatocitos expuestos a NPsZnO en polvo y en suspensión

La actividad CAT de los hepatocitos expuestos durante 24 h a NPsZnO en polvo, aumentó significativamente en la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 17a), de la misma forma, la actividad CAT fue significativamente mayor en las células expuestas por 48 h en esa misma concentración de NPs. Mientras que en el resto de las concentraciones, la actividad enzimática de la CAT, se mantuvo similar al control. A las 72h de exposición de los hepatocitos a las NPsZnO en suspensión, la actividad de la enzima CAT aumentó significativamente respecto al control en las concentraciones de 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs. De esta manera, las NPsZnO en suspensión a concentraciones de 6-12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no tienen efectos estimulativos en la

actividad CAT de los hepatocitos. En cambio, en concentraciones de 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las NPsZnO en suspensión si sobreactivan la enzima CAT de las células en todos los tiempos de exposición (Figura 17a).

En los hepatocitos expuestos por 24h a NPsZnO en suspensión, la actividad CAT aumenta en la concentración de 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Figura 17b). Mientras que después de que las células han sido expuestas por 48h a las NPsZnOd, la actividad CAT aumenta respecto al control en las concentraciones de 10, 12 y 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de que las células se expusieron durante 72h a las NPs, la actividad CAT disminuyó su actividad respecto al control a partir de la concentración de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

De forma general, es posible decir que los hepatocitos expuestos a las NPsZnO en suspensión en concentraciones de 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no mostraron una alteración en la actividad enzimática de CAT en todos los tiempos de exposición, mientras que a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se presentó un mayor incremento en la actividad de la CAT a 48h de exposición. Sin embargo, a las 72 h de exposición a las NPsZnOd, la enzima CAT de los hepatocitos no presentó una mayor actividad respecto del control.

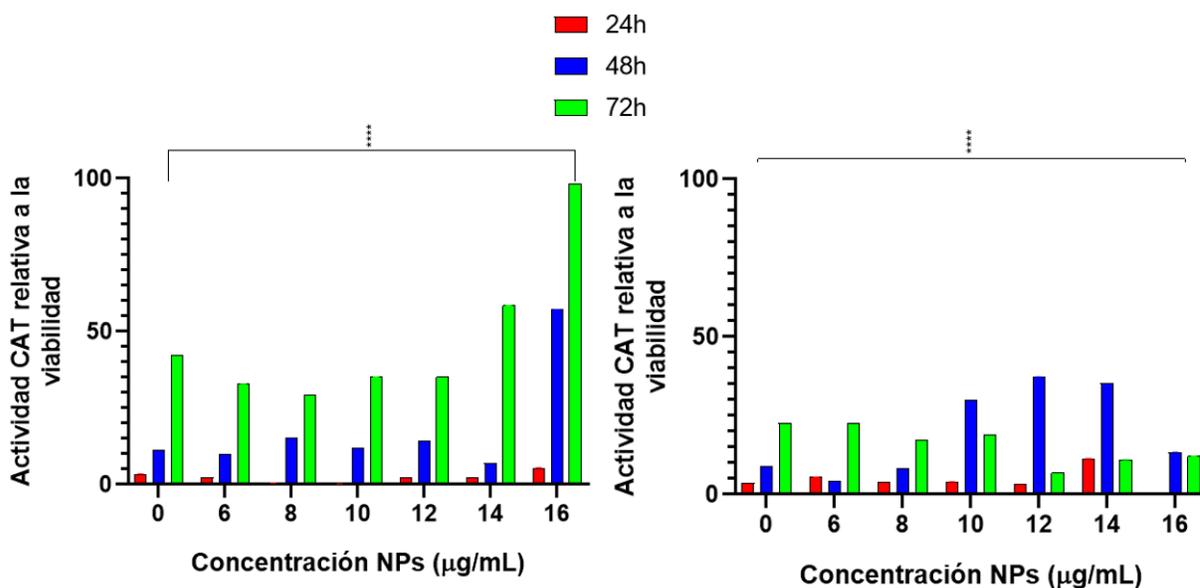


Figura 17. Actividad de la enzima CAT en los hepatocitos AML-12 expuestos durante 24h, 48h y 72h a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo (a) y en suspensión (b). Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de cada concentración por triplicado. Se realizó ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representa * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

Capítulo 4. Discusión

4.1 Propiedades fisicoquímicas de las NPsZnO

El plasmón de superficie es un fenómeno óptico que sucede cuando los electrones libres oscilan colectivamente en la superficie del metal cuando entra en resonancia con la frecuencia de los fotones incidentes. Esta resonancia es una consecuencia del pequeño tamaño de las nanopartículas ya que sucede cuando éste es mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente (Cruz et al., 2012).

La absorción máxima de ambas presentaciones de NPsZnO fue de 360 nm, lo cual coincide con los resultados previamente reportados por Wu et al., 2018; Fageria et al., 2014; Tomaev et al., 2019; Ghorbani et al., 2015; Chaurasia et al., 2010 y Bajpai et al., 2016, quienes describen la aparición del pico de absorbancia a 360 nm y lo relacionan con la formación de NPsZnO en una solución coloidal. La absorbancia a esta longitud de onda corresponde a la banda prohibida de 3.42eV característico de las NPsZnO reportado en la literatura (Chaurasia et al., 2010; Srikant & Clarke, 1998). Estos datos confirman que efectivamente ambas NPs comerciales si son a base de ZnO.

La estabilidad de las NPs es un factor muy importante a considerar para la evaluación de su toxicidad y está relacionada con la resistencia de las NPs a formar agregados en un medio determinado. La medición del potencial Zeta se utiliza como un parámetro asociado a la estabilidad de las nanopartículas, e indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión (Hunter, 2013). Con base en esta información el potencial Zeta de las NPsZnO en polvo y suspensión fue de -22 mV y -24 mV, respectivamente lo cual indica que ambas presentaciones tienen una estabilidad mediana en una solución con agua y por tanto, suficiente repulsión entre sus nanopartículas.

El tamaño de las NPs es otro parámetro importante relacionado con su toxicidad (Pérez & Gozalo, 2010), por ello se realizó una medición mediante DLS del diámetro hidrodinámico y mediante TEM para determinar el tamaño de la partícula metálica. Con base en la intensidad de luz dispersada, las NPsZnO de ambas presentaciones tienen un diámetro hidrodinámico mayor a 200 nm. Pero es importante considerar que la intensidad es un parámetro que depende fuertemente del diámetro de las NPs, en donde las de mayor tamaño dispersarán mucho más la luz que las más pequeñas; por lo que este resultado tenderá a mostrar mayor señal si las nanopartículas son grandes. Para complementar este análisis, se obtuvo la distribución de tamaños de las NPs, que resultaron en 92 y 191 nm para las NPsZnO en suspensión y en polvo, respectivamente. Esta gráfica de distribuciones numéricas enfatizan las especies con el mayor

número de partículas, que suelen ser las más pequeñas (Composix, 2012), demostrando así, que la ultrasonificación aplicada a las muestras, en su mayoría logró desaglomerar a las nanopartículas.

Ya que la técnica de DLS sólo es capaz de medir el diámetro hidrodinámico de las NPs, fue necesario conocer el tamaño de la nanopartícula de óxido metálico sin las capas de disolvente. Por lo tanto, se optó por realizar un análisis a las NPs mediante la técnica TEM. De esta manera, las NPsZnO en suspensión y en polvo presentaron un tamaño promedio de 47 ± 11 nm y 82 ± 22 nm respectivamente, por lo que se demuestra que las NPsZnO en polvo son mas grandes que las presentadas en suspensión. Además de esto, el tamaño de las NPsZnO en polvo mostró mayor heterodispersión comparado con las NPsZnOd. Por otro lado, las NPsZnO de ambas preentaciones no demostraron tener diferencias morfológicas claras entre sí, presentando ambas una forma irregular

Es importante mencionar que ambas NPs lograron liberar iones al medio, sin diferencias entre las concentraciones utilizadas para ambas presentaciones. Sin embargo, esto puede explicarse debido a que la técnica colorimétrica utilizada para las mediciones de liberación de iones, no es tan sensible para detectar cambios tan pequeños en las concentraciones de iones zinc utilizadas en este trabajo.

4.2 Efecto de la incubación durante 24 horas con NPsZnO en polvo y suspensión en hepatocitos

Los hepatocitos expuestos durante 24 h a las NPsZnO en polvo, presentaron cambios morfológicos evidentes, como una disminución de tamaño y tendencia hacia una forma redondeada. Este efecto ha sido reportado en células epidérmicas humanas A431 expuestas a NPsZnO (Sharma et al., 2009). Mediante las micrografías de microscopía óptica, fue posible distinguir que los cambios en la morfología de los hepatocitos, era dependiente del incremento en la concentración de las NPsZnOp, esto puede indicar la pérdida de la estructura de la actina, la cual es la principal proteína del citoesqueleto de las células eucariotas responsable en su mayoría, de generar los cambios morfológicos, además participa en diversos procesos celulares y físicos como la adhesión, migración y división celular. En apoyo a esta idea, se ha reportado que las NPsZnO tiene la capacidad de inducir la despolimerización y degradación de la actina (Pati et al., 2016). Además, utilizando la técnica de citometría de flujo, se pudo determinar que la complejidad celular de los hepatocitos incubados durante 24 h con las diferentes concentraciones de

NPsZnOp, era distinta al de las células sin NPs, esto podría deberse a un proceso de internalización celular de las NPs, y evidentemente a los cambios en la membrana plasmática de los hepatocitos.

Por otro lado, las NPsZnO en polvo demostraron disminuir la viabilidad de los hepatocitos de una forma dependiente de la concentración. Sin embargo, es importante destacar que en la concentración más baja (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) las NPsZnOp indujeron un efecto proliferativo, esto ya ha sido reportado con anterioridad como un fenómeno adaptativo para el caso de concentraciones pequeñas de NPs metálicas, conocido como hormesis, el cual se caracteriza por una estimulación de la viabilidad celular a concentraciones bajas de estresores (Iavicoli et al., 2010).

Uno de los principales mecanismos de citotoxicidad inducido por las NPs, es el estrés oxidante. En este trabajo, se encontró una clara relación entre la disminución de la viabilidad y el aumento en la producción de ROS, lo que parece indicar que las ROS pueden desencadenar los procesos de citotoxicidad en las células hepáticas que han sido expuestas a las NPsZnOp.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue evidenciar si existía un cambio en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante celular. En ese sentido, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT no aumentaron en los hepatocitos que fueron incubados con las diferentes concentraciones de NPsZnOp. Aún a pesar de que en algunos casos la disminución de la viabilidad celular era evidente, ésta no inducía un aumento en la producción de ROS, pareciera ser que los mecanismos para incrementar la actividad de la SOD se encuentran inhibidos de alguna manera, y además existe una afectación en el funcionamiento normal de la CAT. Se ha reportado el deterioro del sistema antioxidante a través del desarrollo del estrés oxidativo con las NPsZnO (Attia et al., 2018). Ésta afectación tal vez se relacione con la interrupción de la activación de la proteína Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2) que regula positivamente la expresión de genes antioxidantes (Zhang et al., 2008). Sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre la expresión de genes relacionados con el sistema antioxidante celular para corroborar esta hipótesis.

En el caso de las NPsZnO en suspensión, éstas lograron alterar la morfología celular de los hepatocitos de una forma similar a como lo hicieron las NPsZnO en polvo. Por lo que los cambios morfológicos ocasionados pueden fundamentarse también en la despolimerización y degradación de la actina. Sin embargo, a diferencia de las NPsZnOp, las NPsZnOd parecen no internalizarse en los hepatocitos, ya que su exposición no logró cambiar la complejidad celular. Así que estos efectos morfológicos aparentemente similares entre ambas NPs posiblemente se deban a mecanismos independientes de la internalización de

las NPsZnO. Además de afectar la morfología celular, las NPsZnOd lograron disminuir la viabilidad de los hepatocitos de una manera dependiente de su concentración.

Para demostrar si la citotoxicidad de las NPsZnOd reflejadas en los cambios morfológicos y la disminución en la viabilidad, estaban relacionados con el daño oxidativo, se evaluaron los niveles de ROS producidos por las células expuestas a NPsZnOd. De esta manera se demostró que las NPsZnOd son capaces de inducir la sobreproducción de ROS intracelulares, y a su vez este efecto se asoció con la disminución en la viabilidad celular, insinuando que las células podrían estar sufriendo daños a causa de haber alcanzado un estado de estrés oxidativo por superar el límite del control homeostático. Se ha demostrado en otro estudio que las NPsZnO pueden inducir la producción de ROS en los hepatocitos (Filippi et al., 2015).

El estrés oxidativo depende del desbalance entre la producción de ROS y la actividad antioxidante. La alteración en alguno de estos dos parámetros puede repercutir directamente en la inducción de estrés oxidativo en las células. Por ello, en conjunto con la producción de ROS es importante evaluar la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y CAT.

La actividad de la enzima SOD de los hepatocitos expuestos por 24 h a NPsZnOd aumentó, aunque no de forma dependiente de la concentración. Se presentó mayor actividad SOD en las células que sobreprodujeron ROS, por lo que su sobreactivación puede ser una respuesta a los niveles de ROS intracelulares inducidos por las NPsZnOd. Por otro lado, la actividad CAT presentó un aumento ligero en las células que produjeron altos niveles de ROS, por lo que también puede reflejar una lucha activa contra los ROS, aunque de forma moderada.

4.3 Efecto de la incubación durante 48 horas con NPsZnO en polvo y suspensión en hepatocitos

La exposición de hepatocitos a NPsZnOp durante 48 h logró afectar la viabilidad celular de una forma dependiente de la concentración. No hay evidencia clara de que el efecto citotóxico generado por la exposición a NPsZnOp durante 48h, sea distinta a la observada en las primeras 24 h de exposición, por lo que se puede sugerir un efecto tóxico similar. Es importante destacar que no se realizaron exposiciones repetidas de NPs, sino que fue una única exposición para todos los tiempos considerados. Por lo tanto, lo que se está estimando con la medición de la viabilidad celular en los tiempos de exposición posteriores a

las 24 h, es esencialmente si la NP tiene efectos tóxicos irreversibles o si la célula tiene la capacidad para recuperarse del daño tóxico (Giannuzzi et al., 2018). Por este motivo, tiene sentido que el efecto citotóxico generado por las NPsZnOp no haya aumentado a las 48 h respecto a las 24 h, e indica que el daño celular se mantiene debido ya sea a un efecto tóxico irreversible o a la incapacidad celular para sobreponerse al daño.

La producción de ROS puede ser un factor clave en el grado de toxicidad inducido por la NP y de la capacidad de recuperación de la célula. Después de 48 h de exposición a las NPsZnOp, la producción de ROS en los hepatocitos disminuyó respecto a los generados en 24 h exceptuando en la concentración más alta (16 µg/mL) en donde es probable que los ROS pueden ser los que provoquen el efecto citotóxico observado.

La actividad antioxidante de los hepatocitos incubados con las NPsZnOp durante 48 horas, deja de tener una inhibición generalizada, por ejemplo, la actividad SOD aumenta en las concentraciones donde se presentó una sobreproducción de ROS a las 24 h. Parece ser que la enzima SOD, responde tiempo después de que el estrés oxidativo entre en acción, de manera que los ROS funcionen como un modulador de su actividad con un efecto retardado. Esto sucede también para la actividad de la enzima CAT. Se ha reportado que a concentraciones crecientes de estresores oxidativos, existe una activación jerárquica de diferentes tipos de vías de señalización y respuestas celulares, por ejemplo, las exposiciones de las células a bajas concentraciones de los estresores, activan la fase citotóxica de nivel I, donde las células mantienen sus funciones normales sin alteraciones significativas, pero cuando ese umbral se sobrepasa, se activa la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 al inducir la fase II y las enzimas antioxidantes como una respuesta adaptativa con el tiempo (Xiao et al., 2003).

Por otro lado, las células expuestas a las NPsZnO en suspensión también mantuvieron los mismos efectos en su viabilidad respecto a las 24 h denotando una toxicidad conservada. La producción de ROS intracelulares durante 48 h de exposición a NPsZnOd, también se mantuvo e inclusive, para algunas concentraciones disminuyó respecto a las 24 h. Estos datos parecen indicar un combate activo contra el estresor o un mecanismo de supervivencia celular para evitar que haya más daño. Tal vez ambas ideas convergen en el sistema antioxidante, el cual, específicamente por las enzimas SOD y CAT, se sobreactivó en los hepatocitos después de 48 h de exponerse a ZnOd. En este tiempo de exposición, la actividad SOD y CAT de las células aumentaron incluso más que en las primeras 24 h, aún a pesar de que durante las primeras 24 h, se presentó una sobreproducción de ROS. Esto sugiere que la respuesta de la actividad antioxidante no es inmediata, y que posiblemente los ROS pueden modular la actividad SOD y CAT de

forma retardada. Esto es congruente con la literatura que señala que los sistemas de respuesta al estrés oxidativo se activan de forma gradual (Santa-González & Camargo, 2016). El efecto modulador que pueden tener los ROS hacia el sistema antioxidante se explica ya que normalmente el aumento de ROS implica la activación de vías de señalización intracelulares, que a su vez, regulan cambios transcripcionales que permiten a la célula activar la expresión de varios genes que codifican proteínas antioxidantes (Bar-Shai et al., 2008).

4.4 Efecto de la incubación durante 72 horas con NPsZnO en polvo y suspensión en hepatocitos

La viabilidad de los hepatocitos que han sido incubados durante 72 h con las diferentes concentraciones de NPsZnOp, logra recuperarse casi al mismo nivel que en las células control sin tratamiento con NPs. Excepto en las concentraciones de 14 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que son claramente citotóxicas. Las células expuestas a estas concentraciones citotóxicas de NPsZnOp también presentaron sobreproducción de ROS, por lo que los efectos en la viabilidad de los hepatocitos pueden ser generados por el daño oxidativo. Dependiendo del tiempo de exposición a las NPs y del tipo de célula con el que se trabaje, las respuestas celulares pueden ser mínimas, de tal manera que se permita que la célula pueda recuperarse mediante la activación de respuestas adaptativas, o bien, que si el efecto es grave, conlleve por lo tanto a una alteración irreversible de la estructura y función celular, así como la muerte celular (Bakand & Hayes, 2016). Este último proceso dentro del modelo jerárquico de respuesta al estrés oxidativo es considerado como una respuesta de nivel 3 (Xiao et al., 2003), las cuales se caracterizan por la activación de las vías apoptóticas, como es el caso de las dos concentraciones más altas de las NPs utilizadas en este trabajo.

Se demostró también que en las concentraciones donde las NPsZnOp fueron tóxicas a 72 h, la actividad SOD y CAT aumentó significativamente, por lo que aún prevalece un esfuerzo activo de las células por neutralizar los niveles de ROS, sin embargo, no es suficiente para mitigarlos. La actividad SOD y CAT en las células donde ocurrió la recuperación de la viabilidad, se mantuvo similar al control, debido a que no había una sobreproducción de ROS. La recuperación de la viabilidad y la disminución en los niveles de ROS de los hepatocitos a 72 h de exposición a las NPsZnOp, están relacionados con la alta actividad SOD y CAT que ocurrió previamente a las 48 h. Parece ser que, en estos casos, las enzimas SOD y CAT lograron minimizar los daños oxidativos ocasionados por las NPsZnOp, y con esto evitar efectos citotóxicos irreversibles. Además, posiblemente la eliminación gradual de ROS dio un margen para que las células pudieran

sobreponerse al daño oxidativo. En apoyo a esta hipótesis se sabe que los altos niveles de ROS, pueden activar la codificación de proteínas de reparación del ADN, chaperonas y proteínas anti-apoptóticas (Bar-Shai et al., 2008). Harían falta más estudios para conocer los mecanismos por los cuales las células recuperan su viabilidad, así como también evaluar si existe alguna alteración en las funciones celulares de los hepatocitos que lograron revertir el efecto citotóxico y oxidante.

La viabilidad de los hepatocitos expuestos a las NPsZnOd durante 72 h, no es afectada, por el contrario, sorpresivamente ocurre una recuperación de su viabilidad, y en el caso de las últimas concentraciones (14 y 16 $\mu\text{g/mL}$) llegan a ser significativamente mayores que el control. La recuperación de la viabilidad celular y de los daños ocasionados por NPs de oro en fibroblastos dérmicos humanos a través del tiempo ya ha sido reportado con anterioridad (Mironava et al., 2010).

A las 72h de haber expuesto a las células a las NPsZnOd, los hepatocitos presentaron niveles de ROS similares al control. La ausencia de una sobreproducción de ROS junto a la alta actividad SOD y CAT presentada a las 48 h, indica que el sistema antioxidante celular logró contrarrestar la generación de ROS inducidas por las NPsZnOd. Aunado a esto, la actividad SOD y CAT se mantuvo similar al control, reflejando la restauración de un estado celular con un balance redox equilibrado como consecuencia del combate antioxidante a las 48h. Normalmente los estresores sub-tóxicos inician cambios adaptativos en las células que la preparan para futuros ataques (Milisav et al., 2012). Para futuras investigaciones se podría evaluar si en este caso los hepatocitos recuperados son menos susceptibles a las NPsZnOd.

En las concentraciones más altas de NPsZnOd, donde las células expuestas pasaron de presentar un efecto tóxico a las 24 h y 48 h, a tener una viabilidad que supera al control a las 72 h, puede estar sucediendo un efecto hormético dentro de un contexto temporal. En este caso ocurre una respuesta de sobrecompensación modesta después de una interrupción inicial en la homeostasis, es decir, un tipo de efecto de rebote (Iavicoli et al., 2010). Posiblemente los cambios adaptativos sufridos durante el estado estresado causaron cambios horméticos que repercutieron en la viabilidad celular.

4.5 Comparación entre los efectos de las NPsZnO en polvo y suspensión.

A pesar de que ambas NPs de ZnO presentaron diferentes tamaños, ambas fueron capaces de liberar iones zinc al medio sin diferencias significativas entre éstos ni entre sus concentraciones. Se ha reportado que

el tamaño de las nanopartículas está directamente relacionado con su solubilidad (Mudunkotuwa et al., 2012), pero, en este trabajo, todas las concentraciones utilizadas para ambas NPs superan el límite de solubilidad. Los iones liberados evidentemente, son un factor causal del efecto citotóxico, pero no es el único, ya que la disminución de la viabilidad celular no es dependiente de la cantidad de iones liberados al medio.

Las NPsZnOd no consiguieron cambiar la complejidad celular de los hepatocitos, en cambio las NpsZnO en la presentación de polvo sí, por lo que este cambio puede originarse principalmente por procesos de internalización de las NPs. Cuando las NPs se internalizan, el tamaño de las células no suelen cambiar (Wu et al., 2019), pero sí lo hace la complejidad celular, que es el caso de los resultados obtenidos en este trabajo. Por lo tanto, según parece, las NPsZnOp sí logran internalizarse en los hepatocitos, mientras que las NPsZnOd no se internalizan. La forma en la que las NPsZnOp ingresan a la célula puede ser por medio de caveolas, las cuales una vez dentro se fusionan con los lisosomas (Xia et al., 2008), sin embargo para corroborar esta hipótesis faltarían más estudios sobre los procesos de internalización celular.

Los dos tipos de presentaciones de NPsZnO, afectan la morfología y la viabilidad de las células, principalmente por medio de la alteración de la homeostasis del zinc por los iones liberados. Los cuales son capaces de provocar daño lisosómico, mitocondrial y elevar la producción de ROS (Xia et al., 2008). La cantidad de ROS que indujeron las NPsZnOp en los hepatocitos, fue significativamente mayor a las producidas por las células expuestas a las NPsZnOd. Se ha reportado que existe una asociación entre la alteración de la homeostasis del zinc con la disminución de la viabilidad celular, estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Osmond & Mccall, 2010). El hecho de que las NpsZnO en polvo induzcan una mayor producción de ROS que las NPsZnO en suspensión, puede relacionarse a que las NPsZnO en polvo, si logran ingresar al citoplasma de las células; una vez dentro, pueden disolverse en el citosol o en los lisosomas y elevar el contenido de Zn^{2+} intracelular que a su vez desestabiliza la mitocondria y contribuyen así a la sobreproducción de ROS (Pandurangan & Kim, 2015). Las NPsZnO internalizadas pueden también aumentar la producción de ROS por su propiedad semiconductor. Se ha reportado que los electrones de las NPsZnO pueden excitarse de la banda de valencia hasta la banda de conducción sin un estímulo externo debido a cambios estructurales propios de la dimensión nanométrica o debido al potencial de oxidación de la solución celular (Canta & Cauda, 2020). De esta manera, el electrón de la banda de conducción y el hueco de la banda de valencia, pueden reaccionar con el oxígeno y los iones hidroxilo respectivamente, para formar el anión superóxido y los radicales hidroxilos (Sharma et al., 2012). Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar si la mayor producción de ROS está relacionada con la internalización de las

NPs y si el mecanismo es por medio de la disolución intracelular de las NPsZnO o por su propiedad semiconductor.

Las principales diferencias entre los efectos causados por las dos presentaciones de NPsZnO: en polvo y suspendidas, es que con las de polvo las células producen una mayor cantidad de ROS, se inactiva el sistema antioxidante y su viabilidad es afectada con el tiempo. Hasta donde podemos decir, estas diferencias pueden estar relacionadas con que las NPsZnOp se internalicen o por que ocasionen un daño físico causado por la sedimentación sobre la membrana plasmática de los hepatocitos.

En ese sentido, es necesario hacer más estudios para investigar si la sedimentación de las NPs sobre la membrana plasmática influye en su capacidad de inducir toxicidad celular; y si las diferentes presentaciones de las NPs pueden inducir respuestas celulares distintas.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, parece ser que las NPsZnOp internalizadas o su interacción sobre la membrana celular son capaces de incrementar la cantidad intracelular de ROS, afectando el funcionamiento de las enzimas antioxidantes y disminuyendo la resistencia de los hepatocitos al estrés oxidante y los ROS.

En general, la viabilidad celular de los hepatocitos varía entre las mismas concentraciones y tiempos de exposición para ambas presentaciones de NPsZnO, por lo que pareciera que sí existe una respuesta celular diferencial para cada uno de los tipos de presentaciones: polvo y suspensión que se estudiaron en este trabajo. Se ha demostrado que los distintos métodos de preparación e inclusive, los procedimientos similares que producen NPsZnO con diferencias de tamaño y forma, pueden llegar a afectar drásticamente su respuesta biológica (Garino et al., 2019). Al parecer el perfil de actividad antioxidante en exposiciones agudas influye en el grado de citotoxicidad a largo plazo. De esta manera, la alteración en el tiempo de la respuesta del sistema antioxidante puede ser un posible mecanismo de nanotoxicidad.

Capítulo 5. Conclusiones

1. Las NPsZnO en polvo presentaron un tamaño promedio mayor a las NPsZnO en suspensión
2. Durante las primeras 24 horas de exposición a las NPsZnO en polvo, la viabilidad celular de los hepatocitos disminuye como resultado de la alteración del sistema antioxidante. Existe una evidente sobreproducción de especies de oxígeno altamente reactivas y una disminución de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.
3. Ambas NPsZnO liberan iones Zn^{2+} al medio de cultivo que son un factor clave en el mecanismo de citotoxicidad al inducir la sobreproducción de especies de oxígeno altamente reactivas intracelulares.
4. Las NPsZnO en polvo se internalizan en los hepatocitos, mientras que las NPsZnO en suspensión no lo hacen. Esto puede ser la razón del efecto citotóxico de las NpsZnO en polvo, al desencadenar un incremento en la producción de especies de oxígeno altamente reactivas, ya sea debido a su disolución iónica intracelular o bien por su propiedad semiconductor.
5. Se observó un efecto hormético a largo plazo en los hepatocitos, que fue ocasionado por la incubación de las células durante 72 horas con las NPsZnO en suspensión, incrementando la viabilidad celular como respuesta a un estresor. En cambio, las NPsZnO en polvo fueron evidentemente más tóxicas a lo largo del tiempo.
6. El efecto hormético causado por las NPsZnO en suspensión, puede estar relacionado a la elevada actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa que los hepatocitos presentan a las 48 horas de exposición a las NpsZnOd

Literatura citada

- Afifi, M., & Abdelazim, A. M. (2015). Ameliorative effect of zinc oxide and silver nanoparticles on antioxidant system in the brain of diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(10), 874–877. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.06.010>
- Ahamed, M., Akhtar, M. J., Alaizeri, Z. A. M., & Alhadlaq, H. A. (2020). TiO₂ nanoparticles potentiated the cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis response of cadmium in two different human cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 10425–10435. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07130-6>
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S. M., & Rowe, J. J. (2010). Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(3), 263–269.
- Ahamed, M., Siddiqui, M. A., Akhtar, M. J., Ahmad, I., Pant, A. B., & Alhadlaq, H. A. (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), 578–583. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.156>
- Aitken, R. J., Chaudhry, M. Q., Boxall, A. B. A., & Hull, M. (2006). Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine*, 56(5), 300–306. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql051>
- Akhtar, M. J., Ahamed, M., Kumar, S., Majeed Khan, M. A., Ahmad, J., & Alrokayan, S. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 845–857. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29129>
- Alarifi, S., Ali, D., Verma, A., Alakhtani, S., & Ali, B. A. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. *International Journal of Toxicology*, 32(4), 296–307.
- Ali, A., Phull, A.-R., & Zia, M. (2018). Elemental zinc to zinc nanoparticles: Is ZnO NPs crucial for life? Synthesis, toxicological, and environmental concerns. *Nanotechnology Reviews*, 7(5), 413–441.
- Almeida, J. P. M., Chen, A. L., Foster, A., & Drezek, R. (2011). In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*, 6(5), 815–835.
- Anreddy, R. N. R. (2018). Copper oxide nanoparticles induces oxidative stress and liver toxicity in rats following oral exposure. *Toxicology Reports*, 5, 903–904. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.022>
- Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407(4), 1461–1468.4
- Attia, H., Nounou, H., & Shalaby, M. (2018). Zinc oxide nanoparticles induced oxidative DNA damage, inflammation and apoptosis in rat's brain after oral exposure. *Toxics*, 6(2), 29
- Azeez, H. H., Barzinjy, A. A., & Hamad, S. M. (2020). Structure, synthesis and applications of ZnO nanoparticles: A review. *Jordan Journal of Physics*, 13(2), 123–135. <https://doi.org/10.47011/13.2.4>
- Bajpai, S. K., Jadaun, M., & Tiwari, S. (2016). Synthesis, characterization and antimicrobial applications of zinc oxide nanoparticles loaded gum acacia/poly (SA) hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 153, 60–65.

- Bakand, S., & Hayes, A. (2016). Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 929.
- Bar-Shai, M., Carmeli, E., Ljubuncic, P., & Reznick, A. Z. (2008). Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF- κ B activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 202–214.
- Benamor, M., Belhamel, K., & Draa, M. T. (2000). Use of xylenol orange and cetylpyridinium chloride in rapid spectrophotometric determination of zinc in pharmaceutical products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23(6), 1033–1038.
- Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., & 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.
- Canli, E. G., Ila, H. B., & Canli, M. (2019). Response of the antioxidant enzymes of rats following oral administration of metal-oxide nanoparticles (Al₂O₃, CuO, TiO₂). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 938–945. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3592-8>
- Canta, M., & Cauda, V. (2020). The investigation of the parameters affecting the ZnO nanoparticle cytotoxicity behaviour: A tutorial review. *Biomaterials Science*, 8(22), 6157–6174.
- Chaurasia, V., Chand, N., & Bajpai, S. K. (2010). Water sorption properties and antimicrobial action of zinc oxide nanoparticles-loaded cellulose acetate films. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 47(4), 309–317.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., & Gibson, S. B. (2008). Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death & Differentiation*, 15(1), 171–182.
- Chibber, S., Ansari, S. A., & Satar, R. (2013). New vision to CuO, ZnO, and TiO₂ nanoparticles: Their outcome and effects. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1492-x>
- Choi, O., & Hu, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*, 42(12), 4583–4588.
- Commission, E. (2011). Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. Off. J. Eur. Union, 275, 38
- Composix, N. (2012). Nano Composix's Guide To Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis. NanoComposix, San Diego, Calif, USA.
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67–78.
- Dayem, A. A., Hossain, M. K., Lee, S. Bin, Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. 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), 1–21.
- Díaz, O. A., & Alvarez, E. (2004). Determinación de cinc a microescala en un medicamento específico. *Química Nova*, 27(5), 829–831.

- Du, J., Fu, L., Li, H., Xu, S., Zhou, Q., & Tang, J. (2019). The potential hazards and ecotoxicity of CuO nanoparticles: an overview. *Toxin Reviews*, 9543. <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1670211>
- El-Trass, A., ElShamy, H., El-Mehasseb, I., & El-Kemary, M. (2012). CuO nanoparticles: synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258(7), 2997–3001.
- Fageria, P., Gangopadhyay, S., & Pande, S. (2014). Synthesis of ZnO/Au and ZnO/Ag nanoparticles and their photocatalytic application using UV and visible light. *RSC Advances*, 4(48), 24962–24972.
- Fahmy, B., & Cormier, S. A. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 23(7), 1365–1371. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.005>
- Fahmy, H. M., Ebrahim, N. M., & Gaber, M. H. (2020). In-vitro evaluation of copper/copper oxide nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity in normal and cancer lung cell lines. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 60(February), 126481.
- FDA, U. S., & Administration, F. and D. (2018). CFR-Code of Federal Regulations Title 21. US Food and Drug Administration: Washington, DC, USA.
- Filippi, C., Pryde, A., Cowan, P., Lee, T., Hayes, P., Donaldson, K., Plevris, J., & Stone, V. (2015). Toxicology of ZnO and TiO₂ nanoparticles on hepatocytes: impact on metabolism and bioenergetics. *Nanotoxicology*, 9(1), 126–134.
- Fu, X. (2015). Oxidative stress induced by CuO nanoparticles (CuO NPs) to human hepatocarcinoma (HepG2) cells. *Journal of Cancer Therapy*, 6(10), 889.
- Ganguly, P., Breen, A., & Pillai, S. C. (2018). Toxicity of Nanomaterials: Exposure, Pathways, Assessment, and Recent Advances [Review-article]. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(7), 2237–2275. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00068>
- Garino, N., Limongi, T., Dumontel, B., Canta, M., Racca, L., Laurenti, M., Castellino, M., Casu, A., Falqui, A., & Cauda, V. (2019). A microwave-assisted synthesis of zinc oxide nanocrystals finely tuned for biological applications. *Nanomaterials*, 9(2), 212.
- Gao, W., Xu, K., Ji, L., & Tang, B. (2011). Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicology Letters*, 205(1), 86–95.
- Ghorbani, H. R., Mehr, F. P., Pazoki, H., & Rahmani, B. M. (2015). Synthesis of ZnO nanoparticles by precipitation method. *Oriental Journal of Chemistry*, 31(2), 1219–1221.
- Giannuzzi, L., Ortega, F., & Ventosi, E. G. (2018). Principios generales de la toxicología.
- Girigoswami, K. (2018). Toxicity of metal oxide nanoparticles. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1048, 99–122.
- Goddard III, W. A., Brenner, D., Lyshevski, S. E., & Iafrate, G. J. (2007). Handbook of nanoscience, engineering, and technology. CRC press.
- Gunawan, C., Teoh, W. Y., Marquis, C. P., & Amal, R. (2011). Cytotoxic origin of copper (II) oxide nanoparticles: comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts. *ACS Nano*, 5(9), 7214–7225.

- Gutiérrez, L., Stepien, G., Gutiérrez, L., Pérez-Hernández, M., Pardo, J., Pardo, J., Grazú, V., & de la Fuente, J. M. (2017). 1.09 - Nanotechnology in Drug Discovery and Development (S. Chackalamannil, D. Rotella, & S. E. B. T.-C. M. C. I. I. I. Ward (eds.); pp. 264–295). Elsevier
- Hunter, R. J. (2013). Zeta potential in colloid science: principles and applications (Vol. 2). Academic press
- Ivask, A., Bondarenko, O., Jepihhina, N., & Kahru, A. (2010). Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO₂, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: differentiating the impact of particles and solubilised metals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 701–716.
- Jeng, H. A., & Swanson, J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 41(12), 2699–2711.
- Jing, X., Park, J. H., Peters, T. M., & Thorne, P. S. (2015). Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air–liquid interface compared with in vivo assessment. *Toxicology in Vitro*, 29(3), 502–511.
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Moller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), 1726–1732.
- Khan, H. A., Abdelhalim, M. A. K., Al-Ayed, M. S., & Alhomida, A. S. (2012). Effect of gold nanoparticles on glutathione and malondialdehyde levels in liver, lung and heart of rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(4), 461–464.
- Klaessig, F., Marrapese, M., & Abe, S. (2011). Current perspectives in nanotechnology terminology and nomenclature. In *Nanotechnology Standards* (pp. 21–52). Springer.
- Kolahalam, L. A., Kasi Viswanath, I. V., Diwakar, B. S., Govindh, B., Reddy, V., & Murthy, Y. L. N. (2019). Review on nanomaterials: Synthesis and applications. *Materials Today: Proceedings*, 18(August), 2182–2190. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.371>
- Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marechal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G., & Hoet, P. (2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), 14.
- Iavicoli, I., Calabrese, E. J., & Nascarella, M. A. (2010). Exposure to nanoparticles and hormesis. *Dose-Response*, 8(4), dose-response.
- Liu, H., Ma, L., Liu, J., Zhao, J., Yan, J., & Hong, F. (2010). Toxicity of nano-anatase TiO₂ to mice: liver injury, oxidative stress. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92(1), 175–186.
- Ma, H., Williams, P. L., & Diamond, S. A. (2013). Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles—a review. *Environmental Pollution*, 172, 76–85.
- Milani, N., & McLaughlin, M. J. (2011). Zinc oxide nanoparticles in the soil environment: dissolution, speciation, retention and bioavailability. Soil Science Group, School of Agriculture, Food & Wine, Doctor of(December), 164.

- Milisav, I., Poljsak, B., & Šuput, D. (2012). Adaptive response, evidence of cross-resistance and its potential clinical use. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 10771–10806.
- Min, J. Y., Lim, S.-O., & Jung, G. (2010). Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Letters*, 584(11), 2427–2432.
- Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V., & Rafailovich, M. H. (2010). Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, 4(1), 120–137.
- Mirzaei, H., & Darroudi, M. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications. *Ceramics International*, 43(1), 907–914.
- Mishra, P. K., Mishra, H., Ekielski, A., Talegaonkar, S., & Vaidya, B. (2017). Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 22(12), 1825–1834. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.006>
- Mortezaee, K., Najafi, M., Samadian, H., Barabadi, H., Azarnezhad, A., & Ahmadi, A. (2019). Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: A comprehensive review. *Chemico-Biological Interactions*, 312(June), 108814.
- Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T., Wu, C.-M., & Grassian, V. H. (2012). Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir*, 28(1), 396–403.
- Muthuraman, P., Ramkumar, K., & Kim, D. H. (2014). Analysis of Dose-Dependent Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activity in Adipocytes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(8), 2851–2863.
- Nanotech Magazine, 2014. Nano zinc oxide profiles of some of the leading zinc oxide nanopowders producers. <http://www.nanotechmag.com/wp-content/uploads/2014/09/Issue-10-Nanotech-zno-4-pages.pdf>.
- Naz, S., Gul, A., & Zia, M. (2020). Toxicity of copper oxide nanoparticles: A review study. *IET Nanobiotechnology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2019.0176>
- Niska, K., Pyszka, K., Tukaj, C., Wozniak, M., Radomski, M. W., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2015). Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter the antioxidant system in human osteoblast cells. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1095–1107. <https://doi.org/10.2147/IJN.S73557>
- Ognik, K., Cholewińska, E., Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., Tutaj, K., & Szlązak, R. (2019). The effect of copper nanoparticles and copper (II) salt on redox reactions and epigenetic changes in a rat model. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(2), 675–686. <https://doi.org/10.1111/jpn.13025>
- Osman, I. F., Baumgartner, A., Cemeli, E., Fletcher, J. N., & Anderson, D. (2010). Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells. *Nanomedicine*, 5(8), 1193–1203.
- Osmond, M. J., & Mccall, M. J. (2010). Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology*, 4(1), 15–41.
- Pandurangan, M., & Kim, D. H. (2015). In vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles: a review. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(3). <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2958-9>

- Park, S., Lee, Y. K., Jung, M., Kim, K. H., Chung, N., Ahn, E.-K., Lim, Y., & Lee, K.-H. (2007). Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhalation Toxicology*, *19*(sup1), 59–65.
- Pati, R., Das, I., Mehta, R. K., Sahu, R., & Sonawane, A. (2016). Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. *Toxicological Sciences*, *150*(2), 454–472
- Pérez, V. G., & Gozalo, C. T. (2010). Toxicología de las nanopartículas. *Seguridad y Salud En El Trabajo*, *56*, 6–12.
- Pujalté, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Tréguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtès, C., & l'Azou, B. (2011). Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and Fibre Toxicology*, *8*(1), 10.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual* [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Sabir, S., Arshad, M., & Chaudhari, S. K. (2014). Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: Synthesis and applications. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/925494>
- Santa-González, G. A., & Camargo, M. (2016). Protección celular antioxidante y respuesta adaptativa inducida por estímulos oxidativos crónicos. *Actualidades Biológicas*, *38*(104), 71–80
- Sharma, V., Shukla, R. K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., & Dhawan, A. (2009). DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*, *185*(3), 211–218.
- Sharma, V., Singh, P., Pandey, A. K., & Dhawan, A. (2012). Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *745*(1–2), 84–91.
- Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., & Flora, S. J. S. (2014). Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug and Chemical Toxicology*, *37*(3), 336–347. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.866134>
- Singh, Z., & Kaur, N. (n.d.). *Toxicological aspects of titanium dioxide nanoparticles in relation to different organs*.
- Singh, A. V., Laux, P., Luch, A., Sudrik, C., Wiehr, S., Wild, A. M., Santomauro, G., Bill, J., & Sitti, M. (2019). Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *29*(5), 378–387. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1566425>
- Singh, S. (2019). Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *29*(4), 300–311. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1553221>
- Srikant, V., & Clarke, D. R. (1998). On the optical band gap of zinc oxide. *Journal of Applied Physics*, *83*(10), 5447–5451.
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, *574*(2), 193–203.

- Sun, T., Yan, Y., Zhao, Y., Guo, F., & Jiang, C. (2012). Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549 cells. *PLoS One*, 7(8).
- Sun, Z., Liao, T., & Kou, L. (2017). *Strategies for designing metal oxide nanostructures*. 60(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s40843-016-5117-0>
- Syama, S., Reshma, S. C., Sreekanth, P. J., Varma, H. K., & Mohanan, P. V. (2013). Effect of Zinc Oxide nanoparticles on cellular oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in mouse liver. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 95(3), 495–503.
- Tomaev, V. V., Polishchuk, V. A., Vartanyan, T. A., & Vasil'ev, E. A. (2019). Surface Plasmon Resonance in Zinc Nanoparticles. *Glass Physics and Chemistry*, 45(3), 238–241.
- Trotta, F., & Mele, A. (2019). *Nanomaterials: Cek. Nanosponges*, iv, 1–26.
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208.
- Vayssieres, L., Keis, K., Hagfeldt, A., & Lindquist, S.-E. (2001). Three-dimensional array of highly oriented crystalline ZnO microtubes. *Chemistry of Materials*, 13(12), 4395–4398.
- Wu, Y., Sun, X.-J., Jia, Y.-P., & Li, D.-B. (2018). Review of improved spectral response of ultraviolet photodetectors by surface plasmon. *Chinese Physics B*, 27(12), 126101.
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Madler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2(10), 2121–2134.
- Xiao, G. G., Wang, M., Li, N., Loo, J. A., & Nel, A. E. (2003). Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50781–50790.
- Yao, Y., Zang, Y., Qu, J., Tang, M., & Zhang, T. (2019). The toxicity of metallic nanoparticles on liver: The subcellular damages, mechanisms, and outcomes. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 8787–8804. <https://doi.org/10.2147/IJN.S212907>
- Yoganandham Suman, T., Li, W.-G., & Pei, D.-S. (2020). Toxicity of metal oxide nanoparticles. *Nanotoxicity*, 107–123. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819943-5.00005-1>
- Zhang, H. M., Cao, J., Tang, B. P., & Wang, Y. Q. (2014). Effect of TiO₂ nanoparticles on the structure and activity of catalase. *Chemico-Biological Interactions*, 219(June), 168–174.
- Zhang, Q., Pi, J., Woods, C. G., Jarabek, A. M., Clewell III, H. J., & Andersen, M. E. (2008). Hormesis and adaptive cellular control systems. *Dose-Response*, 6(2), dose-response.
- Zhang, Z.-Z., Xu, J.-J., Shi, Z.-J., Cheng, Y.-F., Ji, Z.-Q., Deng, R., & Jin, R.-C. (2017). Short-term impacts of Cu, CuO, ZnO and Ag nanoparticles (NPs) on anammox sludge: CuNPs make a difference. *Bioresource Technology*, 235, 281–291.

Anexos

Anexo 1.

- **Solución MTT**

Se agregaron 30 mg de reactivo MTT en 6 mL de agua milliQ. Se agitó hasta disolver y se almacenó a -4°C.

- **Cálculos para preparar stock de 1 mg/mL de NPsZnO en solución.**

Densidad de disolución= $msol + mas\ dis / Vfrasco$

%masa = $msol / msol + mdis$

Conc NP= $msol / Vfrasco$

Densidad de disolución: 1.7 g/mL

Vfrasco= 100 ml

%masa=20% de peso NPsZnO en agua.

Densidad de dis= $1.7g/mL = msol + mas\ dis / Vfrasco$

$msol + mas\ dis = (1.7\ g/ml)(100mL)$

$msol + mdis = 170\ g$

%masa = 20 % = $msol / msol + mdis \times 100$

$msol = (20\%)(170g) / 100$

$msol = 34\ g$

Conc NP= $msol / Vfrasco$

Conc NP= $34\ g / 100\ mL$

Conc NP= $0.34\ g/mL = 340\ mg/mL$

Para preparar stock de 1mg/mL en 9mL

$$C1 = 340 \text{ mg/mL } V1 = X$$

$$C2 = 1 \text{ mg/mL } V2 = 9 \text{ mL}$$

$$V1 = (1 \text{ mg})(9 \text{ mL}) / 340 \text{ mg/mL} = 0.02647 \text{ mL} = 26.47 \text{ uL del frasco de NPs}$$

- **Cálculos para preparar solución de DCFDA (25 μM)**

Concentración de saturación = 10 mg/ mL

Peso molecular = 485.27 g/mol

Para preparar sol. 25mM en 1 mL

Mol = g/pmV

$$0.025 = \text{g} / 485.27 / \text{mol} (0.001 \text{ L})$$

$$\text{g} = (0.025)(485.27)(0.001) = 0.01213 \text{ g} = 12.13 \text{ mg}$$

Para preparar sol 25 μM en 1 mL

$$C1 = 25 \text{ mM } V1 = X$$

$$C2 = 0.025 \text{ mM } V2 = \text{mL}$$

$$V1 = 0.025(1 \text{ mL}) / 25$$

$$V1 = 1 \times 10^{-3} \text{ mL} = 1 \mu\text{L}.$$

- **Medio de criopreservación**

Para preparar 30 mL de medio de criopreservación se utilizaron las siguientes proporciones V/V

DMEM 40%

DMSO 10%

SFB 50%

Que corresponden a 12 mL de DMEM, 3 mL de DMSO y 15 mL de SFB. La solución se alicuotó en 30 tubos de 1 mL y se almacenó a -4°C .

Anexo 2.

- **Curva estándar de H₂O₂**

Para realizar la curva estándar de H₂O₂ para el kit CAT-100 se agregaron los reactivos según la siguiente tabla:

Tabla 5. Cantidades utilizadas de cada reactivo para la curva estándar de H₂O₂

Volumen de 10mM H ₂ O ₂ (μL)	Buffer ensayo 1X (μL)	[H ₂ O ₂] (mM)
0	1000	0
125	875	0.0125
250	750	0.0250
500	500	0.05
750	250	0.075

Se transfirió 10 μL de cada alícuota a un segundo tubo y se añadió 990 μL de reactivo color. Se espero 15 minutos para el desarrollo del color y se leyó la absorbancia a 520 nm. Se graficó la [H₂O₂] vs absorbancia.

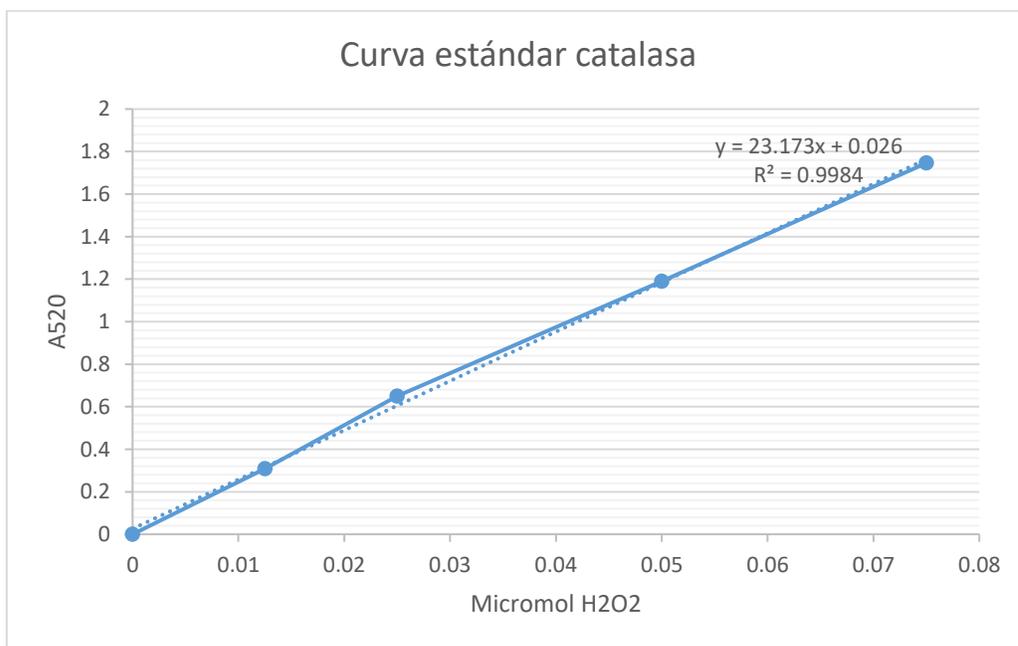


Figura 18. Curva estándar de la enzima catalasa.

- Fotografías de hepatocitos expuestos a NPsZnO por 24h.

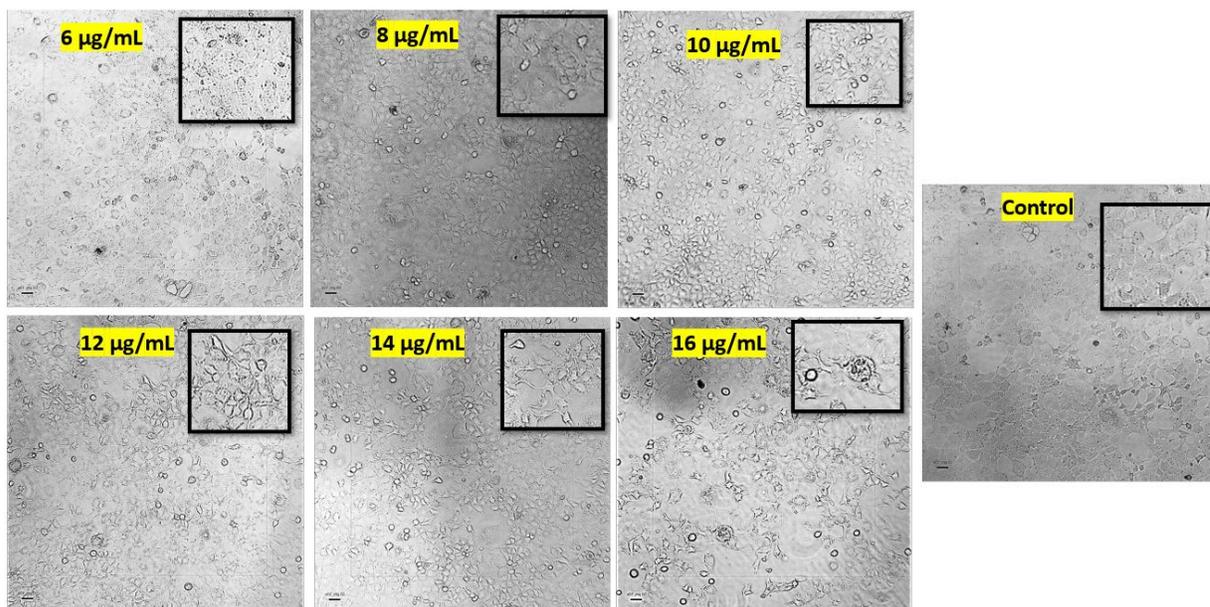


Figura 19. Fotografías de la línea celular AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO en polvo durante 24 h, comparados con el control sin NPs. Las fotos fueron tomadas con el software Lumaview720.

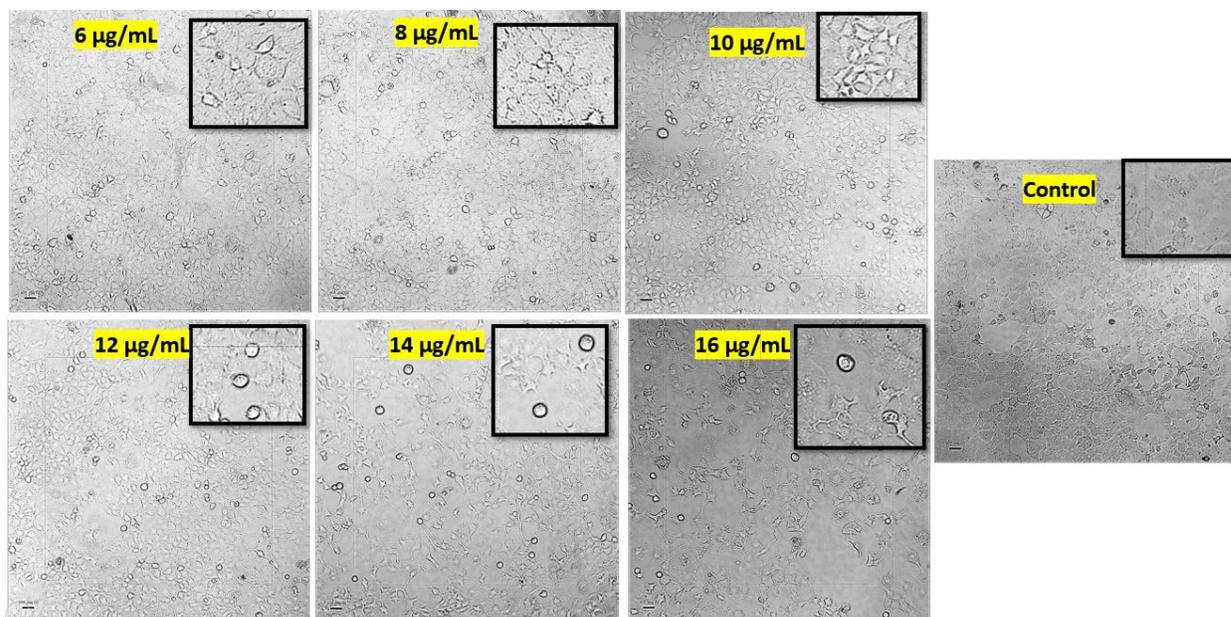


Figura 20. Fotografías de la línea celular AML-12 expuestos a diferentes concentraciones de NPsZnO suspendidas durante 24h, comparados con el control sin NPs. Las fotos fueron tomadas con el software Lumaview720.