

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



---

**Maestría en Ciencias en Nanociencias**

---

**Estudio *in vitro* de la respuesta celular e inmunotoxicidad de  
macrófagos expuestos subcrónicamente a nanopartículas de  
óxidos metálicos**

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

Presenta:

**Melissa Isabel Gutiérrez Araujo**

Ensenada, Baja California, México  
2021

Tesis defendida por

**Melissa Isabel Gutiérrez Araujo**

Y aprobada por el siguiente comité

---

**Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno**

Directora de tesis

Miembros del comité

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**

**Dra. Katrin Quester**

**Dr. Marco Antonio De León Nava**



---

**Dr. José Manuel Romo Herrera**

Coordinador de Posgrado en Nanociencias

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**

Director de Estudios de Posgrado

*Melissa Isabel Gutiérrez Araujo © 2021*

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

Resumen de la tesis que presenta **Melissa Isabel Gutiérrez Araujo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias

### **Estudio *in vitro* de la respuesta celular e inmunotoxicidad de macrófagos expuestos subcrónicamente a nanopartículas de óxidos metálicos**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno  
**Director de tesis**

Las nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs) han recibido especial atención en los últimos años en el área de la nanocosmética, y sus aplicaciones en el área de la nanomedicina continúan en exploración; Sin embargo, diversas evidencias indican que la exposición constante de algunos organismos a las ZnO-NPs puede provocar inmunotoxicidad. Por otro lado, las nanopartículas de CuO (CuO-NPs) han sido utilizadas en el área de la microelectrónica, y en distintos modelos biológicos se ha observado que la exposición a estas nanopartículas puede causar genotoxicidad. Múltiples investigaciones han demostrado que algunos nanomateriales tienen propiedades inmunomoduladoras que pueden derivar en la disfunción del sistema inmunológico, provocando inflamación. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la exposición subcrónica de ZnO-NPs y CuO-NPs a concentraciones subtóxicas en la línea celular de macrófagos RAW264.7, células con capacidad fagocítica que interactúan inicialmente con nanomateriales que ingresan al organismo y tienen funciones fundamentales para el adecuado funcionamiento del sistema inmunológico. Para cumplir con el objetivo, fue llevada a cabo la caracterización de las ZnO-NPs y CuO-NPs y el mantenimiento del cultivo de la línea celular de macrófagos RAW264.7. Posteriormente, fue estudiado el efecto de la exposición aguda y subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs en la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico y la morfología de los macrófagos por microscopía óptica, también fue determinada la concentración de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) a través de fluorimetría y nitritos mediante el ensayo de Griess. El efecto en el tamaño y la complejidad relativa de macrófagos expuestos subcrónicamente a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs fue evaluado por citometría de flujo; mientras que cambios en el potencial de membrana mitocondrial y en los niveles de iones  $Zn^{2+}$  fueron visualizados a través de microscopía confocal láser, y la expresión relativa de genes específicos fue evaluada mediante qPCR. La caracterización de ZnO-NPs y CuO-NPs sugiere un tamaño promedio superior al reportado por el proveedor, así como alta agregación. La exposición subcrónica a CuO-NPs causa citotoxicidad a bajas concentraciones (2-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), evidenciando su potencial inmunotóxico. La viabilidad celular de macrófagos expuestos a ZnO-NPs de forma aguda y subcrónica evidenció alteraciones en los niveles de ROS, respuesta hormética, así como formación de células gigantes multinucleadas de manera dependiente de las propiedades fisicoquímicas, la concentración de ZnO-NPs, así como del tiempo de exposición. No se observaron alteraciones en los niveles de nitritos en las células tratadas. Los resultados sugieren que la exposición a ZnO-NPs a concentraciones subtóxicas (2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) causa respuestas celulares en macrófagos entre las que se encuentran cambios en su tamaño, complejidad, capacidad fagocítica y potencial de membrana mitocondrial, niveles de iones  $Zn^{2+}$  y en la expresión de genes proinflamatorios y antiinflamatorios. Además, las respuestas celulares desencadenadas dependen tanto de la nanopartícula de ZnO como de la liberación lenta y prolongada de iones  $Zn^{2+}$ . En conclusión, la exposición subcrónica a CuO-NPs es inmunotóxica; mientras que la exposición subcrónica a ZnO-NPs desencadena respuestas celulares que conducen a la adaptación, y alteran las funciones de macrófagos.

**Palabras clave:** macrófagos, nanopartículas de ZnO, nanopartículas de CuO, exposición subcrónica, inmunotoxicidad, nanotoxicología.

Abstract of the thesis presented by **Melissa Isabel Gutiérrez Araujo** as a partial requirement to obtain the degree of Master of Science in Nanosciences

In vitro study of the cellular response and immunotoxicity of macrophages exposed subchronically to metal oxide nanoparticles

Summary approved by:

---

Dr. Karla Oyuky Juárez Moreno  
**Thesis director**

ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) have received special attention in recent years in the area of nanocosmetics, and their applications in the area of nanomedicine continue to be explored; However, various evidences indicate that constant exposure of some organisms to ZnO-NPs can cause immunotoxicity. On the other hand, CuO nanoparticles (CuO-NPs) have been used in the area of microelectronics, and in different biological models it has been observed that exposure to these nanoparticles can cause genotoxicity. Multiple investigations have shown that some nanomaterials have immunomodulatory properties that can lead to dysfunction of the immune system, causing inflammation. The objective of this study is to evaluate the effect of subchronic exposure of ZnO-NPs and CuO-NPs to subtoxic concentrations in the macrophage cell line RAW264.7, cells with phagocytic capacity that initially interact with nanomaterials that enter the organism and have functions essential for the proper functioning of the immune system. To cover the objective, the characterization of the ZnO-NPs and CuO-NPs, and the maintenance of the culture of the RAW264.7 macrophage cell line were carried out. Subsequently, the effects of acute and subchronic exposure to subtoxic concentrations of ZnO-NPs and CuO-NPs on cell proliferation was studied utilizing a colorimetric assay, on macrophages morphology by light microscopy, the concentration of species of highly reactive oxygen (ROS) through fluorimetry and on nitrites concentration through the Griess test were evaluated. The effect on the size and relative complexity of macrophages exposed subchronically to subtoxic concentrations of ZnO-NPs was also evaluated by flow cytometry; while changes in the mitochondrial membrane potential and the levels of Zn<sup>2+</sup> ions were visualized through confocal laser microscopy, and the relative expression of specific genes was evaluated by qPCR. The characterization of ZnO-NPs and CuO-NPs suggests an average size higher than that reported by the supplier, as well as high aggregation. Subchronic exposure to CuO-NPs causes cytotoxicity at low concentrations (2-8 µg/mL), evidencing its immunotoxic potential. The cellular viability of macrophages exposed to ZnO-NPs acutely and subchronically showed alterations in ROS levels, hormetic response, as well as the formation of multinucleated giant cells in a manner dependent on the physicochemical properties, the concentration of ZnO-NPs, and time. of exposition. No alterations were observed in nitrite levels were observed in the treated cells. The results suggest that exposure to ZnO-NPs at subtoxic concentrations (2, 3 and 4 µg/mL) causes cellular responses in macrophages, including changes in their size, complexity, phagocytic capacity and mitochondrial membrane potential, levels of Zn<sup>2+</sup> ions, and in the expression of pro-inflammatory genes and anti-inflammatories. Furthermore, the triggered cellular responses depend on both the ZnO nanoparticle and the slow release of Zn<sup>2+</sup> ions. In conclusion, subchronic exposure to CuO-NPs seems to be immunotoxic; while subchronic exposure to ZnO-NPs triggers cellular responses that lead to the macrophage adaptation, and alter the cell functions.

**Keywords:** macrophages, ZnO nanoparticles, CuO nanoparticles, subchronic exposure, immunotoxicity, nanotoxicology.

*Yo soy el zorro orejudo,  
Vivo en la incertidumbre.  
Si hay algo difícil,  
Si hay algo peligroso que hacer,  
eso es para mí.*

*Canción de guerrero sioux*

## Dedicatoria

---

*A mis padres, por su apoyo incondicional.*

*A Juan Carlos y Dulce Isabella, los amores de mi vida.*

## Agradecimientos

---

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM) y al Posgrado en Nanociencias por permitirme realizar mis estudios de posgrado y brindarme una formación académica de excelente calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para estudios de posgrado con número de becario 19274503, al proyecto de Cátedras CONACyT No. 53 “Nanotoxicología: evaluación toxicológica de los nanomateriales”, al proyecto CONACyT 269071 y al Sistema Nacional de Evaluación Toxicológica de Nanomateriales, SINANOTOX.

Al apoyo económico para la culminación de la parte experimental del proyecto de tesis obtenido por medio del FIDEICOMISO del CICESE cuenta 651107.

Al Departamento en Bionanotecnología del CNyN, por permitirme utilizar sus instalaciones, por brindarme su amistad y su apoyo a lo largo de esta etapa.

A la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su oficina desde el inicio de mi aventura científica, por tantos años compartiéndome su conocimiento, brindarme su paciencia, su cariño, por ser un ejemplo a seguir y mi mamá académica. La quiero mucho.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su apoyo constante e interés en mejorar este proyecto de tesis, es un gran maestro, lo admiro mucho.

A la Dra. Katrin Quester, por el apoyo técnico en el laboratorio, sus observaciones en los avances de tesis, y por brindarme su amistad.

Al Dr. Marco Antonio de León Nava, por ser un gran profesor y amigo, por compartir su conocimiento y pasión por la ciencia, y por sus aportaciones a este proyecto.

A la MC. Anaid, al Dr. Andres Zárate y al Dr. Diego Delgado por su apoyo técnico y en el análisis de datos, gracias por dedicarme su tiempo y compartirme su conocimiento.

A mis profesores y compañeros de posgrado, por todos los momentos y el conocimiento compartido.

A mis compañeros y amigos del Nanotox Lab Daniel, Daniela, Salma, Elizabeth, Gloria, Chuy y William, por el compañerismo, el cariño, por ser mi segunda familia.

A mis amigos del Departamento de Bionanotecnología Angy, Ivonne, Mauricio, Laura y Perlita, por el compañerismo y esas tardes de laboratorio.

A mis padres Minerva y Héctor Luis, por su amor y apoyo incondicional, por motivarme cada día, y también por los jalones de orejas, los amo.

A mis abuelos Isabel, Jaime y Héctor, por formar parte de mi vida, por su apoyo, por acompañarme en los desvelos y compartir cafecito, los amo.

A mis hermanos Oyuky y Daniel, y a mis tíos Jaime, Margarita y Faviola, por su cariño, confianza y apoyo, los quiero mucho.

A mis niños, Yuridia, Suelem, James y Grecia, por tantas alegrías desde su llegada, los adoro.

A mis amigas de toda la vida, Daniela y Teresa, por ser como mis hermanas y estar juntas a pesar de la distancia y las ocupaciones. Las quiero mucho.

A Juan Carlos, por compartir esta etapa y las que vengan, gracias por tanto amor y apoyo, eres el mejor compañero que podría tener, y somos un gran equipo. Te amo.

A Dulce Isabella, porque gracias a ti estoy viviendo una etapa más en mi vida, la maternidad. No sabía que podía amar tanto hasta que te sentí, y verte crecer es el mejor regalo de la vida. Te amo mi monster machine.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiv
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	5
1.1.1 Características generales de macrófagos.....	5
1.1.1.2 Línea celular de macrófagos RAW264.7.....	7
1.1.2 Reconocimiento e internalización celular de nanopartículas.....	8
1.1.3 Nanopartículas óxido metálicas.....	11
1.1.4 Efecto de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) en macrófagos y células del sistema inmunológico.....	12
1.1.5 Efecto de las nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) en macrófagos y células del sistema inmunológico.....	20
1.2 Justificación.....	23
1.3 Hipótesis.....	23
1.4 Objetivos.....	24
1.4.1 Objetivo general .....	24
1.4.2 Objetivos específicos.....	24
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>25</b>
2.1 Preparación de ZnO-NPs y CuO-NPs.....	25
2.2 Caracterización fisicoquímica de ZnO-NPs y CuO-NPs.....	25
2.2.1 Determinación de tamaño y potencial zeta por dispersión dinámica de luz.....	25
2.2.2 Caracterización de la banda de absorción de las ZnO-NPs y CuO-NPs por espectroscopía UV-vis.....	26
2.2.3 Visualización de la morfología y tamaño por microscopía electrónica de transmisión.....	26
2.3 Cultivo de la línea celular de macrófagos RAW264.7.....	26
2.4 Ensayos de exposición aguda a ZnO-NPs y CuO-NPs.....	27

2.4.1 Ensayo colorimétrico MTT.....	27
2.5 Ensayos de exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs.....	28
2.6 Análisis del efecto en la morfología y función de los macrófagos de la exposición aguda y subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs.....	28
2.6.1 Medición de la generación de especies de oxígeno altamente reactivas mediante el ensayo fluorimétrico con diacetato de diclorofluoresceína.....	29
2.6.2 Ensayo colorimétrico de Griess para la medición de la producción de óxido nítrico.....	29
2.6.3 Medición mediante citometría de flujo del tamaño y complejidad celular de los macrófagos expuestos a ZnO-NPs.....	30
2.6.4 Ensayo de fagocitosis.....	30
2.6.4.1 Preparación de medio Luria-Bertani y cultivo de <i>Escherichia coli</i> GFP.....	30
2.6.4.2 Estandarización del ensayo de fagocitosis.....	31
2.6.4.3 Reto de macrófagos expuestos a ZnO-NPs contra <i>E. coli</i> GFP.....	31
2.6.4.4 Papel de los iones zinc en la viabilidad y funciones de los macrófagos.....	31
2.6.5 Determinación del potencial de membrana mitocondrial con el fluoróforo JC-1 en los macrófagos expuestos a ZnO-NPs.....	32
2.7 Cuantificación de la cantidad de ZnO-NPs y CuO-NPs internalizadas.....	32
2.8 Extracción de ARN y qRT-PCR.....	33
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>37</b>
3.1 Caracterización fisicoquímica de CuO-NPs.....	37
3.2 Efecto de la exposición aguda a distintas concentraciones de CuO-NPs en la viabilidad celular de macrófagos RAW264.7.....	40
3.3 Efecto de la exposición subcrónica a CuO-NPs en la viabilidad, morfología y respuestas celulares de macrófagos RAW264.7.....	41
3.4 Caracterización fisicoquímica de ZnO-NPs.....	47
3.5 Efecto de la exposición aguda a distintas concentraciones de ZnO-NPs en la viabilidad celular de macrófagos RAW264.7.....	51
3.6 Efecto de la exposición subcrónica a ZnO-NPs en la viabilidad, y respuestas celulares de macrófagos RAW264.7.....	53
3.7 Efecto de la exposición subcrónica a ZnO-NPs en la morfología y función de macrófagos RAW264.7.....	59
3.8 Efecto de la exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs en los niveles de iones en macrófagos.....	76

3.9 Efecto de la exposición subcrónica a ZnO-NPs en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunológica de macrófagos RAW264.7.....	80
<b>Capítulo 4. Discusión</b> .....	84
4.1 Caracterización fisicoquímica de ZnO-NPs y CuO-NPs.....	84
4.2 Citotoxicidad de las CuO-NPs en macrófagos RAW264.7.....	84
4.3 Respuestas celulares de macrófagos RAW264.7 expuestos subcrónicamente a ZnO-NPs.....	85
4.3.1. Tamaño y complejidad relativa de los macrófagos expuestos a ZnO-NPs.....	86
4.3.2 Capacidad fagocítica.....	90
4.3.3 Potencial de membrana mitocondrial.....	91
4.3.4 Respuestas celulares a los iones $Zn^{2+}$ .....	93
4.4 Niveles de iones metálicos intracelulares.....	94
4.5 Alteraciones en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunológica.....	96
<b>Capítulo 5. Conclusión</b> .....	101
<b>Capítulo 6. Recomendaciones</b> .....	102
<b>Literatura citada</b> .....	104
<b>Anexos</b> .....	112

## Lista de figuras

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>1</b> El depósito de partículas en el sistema respiratorio depende del tamaño de partícula.....	3
<b>2</b> Regulación del fenotipo de los macrófagos por M-CSF y GM-CSF.....	6
<b>3</b> Mecanismos de internalización en células de mamíferos.....	11
<b>4</b> Mecanismo sugerido del efecto adyuvante de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) en ratones Balb/c.....	18
<b>5</b> Respuestas celulares de macrófagos por exposición a nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs).....	19
<b>6</b> Micrografía de nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) por microscopía electrónica de transmisión.....	37
<b>7</b> Caracterización del diámetro hidrodinámico, plasmón de resonancia superficial y potencial zeta de nanopartículas de CuO dispersadas mediante sonicación.....	38
<b>8</b> Caracterización del diámetro hidrodinámico, plasmón de resonancia superficial y potencial zeta de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonicación.....	39
<b>9</b> Viabilidad de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos durante 24 horas a concentraciones entre 1-20 µg/mL de nanopartículas de CuO dispersadas mediante sonicación y ultrasonicación.....	41
<b>10</b> Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 2 µg/mL de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonicación.....	42
<b>11</b> Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 3 µg/mL de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonicación.....	43
<b>12</b> Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 4 µg/mL de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonicación.....	44
<b>13</b> Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 6 µg/mL de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonicación.....	45

<b>14</b>	Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 8 µg/mL de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonificación.....	46
<b>15</b>	Concentración de nitritos en medio extracelular de macrófagos expuestos a bajas concentraciones de nanopartículas de CuO.....	47
<b>16</b>	Micrografía de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) por microscopía electrónica de transmisión.....	49
<b>17</b>	Caracterización del diametro hidrodinámico, plasmón de resonancia superficial y potencial zeta de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante sonicación.....	50
<b>18</b>	Caracterización del diametro hidrodinámico, plasmón de resonancia superficial y potencial zeta de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación.....	51
<b>19</b>	Viabilidad de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos durante 24 horas a concentraciones entre 1-20 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante sonicación y ultrasonificación.....	52
<b>20</b>	Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 2 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación.....	54
<b>21</b>	Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 3 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación.....	55
<b>22</b>	Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 4 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación.....	56
<b>23</b>	Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 6 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación.....	57
<b>24</b>	Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 8 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación.....	58
<b>25</b>	Análisis de tamaño y complejidad interna relativa de macrófagos expuestos a 2, 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs hasta 192 horas mediante citometría de flujo.....	60
<b>26</b>	Cambios en la población de células gigantes multinucleadas como resultado de la fusión de macrófagos expuestos a 2, 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs.....	62
<b>27</b>	Concentración de nitritos en medio extracelular de macrófagos expuestos a concentraciones subtóxicas de nanopartículas de ZnO.....	63
<b>28</b>	Capacidad fagocítica de macrófagos expuestos durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs.....	64

<b>29</b>	Análisis por microscopía láser confocal del potencial de membrana mitocondrial de macrófagos expuestos durante 40 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs con el fluoróforo JC-1.....	66
<b>30</b>	Análisis por microscopía láser confocal del potencial de membrana mitocondrial de macrófagos expuestos durante 96 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs con el fluoróforo JC-1.....	68
<b>31</b>	Análisis por microscopía láser confocal del potencial de membrana mitocondrial de macrófagos expuestos durante 120 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs con el fluoróforo JC-1.....	70
<b>32</b>	Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs + 1 mM EDTA como agente quelante de iones $\text{Zn}^{2+}$ , y a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\text{ZnCl}_2$ como donador de iones $\text{Zn}^{2+}$ .....	72
<b>33</b>	Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs + 1 mM EDTA como agente quelante de iones $\text{Zn}^{2+}$ , y a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\text{ZnCl}_2$ como donador de iones $\text{Zn}^{2+}$ .....	73
<b>34</b>	Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs + 1 mM EDTA como agente quelante de iones $\text{Zn}^{2+}$ , y a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\text{ZnCl}_2$ como donador de iones $\text{Zn}^{2+}$ .....	74
<b>35</b>	Capacidad fagocítica de macrófagos expuestos durante 24 y 48 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs + 1 mM de EDTA como agente quelante de iones $\text{Zn}^{2+}$ , y a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\text{ZnCl}_2$ .....	75
<b>36</b>	Análisis por microscopía láser confocal del potencial de iones de macrófagos expuestos durante 40 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs con el fluoróforo Phen Green SK.....	77
<b>37</b>	Análisis por microscopía láser confocal del potencial de iones de macrófagos expuestos durante 96 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs con el fluoróforo Phen Green SK.....	78
<b>38</b>	Análisis por microscopía láser confocal del potencial de iones de macrófagos expuestos durante 120 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs con el fluoróforo Phen Green SK.....	79
<b>39</b>	Expresión relativa de genes proinflamatorios de macrófagos expuestos durante 40, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs.....	82
<b>40</b>	Expresión relativa de genes antiinflamatorios de macrófagos expuestos durante 40, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs.....	83
<b>41</b>	Ruta de señalización de la hormesis.....	87

<b>42</b>	Mecanismo molecular de fusión de macrófago.....	89
<b>43</b>	Reacción química de EDTA con iones $Zn^{2+}$ .....	93
<b>44</b>	Interacción entre el tráfico intracelular de $Zn^{2+}$ , ruta de señalización inflamatoria y respuestas antimicrobianas en macrófagos.....	97
<b>45</b>	Respuestas celulares de macrófagos RAW264.7 expuestos subcrónicamente a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs.....	100
<b>46</b>	Modelo de hormesis en respuesta a dosis de nanopartículas de Nascarella <i>et al.</i> , 2009.....	112
<b>47</b>	Modelo de precondicionamiento en respuesta a un agente tóxico de Calabrese, 2016.....	112
<b>48</b>	Estandarización del ensayo de fagocitosis.....	113

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Estudios sobre exposición a nanopartículas de óxido de zinc en modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de macrófagos.....	15
2	Estudios sobre exposición a nanopartículas de óxido de cobre en modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de macrófagos.....	21
3	Características de los oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	35
4	Condiciones de PCR de cada par de oligonucleótidos.....	36
5	Características fisicoquímicas de CuO-NPs dispersadas mediante sonicación y ultrasonificación utilizadas en este estudio.....	37
6	Características fisicoquímicas de ZnO-NPs dispersadas mediante sonicación y ultrasonificación utilizadas en este estudio.....	48
7	Resumen de los efectos y respuestas celulares de macrófagos RAW264.7 expuestos subcrónicamente a ZnO-NPs.....	99

## Capítulo 1. Introducción

---

El surgimiento de las nanociencias y la nanotecnología ha traído consigo una revolución científica y tecnológica, al permitir el estudio de las interacciones y fenómenos que ocurren a nivel atómico y molecular, y la manipulación de materiales a escala nanométrica para producir materiales y dispositivos novedosos con propiedades útiles y únicas (Ramsden, 2016). De acuerdo con la comisión europea, un nanomaterial se define como un material natural, incidental o manufacturado que contiene partículas en un estado no unido o como agregado o aglomerado, donde el 50% o más de las partículas en la distribución de tamaño numérico poseen una o más dimensiones en el rango de 1 a 100 nm. Estos nanomateriales se pueden clasificar por su origen (natural o antropogénico), dimensionalidad (OD, 1D, 2D, 3D), composición química (metálicos, oxido-metálicos, semiconductores, basados en carbono, silicatos, carbonatos, nitridos, polímeros) y toxicidad potencial (Dolez, 2015). Gracias al tamaño reducido y a una alta área de superficie, los nanomateriales tienen propiedades fisicoquímicas que difieren del material de bulto, e impactan en sus propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas, químicas, térmicas, magnéticas, entre otras (Roduner, 2006). Debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas y al amplio espectro de aplicaciones de los nanomateriales, se estima que para el año 2022 el valor del mercado de la nanotecnología será de aproximadamente 55 billones de dólares (Inshakova y Inshakov, 2017). Una de las áreas más fructíferas y de mayor interés es la bionanotecnología, que emplea la nanotecnología para sintetizar materiales y dispositivos para el estudio de sistemas biológicos y desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico y terapia. Algunas de las aplicaciones de nanomateriales en la bionanotecnología incluyen nanoacarreadores de fármacos, biosensores, antimicrobianos, inmunomoduladores, entre otros (Nagamune, 2017).

Actualmente, los nanomateriales son utilizados en una gran cantidad de sectores y productos en el área de la cosmética, así como en químicos industriales y medicamentos; esto indica que el uso, y, por lo tanto, la exposición a nanomateriales aumentará considerablemente en los próximos años, lo que pone de manifiesto la necesidad de determinar su seguridad y eficacia. Por ello, en el año 2017, se creó el observatorio de nanomateriales de la Unión Europea que tiene como objetivo la clasificación y el monitoreo de nanomateriales y el establecimiento de una normativa para garantizar la seguridad del uso de éstos. En México, el Comité de Normalización Nacional en Nanotecnologías (CTNNN) se encarga de elaborar las normas mexicanas (NMX) para nanotecnologías; sin embargo, estas normas son de carácter voluntario. Al respecto, Foladori *et al.*, 2017, realizaron un exhaustivo análisis de las políticas públicas en materia de nanotecnología en México, y concluyeron que México se encuentra rezagado tanto en apoyo

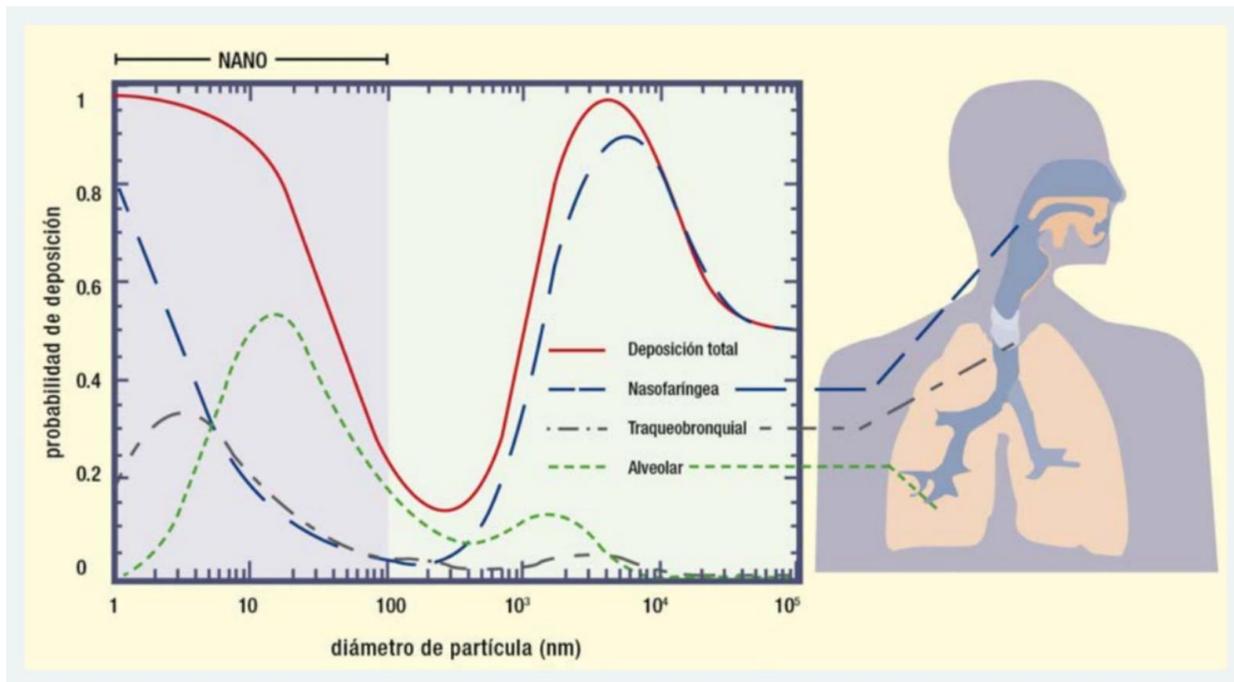
financiero a las nanotecnologías como en materia de política pública; no obstante, los autores discuten que, a pesar de carecer de algún plan de desarrollo en el área, la participación de México en tratados internacionales conducirá a la regulación de nanotecnologías.

En el ámbito científico, la nanotoxicología surge ante la necesidad de evaluar la toxicidad de los nanomateriales, sin embargo, los métodos de análisis toxicológicos convencionales no se ajustan completamente a las evaluaciones que se deben realizar para el caso de los nanomateriales, ya que su toxicidad depende de una gran variedad de factores como su tamaño, forma y propiedades químicas de su superficie. Los nanomateriales pueden inducir toxicidad a través del contacto directo, o bien por encontrarse en el alimento, agua o en productos que contienen nanomateriales (Kumar *et al.*, 2018). Las interacciones de los nanomateriales con los sistemas biológicos que inducen respuestas biológicas tóxicas constan de cuatro principales fases: 1) La entrada de nanomateriales al sistema biológico, que se produce a través de seis vías: intravenosa, dérmica, subcutánea, inhalación, intraperitoneal y oral; 2) Adsorción, la cual tiene lugar cuando el nanomaterial interacciona con componentes biológicos como proteínas y células, dando lugar a la formación de la corona proteica, que otorga una identidad biológica al nanomaterial; 3) Biodistribución, que consiste en la distribución del nanomaterial a través del torrente sanguíneo a varios órganos del cuerpo en donde pueden ser modificados, metabolizados o acumulados; y 4) Excreción, en donde pueden participar órganos como el riñón, hígado o conducto biliar. Sin embargo, se desconoce el efecto a largo plazo de los nanomateriales que no son excretados (Fischer y Chan 2007).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de España (INSHT) los órganos respiratorios son los más expuestos a nanomateriales, seguido por el tracto gastrointestinal. La vía inhalatoria es de suma importancia desde el punto de vista laboral. Se ha observado que, aunque el depósito de partículas en el tracto respiratorio no es uniforme, sí depende del tamaño de la partícula. Además, se ha mencionado la difusión como el principal mecanismo de depósito de nanopartículas de tamaño menor a 100 nm, y en partículas superiores a 300 nm los mecanismos de depósito incluyen sedimentación, impacto inercial e interceptación (figura 1).

La exposición laboral a nanomateriales puede ocurrir durante todo el ciclo de vida del nanomaterial, es decir, desde su fabricación e incorporación al producto, hasta la eliminación de sus residuos (INSHT, 2015). Desde el punto de vista toxicológico, la exposición a un agente químico puede ser: a) aguda, es decir, de corta duración; b) subaguda, de aproximadamente 14 días; c) subcrónica, con una exposición de alrededor de 90 días; o d) crónica, que es de larga duración y oscila entre 6 meses y 2 años,

e inclusive puede ser toda la vida (Giannuzzi, 2018). Cabe destacar que, en el escenario de una exposición constante laboral, esta sería de carácter crónico.



**Figura 1.** El depósito de partículas en el sistema respiratorio depende del tamaño de partícula. Tomado de Seguridad y Salud en el trabajo con Nanomateriales, 2015.

Una vez absorbidos los nanomateriales por el organismo, éstos pueden interactuar con las células de manera pasiva y activa a través de la regulación de funciones celulares mediante mecanismos moleculares, en donde sus propiedades fisicoquímicas, determinan su biocompatibilidad y seguridad, por lo tanto, la respuesta celular hacia los nanomateriales se caracteriza por ser muy variada (Villanueva-Flores *et al.*, 2020).

Algunas de las respuestas celulares suscitadas por la exposición a nanomateriales comprenden la generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) lo que se traduce en estrés oxidativo, perturbación mitocondrial, inflamación, internalización por el sistema fagocítico mononuclear y perturbación de las funciones fagocíticas, degradación y desnaturalización de proteínas, generación de neoantígenos, alteración del ciclo celular, daño al ADN, entre otras (Nel *et al.*, 2006). Algunas de las respuestas celulares mencionadas anteriormente son exclusivas de células del sistema inmunológico, cuya función fisiológica es mantener la integridad y defender al hospedero de microorganismos infecciosos y sustancias foráneas (Abbas *et al.*, 2015).

En el área de la inmunología, las nanopartículas de óxido metálicas han demostrado efectos inmunomoduladores, estas propiedades han sido aprovechadas para el desarrollo de nanovacunas e inmunoterapia (Kubackoba *et al.*, 2019). Sin embargo, también se han que la interacción de nanomateriales con células del sistema inmune induce efectos inmunotóxicos como la hipersensibilidad, inflamación, e incluso disminución de la respuesta inmunológica (Farokhzad *et al.*, 2018).

De acuerdo con la Administración de Medicamentos y Alimentación de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA), la inmunotoxicidad se define como todo efecto adverso sobre la estructura o función del sistema inmunológico o en otros sistemas a consecuencia de la disfunción inmunológica, por lo tanto, algunos efectos adversos o inmunotóxicos pueden ser la inmunosupresión, autoinmunidad, hipersensibilidad o inflamación crónica (FDA, 1999). La inmunotoxicidad puede presentarse en el sistema inmunológico innato, y el adaptativo (Abbas *et al.*, 2018). La inmunidad innata representa la primera línea de defensa, después de las barreras físicas, e incluye al sistema fagocítico mononuclear, que comprende un grupo de células con capacidad fagocítica, entre las que destacan los macrófagos, que se localizan en todos los órganos y juegan un papel primordial en la homeostasis y defensa del hospedero, a su vez, son una de las primeras células que responden ante la presencia de los nanomateriales.

La vía inhalatoria permite la absorción y bioacumulación de nanomateriales en el tejido pulmonar, los macrófagos son reclutados en el sitio de depósito a través de factores quimiotácticos que son liberados por las células epiteliales pulmonares. Una vez ahí, los macrófagos reconocen los nanomateriales, los cuales pueden regular vías de transducción de señales, que determinan el mecanismo de fagocitosis de manera dependiente del tamaño de partícula, y al mismo tiempo excretan una gran cantidad de moléculas que desencadenan la inflamación local y reclutan a otras células del sistema inmunológico. Si bien la respuesta inmune a los nanomateriales es similar a la orquestada contra otro tipo de partículas, los mecanismos moleculares involucrados difieren considerablemente (Booner y Brown, 2020).

En este trabajo se utilizaron nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) y de óxido de cobre (CuO-NPs), ya que las primeras han recibido especial interés debido a sus propiedades antibacterianas y a su capacidad de absorber rayos UVA y UVB, motivo por el cual han sido incorporadas en algunos productos cosméticos y se exploran sus aplicaciones en la nanomedicina (Sruthi *et al.*, 2018). A pesar de estas aparentes ventajas, se han reportado efectos adversos ocasionados por las ZnO-NPs en ensayos *in vitro* e *in vivo* entre los que se encuentran estrés oxidativo, alteración del potencial de la membrana mitocondrial, desestabilización lisosómica, liberación de citocinas inflamatorias, daño al ADN, entre otras (Vandebriel y De Jong, 2012). Por otro lado, las CuO-NPs poseen actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, y se explora

su uso como biosensores (Verma y Kumar, 2019); no obstante, Karlsson *et al.*, 2008 reportaron que este tipo de nanopartículas ocasionaban oxidación y daño al ADN en la línea de células epiteliales de pulmón humanas A549. En este contexto, es de suma importancia estudiar la respuesta celular y la inmunotoxicidad de la exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs en macrófagos para evaluar su seguridad, de manera que sea posible predecir efectos adversos al mediano y largo plazo en un organismo.

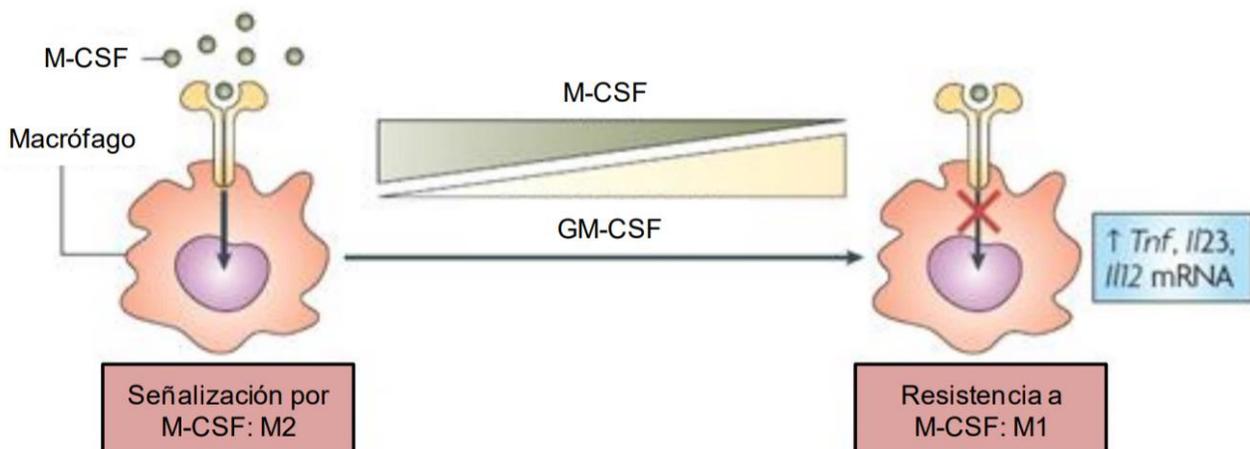
## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Características generales de macrófagos**

Los macrófagos son células del sistema inmunológico innato que proceden de monocitos, los que a su vez preceden de células pluripotenciales de la serie granulocítica-monocítica y se diferencian en la médula ósea. Los monocitos migran a través del torrente sanguíneo, salen de los capilares, se transforman en macrófagos y residen en distintos órganos o pueden migrar hacia otros tejidos en donde se adaptan al microambiente local. Los macrófagos juegan un papel central en la defensa del hospedero contra patógenos, y poseen diversas funciones entre las que se encuentran fagocitosis, presentación de antígenos e inducción de la inflamación, así como el mantenimiento de la homeostasis celular a través de la eliminación de células apoptóticas, reparación de tejidos dañados, entre otras. Por lo que los macrófagos poseen funciones proinflamatorias o antiinflamatorias que dependen de su fenotipo y desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunológica tanto innata como adaptativa (Le *et al.*, 2019).

El crecimiento y la diferenciación de los macrófagos depende de diversas interacciones celulares y de citocinas, principalmente del factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés) y del factor estimulante de colonias granulocítica-macrófago (GM-CSF, por sus siglas en inglés), las cuales determinan su linaje. Los macrófagos que residen en los tejidos son activados localmente en respuesta a diversos estímulos inflamatorios e inmunes; el reclutamiento de monocitos y de precursores celulares de las reservas de la médula ósea da como resultado la acumulación de macrófagos tisulares con fenotipo alterado en respuesta a un cuerpo extraño de manera no específica de antígeno, los cuales se clasifican como elicitados, mientras que cuando la respuesta inmunológica es específica para un antígeno y en función del microambiente prevaleciente, los macrófagos se clasifican como activados por la vía clásica o por la alternativa (Gordon, 2003). La citocina M-CSF se encuentra en altas concentraciones en

presencia de macrófagos tisulares ya que se sintetiza de manera constante por células endoteliales, osteoblastos, macrófagos, entre otras, y mantiene a los macrófagos en un fenotipo de polarización M2, es decir, en un estado antiinflamatorio. Por otro lado, la citocina GM-CSF es sintetizada posterior a la activación de células como los linfocitos T y B, mastocitos, macrófagos, entre otras; y se encuentra en bajas concentraciones en homeostasis, de manera que M-CSF y GM-CSF se regulan mutuamente debido a la acción inhibitoria de GM-CSF sobre la expresión del receptor M-CSF, lo que dirige al macrófago hacia el fenotipo M1, que se caracteriza por un estado proinflamatorio con funciones antimicrobianas (figura 2) (Hamilton *et al.*, 2008). Durante la fase final de la respuesta inflamatoria, se eleva la concentración de M-CSF y disminuye la de GM-CSF, y con ayuda de las células apoptóticas, se promueve la polarización de macrófagos M1 a M2, con actividades antiinflamatorias para reparar el daño tisular y volver a la homeostasis. Con base en lo anterior, es evidente que la polarización de los macrófagos es reversible, y que los macrófagos poseen una gran plasticidad fenotípica (Perisé, 2013).



**Figura 2.** Regulación del fenotipo M1 y M2 de los macrófagos por las citocinas M-CSF y GM-CSF. Tomado de Hamilton *et al.*, 2008.

Los macrófagos del tipo M1, se caracterizan por la producción incrementada de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) y de especies radicales de nitrógeno (NOS), así como citocinas proinflamatorias entre las que se encuentran IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , entre otras, y una baja expresión de IL-10, lo que promueve la respuesta inmunológica tipo Th1. Estos macrófagos son activados por lipopolisacáridos (LPS), IFN $\gamma$  y/o TNF $\alpha$ . Por otro lado, los macrófagos de tipo M2, también conocidos como antiinflamatorios, se subdividen en M2a, M2b y M2c dependiendo del estímulo que reciben; los M2a son activados por

citocinas producidas por los linfocitos T colaboradores (Th)<sub>2</sub> como IL-4 e IL-13, los M2b son activados por inmunocomplejos, TLRs o IL-1ra (antagonista del receptor IL.1), y los M2c son polarizados por IL-10, TGF- $\beta$  o glucocorticoides. Los macrófagos del tipo M2, expresan altas concentraciones de IL-10, presentan receptores “pepenadores” (scavenger) y de manosa, y bajas concentraciones de IL-12 e IL-23, e inhiben la respuesta de linfocitos Th1 y Th17. Este proceso les permite remodelar tejido y modular la respuesta inmunológica.

Algunos autores sugieren que los macrófagos son los primeros en interactuar con las nanopartículas una vez que ingresan en el organismo, fagocitándolas, y, por lo tanto, desencadenando una respuesta inmunológica. Ejemplo de ello es un estudio conducido en el año 2018 por Mo *et al.*, en donde evaluaron la perturbación inmune en macrófagos expuestos a nanomateriales de fosforo negro y demostraron la activación de la ruta inflamatoria NF $\kappa$ B y el incremento en la síntesis de citocinas proinflamatorias. También se ha evidenciado la capacidad de algunas nanopartículas de modular el fenotipo de macrófagos. Por ejemplo, el medicamento Ferumoxytol, compuesto por nanopartículas de óxido de hierro aprobadas por la FDA para el tratamiento de las deficiencias de hierro, tienen un efecto terapéutico en tumores, y se ha observado una mayor presencia de macrófagos proinflamatorios con fenotipo M1 en el tumor (Zanganeh *et al.*, 2016). Posteriormente se demostró que el tratamiento con Ferumoxytol causó el aumento de la expresión de genes involucrados en respuestas proinflamatorias. Los autores sugieren que este tipo de compuesto modula el fenotipo a través de la reacción Fenton, en donde el peróxido de hidrógeno secretado por los macrófagos M1 podría reaccionar con el hierro (III) para producir radicales hidroxilos tóxicos. En otro estudio, también se ha reportado que la entrega dirigida de nanopartículas de dióxido de manganeso conjugadas con manosa y recubiertas con ácido hialurónico a macrófagos asociados a tumor, incrementó la oxigenación tumoral y causó la polarización de macrófagos del fenotipo M2 al M1 (Song *et al.*, 2015). Con base en las implicaciones de estas células en diferentes procesos fisiológicos, estudiar el efecto en la función de los macrófagos y los mecanismos de reconocimiento de nanopartículas es sumamente importante para determinar su seguridad.

#### **1.1.1.2 Línea celular de macrófagos RAW264.7**

La línea celular RAW264.7 consiste de macrófagos aislados de la ascitis provocada por un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson en un ratón adulto masculino de la cepa BALB/c. Debido a su fácil propagación, alta eficiencia para la transfección de ADN, sensibilidad a la interferencia de

ARN y a su capacidad de replicar norovirus murinos, la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 es una de las más utilizadas como modelo celular (ATCC, 2020).

### 1.1.2 Reconocimiento e internalización celular de nanopartículas

Dado que la exposición a nanopartículas de origen natural en mamíferos ha ocurrido de manera constante sin presentar toxicidad aparente, es posible que el sistema inmunológico sea capaz de reconocerlas y haya desarrollado mecanismos de tolerancia y eliminación de estas partículas. De hecho, uno de los principales problemas del uso de nanopartículas como nanoacarreadores es el secuestro por células fagocíticas y algunos órganos. Como se ha mencionado anteriormente, la interacción de nanopartículas con materia orgánica da lugar a la adsorción de proteínas, lo que les otorga una identidad biológica; esto podría causar reconocimiento celular y orquestación de una respuesta inmunológica. En este sentido, los factores que influyen en la interacción de nanopartículas con los receptores de superficie y por ende regulan el reconocimiento celular incluyen la composición y conformación de la proteína adsorbida (corona), lo que a su vez depende de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas (Aggarwal *et al.*, 2009). Las nanopartículas podrían presentar patrones moleculares similares a los presentes en patógenos o tejidos dañados, por lo que los receptores de superficie de macrófagos podrían reconocerlos e iniciar una respuesta inflamatoria con la finalidad de erradicarlos. Los receptores de superficie de macrófagos que reconocen patrones moleculares son los receptores tipo toll (TLR), receptores de manosa, receptores scavenger y los receptores Fc (Gustafson *et al.*, 2016).

Algunos de los receptores celulares de los macrófagos que reconocen nanopartículas son los receptores scavenger A (SRA-1), receptor de macrófago con estructura de colágeno (MARCO) y CD36. Estos receptores se unen a ligandos polianiónicos, tienen una capacidad de señalización pobremente definida, varían en dominio estructural y tienen un reconocimiento distinto, aunque superpuesto, de ligandos apoptóticos. Algunas de las cascadas de señalización orquestadas por CD36 inducen el reordenamiento de actina y estimulan la producción de citocinas proinflamatorias y de señales apoptóticas (Canton *et al.*, 2013). Además, se sugiere que la internalización de partículas a través del reconocimiento por este mecanismo contribuye a la inflamación crónica y daño progresivo en el tejido (Arredouani *et al.*, 2005). En este contexto, Arancibia *et al.*, 2015 estudiaron el efecto de nanopartículas de cobre en la respuesta inmunológica de macrófagos de ratones expuestos vía intraperitoneal, y se observó el reclutamiento de macrófagos en el sitio de inyección, así como la inhibición en la producción de citocinas proinflamatorias

y en la producción de óxido nítrico (NO) de manera dependiente de la concentración de nanopartículas en macrófagos *in vitro* estimulados con LPS, esto sugiere que el mecanismo involucrado está asociado al incremento en la actividad enzimática arginasa, vinculada a su vez, a la de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) dado que ambas enzimas utilizan el mismo sustrato. Por ello, los autores concluyen que la exposición a CuO-NPs causa la supresión de la respuesta inmune innata por parte de los macrófagos.

Se ha propuesto que los receptores de superficie de macrófagos han evolucionado para incrementar la eficiencia de la detección de materiales opsonizados y la eliminación de nanopartículas, lo que ha permitido que el reconocimiento y la señalización pueda llevarse a cabo de manera paralela por más de un receptor, y aún en ausencia de una proteína corona (Wolfram *et al.*, 2015).

El reconocimiento celular y la cascada de señalización desencadenada en respuesta a la interacción con nanopartículas, dirigen su internalización en el macrófago a través de reordenamientos del citoesqueleto, la invaginación de la membrana celular que rodea a la partícula y la formación de vesículas intracelulares. Los mecanismos de internalización se clasifican de manera general en fagocitosis y pinocitosis, de acuerdo con los receptores que participan, los mecanismos de membrana involucrados y la disposición intracelular (Gustafson *et al.*, 2016).

Uno de los principales mecanismos de internalización de nanopartículas en los macrófagos, es la fagocitosis, proceso activo mediado por receptores y dependiente de energía, que permite la internalización de partículas en vesículas de hasta 10  $\mu\text{m}$ , y comprende las siguientes etapas: 1) reconocimiento del agente extraño mediante receptores de membrana por parte del macrófago; 2) la alteración de la membrana que rodea a la partícula a fagocitar; 3) el agente extraño es ingerido a través de su internalización en una vesícula que recibe el nombre de fagosoma; y 4) se forma el fagolisosoma mediante la fusión del fagosoma y lisosoma, este último se caracteriza por poseer un pH bajo y enzimas digestivas que producen la destrucción de la partícula. Este proceso es crucial para el sistema inmunológico adaptativo, ya que, tras la digestión lisosomal, los macrófagos pueden presentar antígenos a los linfocitos B y T (Gordon, 2016). Sin embargo, estos procesos no necesariamente ocurren posterior a la fagocitosis de nanopartículas, por lo que se desconocen tanto los mecanismos moleculares y las consecuencias de la persistencia de las nanopartículas en el interior de los macrófagos debido a la incapacidad enzimática de degradarlos, así como su impacto en las funciones del sistema inmunológico en general. Algunas evidencias sugieren que la tendencia a acumular nanopartículas en ciertos tejidos se debe al desarrollo de una respuesta local común para aislar estas partículas extrañas del ambiente biológico del hospedero en donde podrían causar daños.

Otro de los mecanismos de internalización de nanopartículas es la pinocitosis, que ocurre en todas las células de mamíferos, y se puede clasificar como internalización de partículas de gran volumen (macropinocitosis). Además, existen otros mecanismos de internalización de partículas de menor tamaño, conocidos como endocitosis dependiente de clatrina, dependiente de caveolas o endocitosis independiente de clatrina y caveolas. Estos mecanismos se describen a continuación y se representan en la figura 3.

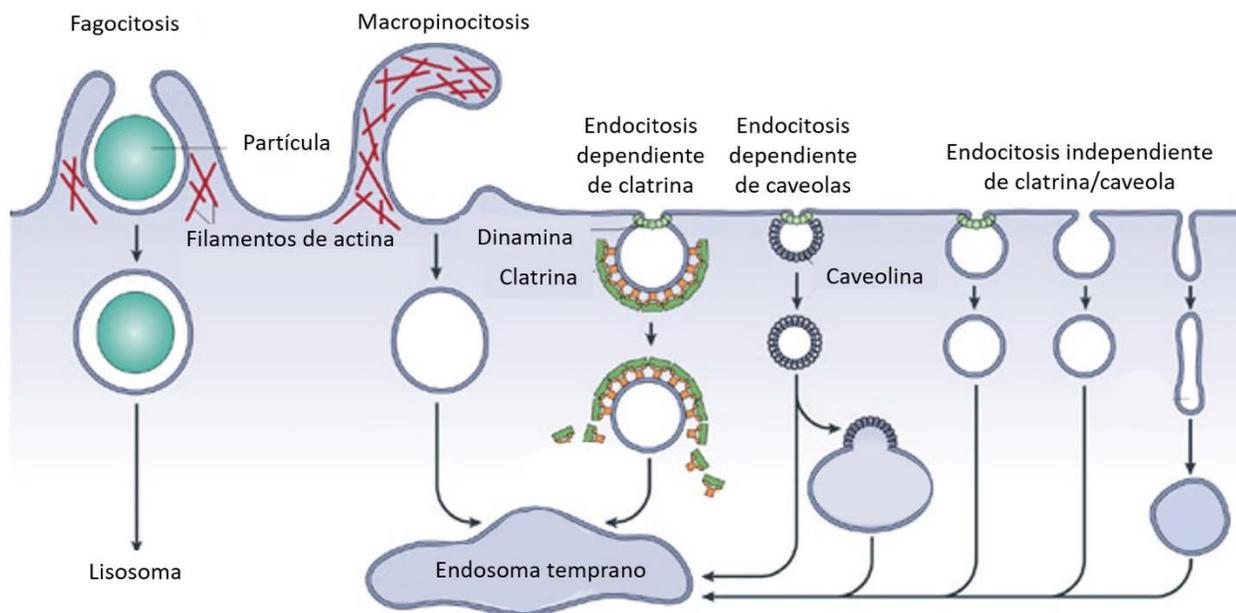
*Macropinocitosis:* La macropinocitosis consiste en la formación de grandes protuberancias de la membrana mediante el reordenamiento del citoesqueleto, que da lugar a una vesícula grande en donde se internalizan partículas de tamaño entre 0.5 y 5  $\mu\text{m}$  que se encuentran disueltas en el líquido extracelular. En este mecanismo las células envuelven el agente extraño directamente en el citoplasma de manera independiente de receptores, por lo que es un proceso inespecífico responsable de la internalización de partículas como virus, macromoléculas y nanopartículas (Lim y Gleeson, 2011).

*Endocitosis dependiente de clatrina:* es el mecanismo de internalización mejor estudiado, los receptores capaces de reconocer e iniciar este proceso incluyen los receptores “scavenger”, manosa y toll like (TL), que conducen a la formación de invaginaciones de clatrina en la membrana celular. Una vez que envuelven al agente extraño, las vesículas se separan de las invaginaciones de la membrana plasmática para internalizarlas, convirtiéndose en endosomas tempranos, que se acidifican y transforman en vesículas endosómicas tardías, las cuales pueden ser transportadas hacia otros organelos celulares como los lisosomas. Este mecanismo permite la internalización de partículas de tamaño entre 100-350 nm, y tiene lugar en áreas de la membrana ricas en clatrina, que se ensamblan en un trípode formando complejos que estabilizan la curvatura de la membrana y la formación de las vesículas (McMahon y Boucrot, 2011).

*Endocitosis dependiente de caveolas:* Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que están revestidas con caveolinas, una proteína dimérica que participa en la formación y estabilización estructural de la vesícula. Este mecanismo internaliza partículas de tamaño entre 20-100 nm. Los agentes extraños que entran por este mecanismo en ocasiones escapan de la degradación lisosomal, por lo que esta vía podría ser aprovechada para la entrega de partículas, fármacos y genes (Rejman *et al.*, 2006).

*Endocitosis independiente de clatrina/caveola:* Este proceso tiene lugar en células que poseen una membrana plasmática rica en colesterol lo que compensa la ausencia de clatrina y caveolas, y permite la internalización de una gran variedad de compuestos, entre ellos el ácido fólico (Doherty y McMahon, 2009). Por lo tanto, la funcionalización de nanopartículas con folato podría favorecer su internalización

mediante esta vía en células tumorales. Además del tamaño, existen otros parámetros fisicoquímicos como la forma y la carga superficial que determinan el proceso molecular que conlleva la internalización de las nanopartículas, y, por lo tanto, la respuesta inmunológica orquestada (Behzadi *et al.*, 2017). Por ello, diversos autores han propuesto modificar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas con la finalidad de modular su internalización en células del sistema inmunológico y con ello, reducir su toxicidad. También se han estudiado las estrategias de evasión del sistema inmunológico de algunos microorganismos patógenos, con la finalidad de que puedan ser mimetizados por nanopartículas (Parton y Richards, 2003). Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios de la relación entre estas características y la internalización, para enriquecer el conocimiento y diseñar nanopartículas reduciendo su toxicidad y aumentando su especificidad.



**Figura 3.** Mecanismos de internalización mediante la formación de vesículas en células de mamíferos. Modificado de Mayor y Pagano, 2007.

### 1.1.3 Nanopartículas óxido metálicas

Las nanopartículas óxido metálicas son uno de los nanomateriales más utilizados y estudiados debido a sus propiedades fisicoquímicas, fototérmicas y plasmónicas. Por lo anterior, se han incorporado a celdas solares, pinturas, revestimientos, cosméticos, bloqueadores de rayos UV hasta remediación ambiental y como agentes terapéuticos (Hussain, 2018). Algunas de las ventajas de las nanopartículas de

óxido metálicas, abarcan sus altas energías de superficie, gran relación de superficie respecto del volumen en comparación con el material de bulto, confinamiento cuántico, excitación del plasmón, entre otras. Sin embargo, también presentan ciertas desventajas entre las que se encuentran: 1) inestabilidad de partículas, lo que conduce a disminución de la calidad, poca resistencia a la corrosión y transformación; 2) presencia de impurezas debido al método de síntesis; 3) explosión, la síntesis por combustión exotérmica puede causar una explosión debido a que las partículas metálicas pueden actuar como explosivos; 4) dificultad en la síntesis, es sumamente complicado mantener un tamaño homogéneo en forma de solución; y 5) toxicidad en sistemas biológicos (Kumar *et al.*, 2018).

La toxicidad de los nanomateriales depende del tamaño de partícula, morfología, composición química, superficie, solubilidad, agregación o aglomeración, internalización de partícula, el estado de oxidación, presencia de ligandos, condiciones ambientales y de salud (Sengul y Asmatulu, 2020). Por otro lado, el desarrollo de algunas enfermedades se ha asociado a la exposición e internalización de nanopartículas de óxido metálicas al organismo. Por ejemplo, nanopartículas introducidas por vía inhalatoria pueden causar asma, bronquitis, cáncer de pulmón, entre otras; mientras que aquellas que se localizan en el tracto gastrointestinal pueden desencadenar enfermedad de Crohn o cáncer de colon, y la presencia de nanopartículas en el sistema circulatorio puede conducir a arteriosclerosis, formación de trombos, enfermedades cardíacas, entre otras (Buzea *et al.*, 2007). Lo anterior pone de manifiesto la importancia de estudiar las respuestas celulares a la exposición a nanopartículas de óxido metálicas, de manera que se pueden disminuir los efectos adversos y aprovechar sus ventajas.

#### **1.1.4 Efecto de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) en macrófagos y células del sistema inmunológico**

Las propiedades de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) como la elevada actividad química, resistencia a la oxidación y corrosión, fotocatalisis, capacidad de absorción y protección de rayos UV, son aprovechadas en aplicaciones como catalizadores, sensores de gas, filtros de onda, detectores UV, celdas y protectores solares, productos cosméticos, entre otras. Debido a su incorporación en productos de uso diario, se ha incrementado la exposición a ZnO-NPs en humanos y con ello su potencial toxicidad (Senapati y Kumar, 2018). Por ello, diversos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en tratar de elucidar los mecanismos toxicológicos de los nanomateriales *in vitro*, en una gran variedad de líneas celulares con distintas características y en modelos *in vivo*; sin embargo, los resultados en ocasiones son

contradictorios debido en parte a las diferencias en las características fisicoquímicas de las ZnO-NPs evaluadas.

El estudio de la interacción de las ZnO-NPs con sistemas biológicos, se basa principalmente en las células y órganos implicados en la vía aérea, que es la principal ruta de exposición a nanomateriales. En la tabla 1, se resumen los resultados obtenidos en diversos estudios sobre la exposición a ZnO-NPs, y estos se describen a continuación.

En el año 2012, Feltis *et al.*, examinaron el efecto del tamaño (30, 80 y 200 nm) y la dispersión (presencia o ausencia de surfactante) de ZnO-NPs en la toxicidad y las respuestas inflamatorias de monocitos y macrófagos humanos THP-1, y compararon la toxicidad de ZnO-NPs y de iones de zinc en solución. En estos estudios observaron que las ZnO-NPs en presencia de un surfactante indujeron un mayor efecto citotóxico y que los macrófagos son más sensibles a ZnO-NPs en comparación con los monocitos ( $EC_{50}=12 \mu\text{g/mL}$  y  $88 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), probablemente debido a la mayor capacidad fagocítica del macrófago; mientras que la presencia del surfactante disminuye la aglomeración o agregación de NPs y podría aumentar la internalización de las ZnO-NPs a través de interacciones con la membrana celular. Sin embargo, debido a la solución de  $\text{ZnCl}_2$ , los iones  $\text{Zn}^{2+}$  presentes en el medio extracelular son altamente citotóxicos ( $EC_{50} = 85 \mu\text{g/mL}$ ), e incluso, este valor es similar al obtenido por ZnO-NPs de 30 nm cubiertas con surfactante ( $EC_{50} = 88 \mu\text{g/mL}$ ). Para analizar el efecto de las ZnO-NPs en las funciones inflamatorias de los monocitos y macrófagos, se determinaron los perfiles de citocinas a concentraciones subtóxicas y tóxicas, y se reportó que existe un incremento en la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1b, TNF- $\alpha$  e IL-8, lo que sugiere activación inmunológica.

Por otro lado, Wang *et al.*, en el 2014 estudiaron la toxicidad de ZnO-NPs de 37 nm en macrófagos murinos RAW246.7, y determinaron que la solubilidad de los iones  $\text{Zn}^{2+}$  es dependiente del pH del medio, de manera que, a menor pH, mayor concentración de iones  $\text{Zn}^{2+}$ . Los macrófagos son células que fagocitan agentes exógenos a través de la formación de un fagosoma que posteriormente se fusiona con lisosomas, en estos organelos se degradan los agentes exógenos debido a la acción de enzimas y al pH ácido del lisosoma (alrededor de 5.5). Por ello, los autores sugieren que la internalización de ZnO-NPs mediante la fagocitosis hacia el interior del macrófago es un paso fundamental para la liberación de iones  $\text{Zn}^{2+}$  en el medio intracelular y, por lo tanto, un incremento en el efecto citotóxico. La exposición *in vitro* de macrófagos a ZnO-NPs ocasiona una disminución significativa en la viabilidad celular y en el potencial de membrana mitocondrial, así como un aumento en los niveles de ROS y en las concentraciones extracelulares de lactato deshidrogenasa, lo cual es un indicador de la lisis celular a partir de las primeras

4 horas; sin embargo, se observó que la toxicidad fue más severa después de 12 h de exposición y además es dependiente de la concentración de las ZnO-NPs (25-200 µg/mL). También se reportó que la incubación con inhibidores de mecanismos de internalización en particular de la macropinocitosis, regula la internalización de ZnO-NPs, lo cual afecta la viabilidad celular. En contraste con lo reportado por Feltis *et al.*, 2012, los iones extracelulares no presentaron actividad citotóxica.

En el año 2019, Yazhiniprabha *et al.*, reportaron la síntesis de ZnO-NPs con un tamaño de 10-15 nm, que inducía actividad larvicida por el método de coprecipitación simple utilizando el extracto de bayas de *Murraya koenigii*, y determinaron *in vitro* que la viabilidad celular de macrófagos RAW264.7, a concentraciones de 10-100 µg/mL era de 90-50% aproximadamente.

Se han utilizado enfoques transcriptómicos y proteómicos para obtener un panorama general de la respuesta celular y determinar las principales rutas metabólicas y de señalización afectadas por la exposición de macrófagos a ZnO-NPs. Por ejemplo, Tuomela *et al.*, en el año 2013 realizaron un análisis exhaustivo del perfil transcriptómico *in vitro* de macrófagos humanos, células dendríticas y células T Jurkat expuestos a 1 y 10 µg/mL de ZnO-NPs entre 5 y 40 nm con distintos ligandos durante 6 y 24 h. En macrófagos expuestos a 10 µg/mL de ZnO-NPs, 2703 genes fueron expresados significativamente de manera diferencial, mientras que en células dendríticas únicamente 12 genes sufrieron cambios significativos y en células T Jurkat se expresaron diferencialmente 980 genes. En los tres tipos de células, se sobreexpresaron los genes de las metalotioneínas, una familia de metaloproteínas con capacidad de unión a metales pesados como zinc y cobre. Mediante ontología génica se estableció que los principales procesos biológicos afectados fueron regulación del crecimiento y muerte celular, y desarrollo y control de sistema inmunológico. Además, la respuesta celular varía entre ZnO-NPs con distintos ligandos, debido probablemente a la disolución de las partículas, filtración y modulación de iones Zn<sup>2+</sup>. Con respecto al análisis proteómico, Triboulet *et al.*, en el año 2014 estudiaron la respuesta celular de macrófagos RAW264.7 a la exposición a varillas de ZnO de 117 ±22 nm y a ZnO-NPs con recubrimiento catiónico y de morfología esférica con un tamaño de 32 ±8 nm y iones Zn<sup>2+</sup>, el resultado del estudio reveló una ligera respuesta en rutas implicadas en el estrés oxidativo que podrían dirigir al daño al ADN y una fuerte respuesta en rutas de degradación de proteínas. Además, los autores concluyeron que el metabolismo de carbohidratos y proteínas son determinantes en la sensibilidad al zinc. Curiosamente, la exposición durante 24 horas a concentraciones subtóxicas de 8 µg/mL de varillas de ZnO, 7 µg/mL de ZnO-NPs con recubierta catiónica y 120 µM de iones Zn<sup>2+</sup> no afectan los niveles de glutatión ni la fagocitosis.

**Tabla 1.** Estudios sobre exposición a nanopartículas de óxido de zinc en modelos *in vitro* e *in vivo* de macrófagos

Características de ZnO-NPs	Modelo <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i>	Metodología	Observaciones	Referencias
ZnO-NPs de 30, 80 y 200 nm en presencia o ausencia de surfactante	Línea celular de monocitos y macrófagos humanos THP-1	Viabilidad celular por MTT y perfil de citocinas por ELISA	-ZnO-NPs de menor tamaño y en presencia de surfactante presentan mayor toxicidad -Incremento en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1b, TNF- $\alpha$ e IL-8)	Feltis <i>et al.</i> , 2012
ZnO-NPs de 37 nm	Línea celular de macrófagos murinos RAW246.7	Viabilidad celular por MTT e inhibición de las rutas de internalización mediante bloqueadores	-A menor pH, mayor solubilidad de ZnO-NPs -Disminución de la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración y el tiempo -Incremento en la producción de ROS -Disminución del potencial de membrana mitocondrial	Wang <i>et al.</i> , 2014
ZnO-NPs de 10 a 15 nm	Línea celular de macrófagos murinos RAW264.7	Síntesis por coprecipitación simple utilizando un extracto de bayas de <i>Murraya Koehigij</i> y viabilidad celular por MTT	-Viabilidad de macrófagos expuestos a concentraciones entre 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs se encuentra entre el 50 y 90%, por lo que los autores sugieren que son relativamente seguras	Yazhiniprabha <i>et al.</i> , 2019
ZnO-NPs entre 5 y 40 nm con distintos ligandos y sintetizadas por diferentes métodos	Línea celular de macrófagos humanos, células dendríticas y células T Jurkat	Análisis transcriptómico de las líneas celulares expuestas a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO-NPs	-Los procesos biológicos afectados fueron regulación del crecimiento y muerte celular, y desarrollo y control de sistema inmune -La expresión de genes varía entre ZnO-NPs con distintos ligandos	Tuomela <i>et al.</i> , 2013

**Continuación. Tabla 1.** Estudios sobre exposición a nanopartículas de óxido de zinc en modelos *in vitro* e *in vivo* de macrófagos

Características de ZnO-NPs	Modelo <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i>	Metodología	Observaciones	Referencias
Varillas de ZnO-NPs de aprox. 120 nm y esferas con recubrimiento catiónico de 30 nm	Línea celular de macrófagos murinos RAW264.7	Análisis proteómico de macrófagos expuestos a bajas concentraciones (7 y 8 µg/mL) de varillas y esferas nanométricas de ZnO-NPs	-Respuesta en rutas implicadas en estrés oxidativo y degradación de proteínas y no hubo alteración en los niveles de glutatión y fagocitosis -Metabolismo de carbohidratos y proteínas influyen en la sensibilidad al zinc	Triboulet <i>et al.</i> , 2014
ZnO-NPs de 35 nm	Ratones albinos ICR	Administración de distintas concentraciones de ZnO-NPs por vía intravenosa durante 6 días	-Exposición durante 3 y 6 días causa enfisema pulmonar -Acumulación de ZnO-NPs en pulmón, bazo, etc.	Fujihara <i>et al.</i> , 2015
ZnO-NPs de 50 nm	Macrófagos purificados de exudado peritoneal de ratones Balb/c	Medición de ROS y detección de marcadores de estrés oxidativo, apoptosis, autofagia y genotoxicidad	-Incremento en la producción de ROS se debe a la disminución e inhibición de enzimas antioxidantes -Presencia de marcadores de genotoxicidad, apoptosis y autofagia	Roy <i>et al.</i> , 2014
ZnO-NPs de aprox. 20 nm	Piel de ratón modelo de dermatitis atópica	Aplicación por vía tópica de ZnO-NPs y análisis de citocinas por RT-PCR y ELISA	-ZnO-NPs pueden entrar hasta capas profundas de piel alérgica -La exposición a ZnO-NPs causa disminución de la inflamación local a través de la disminución de la infiltración celular y de la expresión de citocinas proinflamatorias y de tipo Th2 y producción de anticuerpos IgE	Ilves <i>et al.</i> , 2014
ZnO-NPs de 50 nm	Ratones Balb/c hembras	Administración vía intraperitoneal de ZnO-NPs y ovoalbúmina, análisis histopatológicos y de expresión de genes	-ZnO-NPs presentan propiedades adyuvantes a ovoalbúmina a través de las vías de señalización mediadas por receptores tipo Toll y Src -Respuestas inflamatorias	Roy <i>et al.</i> , 2014

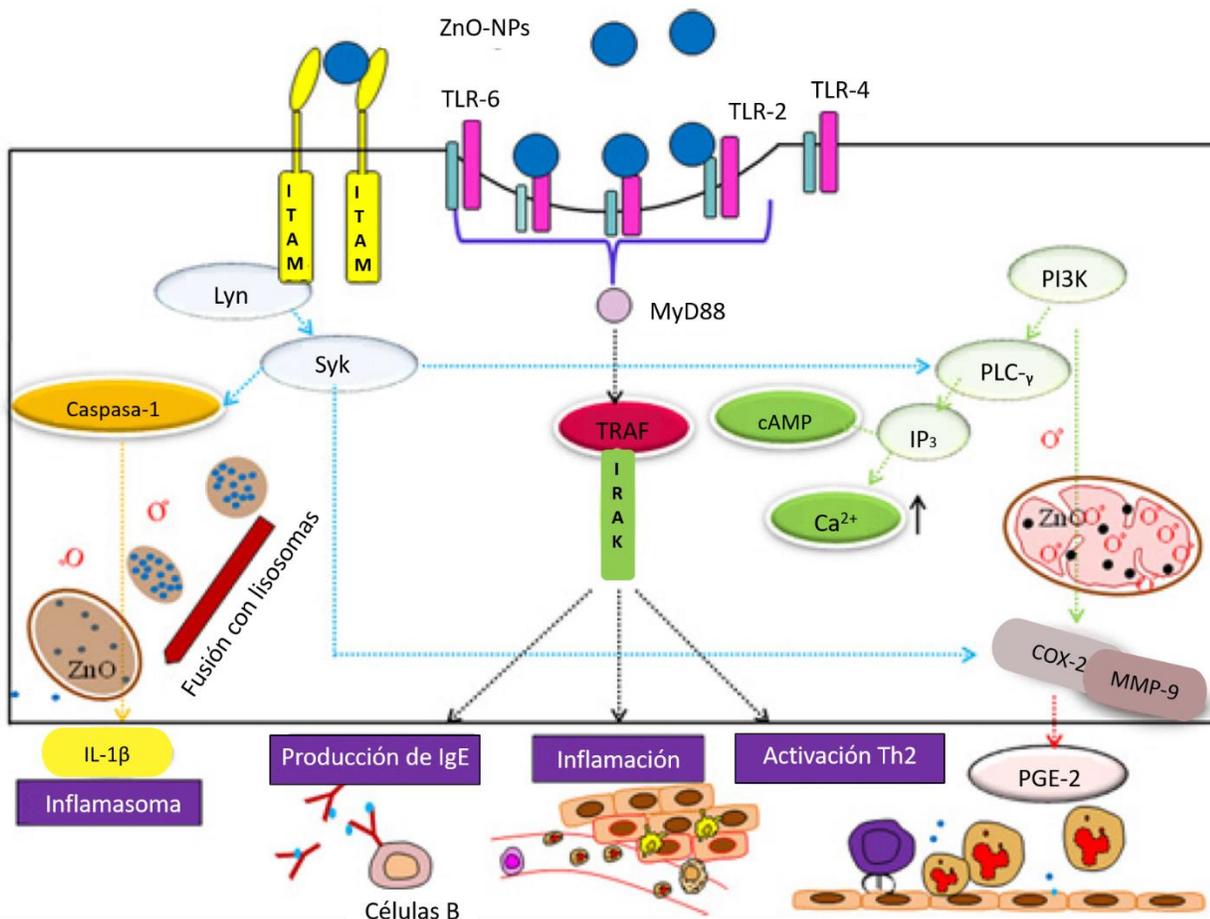
En un estudio reportado por Fujihara *et al.*, en el año 2015 se evaluó la toxicidad de ZnO-NPs de 35 nm administradas por vía intravenosa en ratones albinos ICR, y se determinó que la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) fue de 0.3 mg/kg. Los ratones expuestos durante 3 y 6 días a dosis de ZnO-NPs de 0.2 mg/kg y 0.05 mg/kg respectivamente, desarrollaron enfisema pulmonar, y la acumulación ocurrió principalmente en pulmón, bazo e hígado.

A pesar de los resultados discutidos anteriormente, elucidar un mecanismo molecular que explique los efectos tóxicos e inflamatorios de las ZnO-NPs en macrófagos requiere de una mayor investigación. En este contexto, en el año 2014, Roy *et al.*, reportaron que el aumento de ROS se debe a la disminución e inhibición de la actividad de enzimas antioxidantes, como consecuencia de la supresión del factor de transcripción Nrf2, dirigiendo a la peroxidación lipídica y de proteínas. A su vez, las ZnO-NPs de 50 nm pueden activar la escisión de las caspasas 3, 8 y 9, marcadores de apoptosis; e incrementa la presencia de algunos marcadores de genotoxicidad como la fosforilación de la histona H2Ax y el aumento de Poli ADP ribosa polimerasa, y las proteínas MAP-LC3-II y beclina 1, implicadas en la autofagia. Tanto la muerte celular apoptótica como autofágica fue inhibida por bloqueadores de las ROS como N-acetilcisteína, lo que demuestra el papel de las ROS en la muerte celular. Los autores concluyen que la exposición de los macrófagos a las ZnO-NPs induce autofagia, y que ésta precede a la apoptosis.

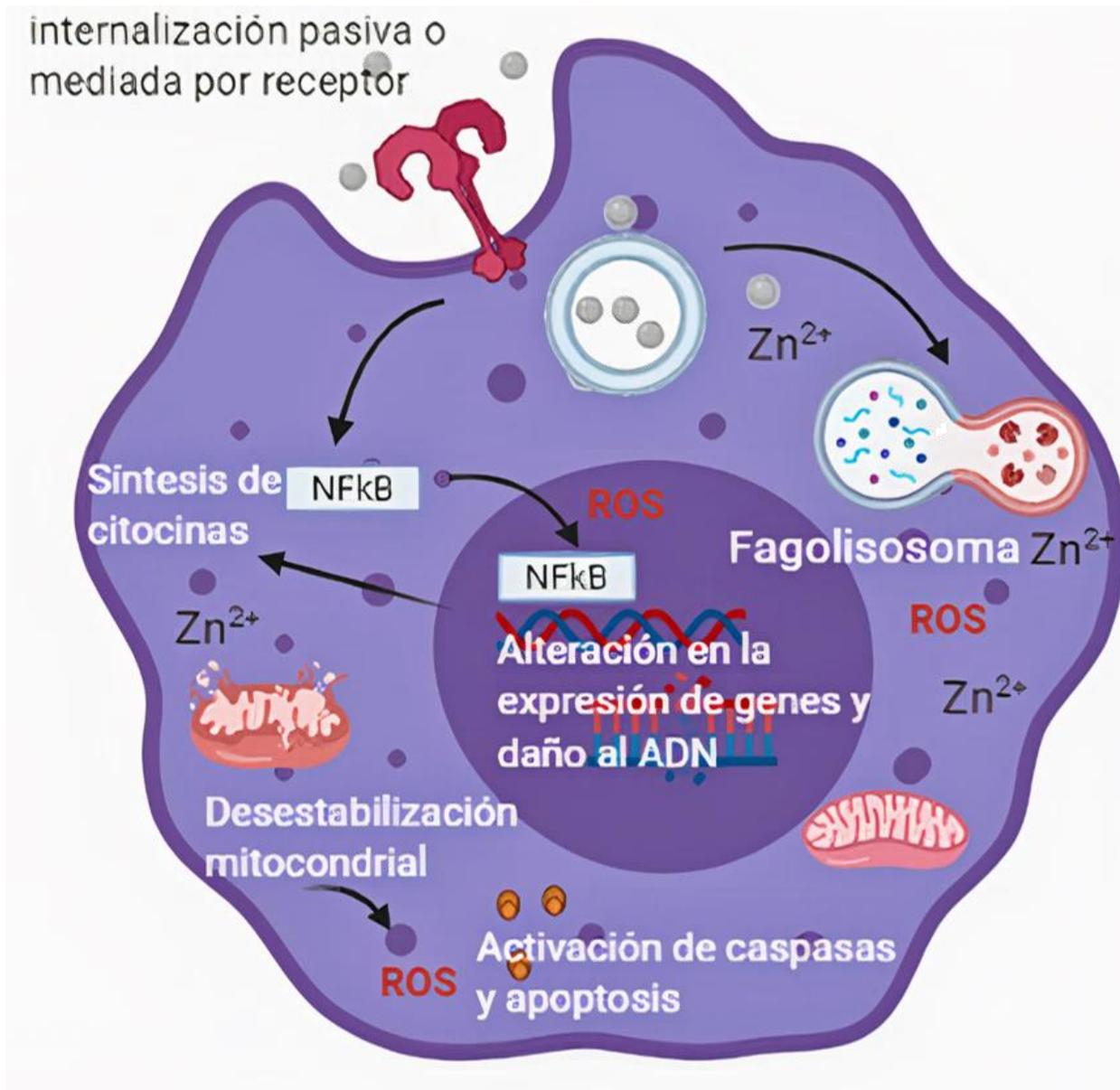
Otros estudios llevados a cabo por el mismo grupo de investigación, indican que las ZnO-NPs presentan propiedades adyuvantes al alérgeno ovoalbúmina en ratones Balb/c. Describieron que este efecto involucra las vías de señalización mediadas por receptores tipo Toll y Src, debido al incremento en la expresión de TLR2, 4 y 6, así como la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la cinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (IRAK-1) y el factor 6 asociado a TNFR (TRAF-6), lo que se atribuye a respuestas inflamatorias por el reclutamiento y activación de moléculas de adhesión y células inflamatorias observadas en el estudio (Roy *et al.*, 2014) (figura 4). Si bien los autores sugieren que este mecanismo podría utilizarse para desarrollar estrategias para su uso terapéutico, por ejemplo, en vacunas, es necesario considerar los efectos adversos que podrían desencadenarse por la exposición subcrónica o crónica a ZnO-NPs en pacientes sanos debido al potencial inmunomodulador de las ZnO-NPs. Por otro lado, Ilves *et al.*, 2014 evaluaron la capacidad de penetración de óxido de zinc nanométrico y de bulto en piel lesionada y alérgica en un modelo de dermatitis atópica en ratón, y observaron que ZnO-NPs pueden entrar hasta capas profundas de piel alérgica, mientras que el óxido de zinc de bulto permanece en las capas superiores. A pesar de que ambas partículas causaron la disminución de la inflamación local en la piel del ratón modelo de dermatitis atópica, el efecto supresor fue más significativo en el tratamiento con

ZnO-NPs, a través de la disminución de la infiltración celular y de la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF) y citocinas tipo Th2 (IL-33, IL-4 e IL-13). El efecto supresor fue más significativo en el tratamiento con ZnO-NPs, a través de la disminución de la infiltración celular y de la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF) y citocinas tipo Th2 (IL-33, IL-4 e IL-13). No obstante, el tratamiento con ZnO-NPs causó la producción sistémica de anticuerpos IgE, lo cual sugiere que la aplicación tópica de ZnO-NPs podría tener propiedades adyuvantes que promuevan la alergia (Ilves *et al.*, 2014).

En conclusión, la revisión de la literatura sugiere que macrófagos expuestos a ZnO-NPs orquestan respuestas celulares asociadas con inmunotoxicidad entre las que se encuentran la perturbación de las funciones fagocíticas, inducción de la inflamación, incremento en la producción de ROS y óxido nítrico, activación de la apoptosis, entre otras (figura 5).



**Figura 4.** Mecanismo sugerido del efecto adyuvante de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) en ratones Balb/c. Tomado de Roy *et al.*, 2014.



**Figura 5.** Respuestas celulares de macrófagos por exposición a nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs). La internalización de ZnO-NPs puede ocurrir de manera directa por daño a la membrana celular o ser mediada por receptores. La endocitosis de ZnO-NPs da lugar a la formación de un fagolisosoma en donde se incrementa la liberación de iones zinc. Una vez en el citoplasma, las ZnO-NPs pueden modular vías de señalización que podrían conducir a la activación de la ruta inflamatoria NFκB. Además, las ZnO-NPs tienen la capacidad de alterar la función mitocondrial e inducir la apoptosis a través de diversos mecanismos como el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Figura tomada de Gutiérrez-Araujo *et al.*, 2021.

### 1.1.5 Efecto de las nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) en macrófagos y células del sistema inmunológico

Las nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) presentan propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y catalíticas de gran interés y pueden ser aprovechadas en medios de almacenamiento magnético, baterías, transformadores de energía solar, dispositivos electrónicos, sensores, etc., debido a que es un nanomaterial semiconductor que exhibe una estrecha banda prohibida (Singh *et al.*, 2016).

De manera similar a lo reportado para el caso de las ZnO-NPs, múltiples estudios sugieren que la rápida disolución y la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  son los principales factores que influyen en la toxicidad de las CuO-NPs. El tamaño y la forma son dos parámetros que influyen en las actividades biológicas de las nanopartículas, y por lo tanto en su toxicidad. En la tabla 2 se resumen los resultados de investigaciones de exposición a CuO-NPs en macrófagos y células del sistema inmunológico.

Bucchianico *et al.*, en el año 2013, reportaron que distintas morfologías de CuO-NPs, inducían un efecto citotóxico y genotóxico en la línea celular RAW264.7 de macrófagos murinos y en linfocitos de sangre periférica de individuos sanos expuestos durante 2 y 24 h a concentraciones entre 0.1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La citotoxicidad fue dependiente de la concentración y de la morfología de las CuO-NPs, mientras que la genotoxicidad fue evaluada a través del ensayo cometa y micronúcleos, en donde se observó un daño al ADN e incremento en la frecuencia de micronúcleos de manera dependiente de la concentración y la forma de las nanopartículas. Debido a su evidente potencial toxicológico, los autores sugieren que las CuO-NPs podrían ser buenos candidatos como control positivo en ensayos de nanotoxicología.

Debido a que la carga superficial es un parámetro fisicoquímico que altera las propiedades de las nanopartículas, en el año 2018, Líbalová *et al.*, evaluaron la toxicidad de CuO-NPs de aprox. 12 nm en la línea celular de macrófagos RAW264.7 con diferentes modificaciones de superficie como citrato de sodio aniónico (CIT) y ascorbato de sodio (ASC), polivinilpirrolidona neutra (PVP), polietilenimina catiónica (PEI), así como nanopartículas prístinas, los resultados demostraron que las CuO-NPs recubiertas con PEI presentaron una mayor toxicidad, y que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  fueron menos tóxicos que las CuO-NPs. Interesantemente, la toxicidad de las CuO-NPs recubiertas aparentemente no se relaciona de forma directa con la disolución de las partículas ni con la producción de ROS. Los autores concluyen que la toxicidad *in vitro* de las CuO-NPs es producto de interacciones sinérgicas entre las nanopartículas, su disolución y la toxicidad de las moléculas de la cubierta.

Tabla 2. Estudios sobre exposición a nanopartículas de óxido de cobre en modelos *in vitro* e *in vivo* de macrófagos

Características de CuO-NPs	Modelo <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i>	Metodología	Observaciones	Referencias
CuO-NPs con distintas morfologías	Línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 y linfocitos de sangre periférica	Las células fueron expuestas durante 2 y 24 h a concentraciones entre 0.1-100 µg/mL, ensayo cometa y de micronúcleos	-Efecto citotóxico y genotóxico dependiente de la concentración y la morfología de CuO-NPs	Bucchianico <i>et al.</i> , 2013
CuO-NPs de aprox. 12 nm	Línea celular de macrófagos murinos RAW264.7	Viabilidad celular por MTT	-CuO-NPs cubiertas con polietilenimina catiónica presentan mayor toxicidad	Líbalová <i>et al.</i> , 2018
CuO-NPs de aprox. 14 nm	Ratas	Administración vía nasal de una dosis de CuO-NPs a distintas dosis durante 6 horas	-Se presentó inflamación y enfisema pulmonar, alveolitis, bronquiolitis de forma dependiente de la dosis	Gosens <i>et al.</i> , 2016
CuO-NPs de 29.4 nm	Ratones ICR hembras	Exposición vía inhalatoria durante 3 meses de CuO-NPs y citometría de flujo	-Inhalación de las CuO-NPs nm afecta la composición de poblaciones celulares de la inmunidad innata y adaptativa	Holan <i>et al.</i> , 2019
CuO-NPs de 12 nm	Modelo murino de infección pulmonar por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-Exposición por inhalación subaguda e instilación intratraqueal	-Disminución de la capacidad antimicrobiana de macrófagos expuestos a CuO-NPs	Kim <i>et al.</i> , 2011

Los ensayos *in vivo* evidencian el potencial tóxico de las CuO-NPs. Por ejemplo, Gosens *et al.*, en el año 2016, realizaron un estudio en ratas, a las que se les administró por vía nasal una sola dosis de CuO-NPs de aprox. 14 nm. Las dosis utilizadas fueron 0, 0.6, 2.4, 3.3, 6.3 y 13.2 mg/m<sup>3</sup> durante 6 h. Después de 5 días de exposición seguidas de 24 horas sin exposición a CuO-NPs, las ratas presentaron inflamación pulmonar de manera dependiente de la dosis, además, los análisis histopatológicos indicaron alveolitis, bronquiolitis, vacuolación del epitelio respiratorio y enfisema en el pulmón a partir de 2.4 mg/m<sup>3</sup>. Los efectos adversos a causa de la toxicidad desaparecieron en un periodo de 3 semanas post-exposición.

Por otra parte, se ha discutido sobre el impacto en la reactividad inmunológica de la aplicación o inhalación de nanopartículas. En un estudio realizado en el año 2019 por Holan *et al.*, estudiaron por citometría de flujo, la composición de poblaciones celulares de la inmunidad innata y adaptativa presentes en el bazo de ratones expuestos a una inhalación continua de CuO-NPs durante 3 meses en diferentes intervalos de tiempo (3, 14, 42 y 93 días). Los resultados demostraron que la inhalación de las CuO-NPs de 29.4 nm afecta de forma más severa a las células de la inmunidad innata, ya que hubo cambios en la proporción de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y células presentadoras de antígeno. Mientras que los cambios en el porcentaje de las células de inmunidad adaptativa, como linfocitos T y B fueron mínimos; sin embargo, la actividad proliferativa y secretora de linfocitos T aumentó de manera considerable después de 3 días de inhalación y disminuyó después del día 14, tiempo después dichas actividades se normalizaron. Esto sugiere que existe un efecto modulador de las CuO-NPs dependiente del tiempo de inhalación en la producción de citocinas de las células del sistema inmune adaptativo. Los efectos adversos en las células del sistema inmune por la exposición a CuO-NPs pone en evidencia su capacidad de causar inmunotoxicidad. De manera consistente con lo reportado por Gosens *et al.*, 2016, la presencia de CuO-NPs fue detectada en pulmón y bazo. Aunado a esto, Kim *et al.*, 2011, reportaron disminución de la capacidad antimicrobiana de macrófagos expuestos a CuO-NPs de 12 nm mediante vía inhalatoria subaguda (4h/día, 5d/semana, 2 semanas, 3.5 mg/m<sup>3</sup>) e instilación intratraqueal (24 h), la cual afectó la resolución de una infección bacteriana por *Klebsiella pneumoniae* en un modelo murino de infección pulmonar. Por ende, los autores concluyen que las CuO-NPs regulan de manera negativa las funciones efectoras de los macrófagos, y que la exposición a CuO-NPs podría incrementar el riesgo de infección pulmonar.

En resumen, los hallazgos indican el efecto citotóxico, genotóxico e inmunotóxico de las ZnO-NPs y las CuO-NPs en distintos modelos *in vitro* como *in vivo*; sin embargo, es necesario realizar más estudios que establezcan escenarios más reales (exposición subcrónica y crónica a bajas concentraciones), para comprender y lograr elucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo de dichos efectos colaterales.

## 1.2 Justificación

Debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas y al amplio espectro de aplicaciones de los nanomateriales, se estima que para el año 2022 el valor del mercado de la nanotecnología será de aproximadamente 55 mil millones de dólares. Estos datos sugieren un incremento considerable en la incorporación, y, por lo tanto, en la exposición de los consumidores a los nanomateriales. Por ello, el observatorio de nanomateriales de la unión europea ha exhortado a la comunidad científica a centrar sus esfuerzos para determinar la seguridad de nanomateriales de uso cotidiano, ya que pocos estudios se han enfocado en los efectos de la exposición subcrónica y crónica a nanomateriales en concentraciones subtóxicas. Las nanopartículas de ZnO han recibido especial atención en el campo de la nanomedicina debido a sus propiedades antimicrobianas; sin embargo, diversos autores han evidenciado los efectos adversos de las nanopartículas de ZnO, principalmente la inmunotoxicidad. Por otro lado, las nanopartículas de CuO son muy utilizadas en la microelectrónica, sin embargo, ya se ha reportado su genotoxicidad en diversos sistemas biológicos. Otros nanomateriales tienen capacidad inmunomoduladora, generando inflamación y disfunción del sistema inmunológico. A pesar de los efectos secundarios observados en una gran variedad de modelos de estudio causados por los nanomateriales, varios países, entre ellos México, carecen de normatividad y regulación para la producción, venta y desecho de los nanomateriales. Con base en lo anterior, es relevante estudiar el efecto de la exposición aguda y subcrónica a concentraciones subtóxicas de nanopartículas de ZnO y CuO en macrófagos, una de las principales células fagocíticas del sistema inmune innato, para determinar su seguridad o efectos adversos a nivel celular, para tener un panorama general del impacto de esa exposición en los organismos.

## 1.3 Hipótesis

1. La exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de nanopartículas de ZnO y CuO causa estrés celular e induce una serie de respuestas inflamatorias en la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7.
2. La proliferación y capacidad de fagocitosis de los macrófagos murinos expuestos de forma subcrónica a concentraciones subtóxicas de nanopartículas de ZnO y CuO disminuye, comprometiendo así, la capacidad de respuesta de estas células en algunos procesos inmunológicos.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Determinar la respuesta celular a la exposición aguda y subcrónica a concentraciones subtóxicas de nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs) y nanopartículas de CuO (CuO-NPs) en la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

1. Caracterizar el tamaño, potencial zeta y banda de absorbancia de las ZnO-NPs y CuO-NPs.
2. Comparar el efecto de la exposición aguda (24 h) a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs dispersadas por dos distintos protocolos (sonicación y ultrasonicación) en la proliferación de la línea celular de macrófagos RAW264.7.
3. Evaluar el efecto de la exposición subcrónica (48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h) a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs en la proliferación celular de macrófagos RAW264.7.
4. Determinar el efecto de la exposición aguda y subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs en la morfología y función de los macrófagos.
5. Estudiar la capacidad de internalización (fagocitosis) de los macrófagos expuestos subcrónicamente a concentraciones subtóxicas de las ZnO NPs y CuO NPs.
6. Evidenciar cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta celular y funciones inmunológicas de macrófagos expuestos de manera subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Preparación de ZnO-NPs y CuO-NPs

Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) y de óxido de cobre (CuO-NPs) fueron donadas por el Sistema Nacional de Evaluación Nanotoxicológica (SINANOTOX) y sintetizadas por US Research Nanomaterials, Inc. Ambas nanopartículas presentan una pureza mayor al 99% y se encuentran cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). El tamaño reportado por el proveedor para las ZnO-NPs es de 10-30 nm, mientras que para las CuO-NPs es de 25-55 nm. Para su empleo en los experimentos, fue preparada una solución madre a una concentración de 1 mg/mL de ZnO-NPs y CuO-NPs en agua desionizada miliQ. Se utilizaron dos distintos protocolos de dispersión, que consistieron en: 1) sonicación durante 30 min y 2) ultrasonificación durante 15 min en periodos de 5 min al 30% con intervalos de 9.9 segundos encendidos y 9.9 segundos apagados. Después de su utilización, la solución madre fue mantenida en refrigeración y oscuridad.

### 2.2 Caracterización fisicoquímica de las ZnO-NPs y CuO-NPs

#### 2.2.1 Determinación de tamaño y potencial zeta por dispersión dinámica de luz (DLS)

Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) y óxido de cobre (CuO-NPs) dispersadas mediante los dos distintos protocolos fueron caracterizadas por medio de dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta, para lo cual se utilizó el equipo Zetasizer de Malvern Instruments Ltda. Para ello, fueron tomados 10  $\mu$ L de la solución madre (1 mg/mL) y fue diluido en 1 mL de agua desionizada mili Q. Posteriormente, un mililitro (mL) de la dilución fue tomado con una jeringa e introducido en una celda de marca Malvern modelo DTS1070. Los resultados fueron analizados mediante el software Zetasizer v7.13.

### **2.2.2 Caracterización de la banda de absorción de las ZnO-NPs y CuO-NPs por espectroscopía UV-Vis**

La caracterización del plasmón de resonancia y de la banda de absorción fue realizada mediante espectroscopía UV-Vis con el equipo Thermo Scientific Multiskan GO 1.00.40. Para las mediciones del espectro, fueron tomados 50  $\mu$ L de la solución madre, diluidos en 1 mL de agua desionizada mili Q y depositados en una celda de cuarzo para espectrofotómetro. Los espectros de absorción se obtuvieron en un intervalo de una longitud de onda de 200 a 800 nm.

### **2.2.3 Visualización de la morfología y tamaño de las ZnO-NPs y CuO-NPs por microscopía electrónica de transmisión**

Para el análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) fue tomada una alícuota de 10  $\mu$ L y se colocó en una rejilla de cobre recubierta de formvar/carbón (malla 75, Ted Pella Inc.). Las muestras de ZnO-NPs y CuO-NPs fueron secadas a temperatura ambiente y analizadas con el equipo de TEM Hitachi H-7500 a 80 Kv. Usando las imágenes obtenidas mediante TEM, se contaron alrededor de 150 partículas para calcular el tamaño promedio de las NPs a través del software ImageJ.

## **2.3 Cultivo de la línea celular de macrófagos RAW264.7**

La línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 fue cultivada en cajas Petri para cultivo celular en condiciones axénicas en medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) suplementado con L-glutamina, antibiótico y 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado durante 30 min a 50°C, el medio fue esterilizado mediante filtración. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, la confluencia y el estado óptimo del cultivo fue revisado cada 24 h mediante un microscopio óptico invertido. Para el mantenimiento del cultivo y los experimentos, las células fueron separadas de la caja de Petri con ayuda de una espátula, y se centrifugaron para resuspender las células en 1 mL de PBS. Posteriormente, fue llevado a cabo el conteo de células mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano, para ello, fue preparada una dilución 1:5 de azul de tripano al 0.4% con la suspensión de células y

se contaron con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico. El número de células por cada mL fue calculado mediante la ecuación:

$$\text{Número de células} \frac{\text{vivas}}{\text{mL}} = \frac{\text{células vivas}}{4} \times \text{factor de dilución} \times 10,000 \times \text{volumen(mL)}$$

## 2.4 Ensayos de exposición aguda de macrófagos a ZnO-NPs y CuO-NPs

En una placa de 96 pozos, se colocaron 10,000 macrófagos RAW264.7 con medio DMEM suplementado por pozo 24 horas previo a la adición del tratamiento. Posteriormente, el medio fue retirado y se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM que contenía las diferentes concentraciones de NPs correspondientes. Se utilizaron como control positivo de proliferación celular únicamente medio DMEM suplementado, como control negativo Tritón-100X al 0.5% en PBS, y los tratamientos consistieron en concentraciones dentro del intervalo entre 1-20  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs y CuO-NPs (dispersadas por sonicación y por ultrasonicación), para seleccionar las concentraciones subtóxicas. Las células se incubaron con los tratamientos de NPs durante 24 h y posteriormente fueron lavadas dos veces con 200  $\mu\text{L}$  de PBS, para medir la viabilidad celular por el método colorimétrico de reducción del MTT. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

### 2.4.1 Ensayo colorimétrico de reducción del MTT para medir viabilidad celular

Para determinar la proliferación celular, fue llevado a cabo el ensayo colorimétrico de reducción de MTT. Una vez transcurrido el tiempo de exposición en que las células fueron incubadas con las diferentes concentraciones de NPs, el medio DMEM con el tratamiento fue retirado, seguido por dos ciclos de lavado con PBS. Acto seguido, fue agregado el reactivo MTT a una concentración del 10% con medio DMEM y se incubó durante 4 horas en oscuridad a 37°C (Berridge y Tan., 1993). Posteriormente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol puro y se mezclaron hasta diluir los cristales de formazán. Por último, la absorbancia fue medida mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 y 690 nm. El porcentaje de viabilidad fue determinado considerando la absorbancia del control positivo (DMEM suplementado) como el 100% de viabilidad. Los resultados se analizaron mediante el software Graphpad

Prism 8, y el efecto hormético fue calculado de acuerdo con lo establecido por Nascarella y Calabrese, 2012.

## **2.5 Ensayos de exposición subcrónica de macrófagos a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs**

En dos placas de 96 pozos, se colocaron 3,000 macrófagos por pozo y se incubaron durante 24 horas con medio DMEM suplementado. Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado con medio DMEM con la concentración correspondiente de NPs. Se utilizaron como controles positivos de proliferación celular únicamente medio DMEM sin rojo fenol suplementado, y como control negativo Tritón-100X al 0.5% en PBS. Para los tratamientos de exposición subcrónica, se seleccionaron con base en la respuesta celular observada las concentraciones subtóxicas de 2,3,4,6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs y CuO-NPs a partir de los resultados de exposición aguda. Macrófagos fueron expuestos hasta 192 horas a las concentraciones de NPs previamente seleccionadas, para ello, cada 24 horas fue cambiado el medio de cultivo con las concentraciones correspondientes (durante las primeras 48 horas se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM con NPs y entre 48 y 192 horas se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  por el aumento de la densidad celular), mientras que el medio retirado fue reservado para realizar el ensayo colorimétrico de Griess que se describe más adelante. La viabilidad celular de macrófagos expuestos durante 24, 48, 72, 96, 120 144, 168 y 192 horas a las concentraciones subtóxicas de NPs fue determinada mediante el ensayo colorimétrico MTT de la misma forma que se describió en la sección 2.4.1. Los resultados fueron analizados mediante el software Graphpad Prism 8, y el efecto hormético fue calculado de acuerdo con lo establecido por Nascarella y Calabrese, 2012.

## **2.6 Análisis del efecto en la morfología y función de los macrófagos de la exposición aguda y subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs y CuO-NPs**

Los macrófagos expuestos de manera aguda y subcrónica a ZnO-NPs y CuO-NPs fueron constantemente monitoreados mediante microscopía óptica. Una vez identificadas las concentraciones y los tiempos de exposición que causan alteraciones en la morfología de los macrófagos, se procedió a

analizar su tamaño y complejidad celular, así como la medición de las especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) con el reactivo 2,7-diclorofluoresceína mediante fluorimetría (Rajesh *et al.*, 2010), evaluación de los niveles de nitritos mediante el ensayo colorimétrico de Griess, potencial de membrana mitocondrial con el reactivo JC-1, y su actividad fagocítica a través de retos con bacterias.

### **2.6.1 Medición de la generación de especies de oxígeno altamente reactivas mediante el ensayo fluorimétrico con diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)**

Para evaluar si la exposición subcrónica a ZnO-NPs y CuO-NPs causaba estrés oxidativo en los macrófagos cultivados *in vitro*, se sembraron 3,000 células por pozo y se expusieron a distintas concentraciones (2, 3, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de ZnO-NPs y CuO-NPs durante 15, 24, 40, 48 y 72 h. Cada tratamiento fue realizado por triplicado. Después de ser expuestos a las NPs, los macrófagos fueron lavados dos veces con PBS para eliminar las nanopartículas extracelulares, y posteriormente fueron incubados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante una hora con el reactivo DCFDA en una concentración 27  $\mu\text{M}$  en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados para eliminar el exceso de DCFDA, y los macrófagos fueron incubados 15 min en PBS. Por último, las mediciones se llevaron a cabo mediante el fluorímetro Agilent UV-VIS-NIR a una longitud de onda de excitación de 485 y 530 nm de emisión. Los macrófagos teñidos con DCFDA sin tratamiento fueron utilizados como control negativo y tomados como referencia de la cantidad de ROS basal (100%). Se realizaron tres experimentos independientes con sus triplicados internos, los datos fueron analizados estadísticamente a través de una ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Dunnett.

### **2.6.2 Ensayo colorimétrico de Griess para la medición de la producción de óxido nítrico**

Con la finalidad de medir los niveles de las especies de nitrógeno, se procedió a realizar el ensayo colorimétrico de Griess, el cual mide de forma indirecta la producción de óxido nítrico a través de sus productos de degradación como los nitritos. Para ello, el ensayo de exposición debe realizarse en medio DMEM sin rojo fenol. Primeramente, fue realizada una curva de referencia estándar de la absorbancia con concentraciones conocidas de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>). Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del medio por pozo de cada tratamiento, seguido de 100  $\mu\text{L}$  de nitroprusiato de sodio 6 mM y se mantuvieron 60 min en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, fueron agregados 125  $\mu\text{L}$  de solución de Griess, se

incubaron durante 15 min en oscuridad, y por último la absorbancia fue medida a 540 nm (Hensley *et al.*, 2003). Se realizaron tres experimentos independientes con sus triplicados internos. Los resultados se analizaron mediante el software Graphpad Prism 8.

### **2.6.3 Medición mediante citometría de flujo del tamaño y la complejidad celular de los macrófagos expuestos a ZnO-NPs**

Los macrófagos expuestos desde 24 h hasta 192 h a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs fueron separados de sus pozos y analizados mediante citometría de flujo con el equipo Attune™ NxT Flow Cytometer. Se midió el tamaño de las células usando los valores de la desviación del láser frontal (Forward scatter, FSC) y para determinar la complejidad celular se utilizó el valor de la desviación del láser lateral (Side Scatter, SSC). Para determinar los parámetros adecuados para el tamaño relativo (FSC) y la complejidad interna relativa (SSC), se utilizaron macrófagos sin tratamiento y únicamente cultivos en medio DMEM. El análisis estadístico consistió en una ANOVA de dos vías seguido por una prueba a *posteriori* de Dunnett.

### **2.6.4 Ensayo de fagocitosis**

#### **2.6.4.1 Preparación de medio Luria-Bertani y cultivo de *Escherichia coli*-GFP**

Para preparar el medio de cultivo para bacteria Luria-Bertani (LB), fueron agregados 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl en 1 litro de agua MQ y el medio fue esterilizado mediante autoclave 20 min a 121°C. Las bacterias *Escherichia coli* transformadas con el plásmido que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) y resistente a ampicilina fue preinoculada en medio LB líquido adicionado con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Ampicilina como medio de selección, después de 24 h de incubación a 37°C con agitación, 50  $\mu\text{L}$  de preinoculo fueron adicionados en 50 mL de medio LB con ampicilina, y fue incubado hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm, posteriormente, fue adicionado el inductor para la expresión de proteínas IPTG a una concentración final 1 mM para inducir la expresión de la GFP, el cultivo fue incubado aprox. 24 horas a 37°C con agitación. La expresión de GFP fue confirmada mediante la visualización de su fluorescencia en UV. Para los ensayos posteriores, se realizó una dilución con la finalidad de obtener una densidad óptica entre 0.8-1 a 600 nm, densidad a la cual se asume que hay entre  $1-1.5 \times 10^8$  *E. coli* GFP.

#### 2.6.4.2 Estandarización del ensayo de fagocitosis

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para el ensayo de fagocitosis, se utilizaron distintas proporciones de bacterias por macrófago (3:1, 6:1 y 10:1) y se emplearon distintos tiempos de incubación (1 h, 2h y 3h). Las variables a considerar para la selección de los parámetros fue la fluorescencia emitida en color verde causada por la presencia de bacterias-GFP fagocitadas por los macrófagos, las cuales se detectaron por citometría de flujo utilizando el láser BL1-A. Además de delimitó la población de macrófagos por su fluorescencia en el eje de las X y por la complejidad interna (SSC-A) en el eje Y. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 48.

#### 2.6.4.3 Reto de macrófagos expuestos a ZnO-NPs contra *E. coli* GFP

Macrófagos expuestos desde 24 hasta 120 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, fueron retados con *E. coli* GFP en una proporción 6:1 (6 bacterias por cada macrófago). Para ello, los macrófagos expuestos a ZnO-NPs fueron separados de su pozo con una espátula y contados mediante el ensayo de exclusión de azul tripano, posteriormente, se sembraron 10,000 macrófagos por pozo, y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión a la placa, después, se adicionaron 60,000 *E. Coli*-GFP por pozo y se incubaron durante 3 horas. Por último, los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS para eliminar las bacterias no fagocitadas, se separaron los macrófagos de la placa, se lavaron tres veces con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo como se mencionó en la sección anterior. Los valores de fluorescencia obtenidos de las muestras de macrófagos sin tratamiento y retados con *E. Coli*-GFP fueron tomados como el 100% de fagocitosis. El análisis estadístico consistió en una ANOVA de dos vías seguido por una prueba *a posteriori* de Dunnett.

#### 2.6.4.4. Papel de los iones zinc en la viabilidad y las funciones de los macrófagos

Para determinar si las respuestas celulares observadas en los macrófagos son causadas únicamente por los iones  $\text{Zn}^{2+}$ , se determinó la viabilidad celular, los niveles de ROS y la capacidad fagocítica de macrófagos expuestos durante distintos tiempos a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs en presencia de un agente quelante (EDTA 1 mM), y también se usaron las mismas concentraciones de  $\text{ZnCl}_2$  como fuente de iones zinc, empleando los métodos descritos anteriormente.

### 2.6.5 Determinación del potencial de membrana mitocondrial con el fluoróforo JC-1 en los macrófagos expuestos a ZnO-NPs

Los macrófagos fueron cultivados en una placa negra con fondo transparente de 96 pozos y expuestos a distintas concentraciones de ZnO-NPs durante 40, 96 y 120 h y se incubaron con el reactivo JC-1 a una concentración 10  $\mu$ M durante 30 min, después se agregaron 2  $\mu$ L del fluorocromo Hoechst 33342 para teñir el núcleo y se incubaron por 30 min y se incubaron por 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido el tiempo, los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS, y visualizados a través de un microscopio láser confocal Olympus FV100. El número de apertura empleado fue de 0.75, con una magnitud de 20X, 3 láseres de excitación con longitudes de onda de 405 nm (azul), 488 nm (verde) y 543 nm (rojo) (filtro Hoechst 33342, FITC y yoduro de propidio, respectivamente). Para el análisis de las imágenes, se calculó el coeficiente de Pearson para determinar la colocalización de monómeros (verde) y agregados (rojo) de JC-1, y la fluorescencia celular total corregida (CTCF, por sus siglas en inglés) mediante el software Fiji de ImageJ. Para este último parámetro, se determinó la densidad integrada (IntDen) y el área seleccionada por célula de al menos 100 células por tratamiento para cada láser (FITC, yoduro de propidio), y la fluorescencia media de fondo. Para calcular la fluorescencia celular total corregida fue empleada la siguiente fórmula:

$$CTCF = IntDen - (\text{área seleccionada} \times \text{fluorescencia media de fondo})$$

Por último, el valor de CTCF promedio por tratamiento para el láser yoduro de propidio (rojo) fue dividido entre el valor de CTCF promedio por tratamiento para el láser FITC para determinar el ratio y comparar los tratamientos con respecto al control.

### 2.7 Determinación de los niveles de iones con el fluoróforo Phen Green SK en macrófagos expuestos a ZnO-NPs

Con la finalidad de determinar si la exposición subcrónica a ZnO-NPs causa alteraciones en los niveles de iones (especialmente iones Zn<sup>2+</sup>) en macrófagos, y cómo éstos se relacionan con las respuestas celulares, se utilizó el reactivo Phen Green SK y su fluorescencia fue analizada por microscopía láser confocal. Los macrófagos expuestos a ZnO-NPs fueron incubados con Phen Green SK a una concentración final de 1.41 mM durante 10 minutos a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente fueron lavados con PBS y se

agregó el fluoróforo FM-464 a una concentración de 0.05 µg/mL para delimitar la membrana celular. Para el análisis por microscopía confocal, se emplearon los siguientes parámetros: número de apertura=0.75, con una magnitud de 20X, 2 láseres de excitación con longitudes de onda de 488 nm (verde) y 561 nm (rojo) (filtro FITC y Texas Red, respectivamente). Los resultados se analizaron por GraphPad Prism 8, con un análisis estadístico de ANOVA de una vía con una prueba posterior de Dunnett.

## 2.8 Extracción de ARN de los macrófagos y RT-qPCR

Para identificar cambios en la expresión de genes específicos en respuesta a la exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs en macrófagos, fue realizada la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qpCR). Para ello, el ARN de macrófagos expuestos durante 40, 96 y 120 horas fue extraído con el reactivo TRIzol Reagent de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ARN extraído fue cuantificado y su calidad fue evaluada mediante la relación de la absorbancia a 260/280 nm con ayuda del equipo NanoDrop. Posteriormente, fue utilizado el kit DNase I de Sigma-Aldrich para degradar el ADN genómico remanente en el ARN extraído, para ello, se adicionaron 1 µL de Reaction Buffer DNase 1, 1 U de DNase I en 2 µg de ARN y agua estéril libre de ARNasas hasta un volumen final de 10 µL, y fue incubado durante 15 minutos a 25°C, después se agregó 1 µL de Stop solution y se incubó a 70°C por 10 minutos seguido de 5 minutos de incubación en hielo para desnaturalizar la enzima. El volumen de reacción fue incrementado a 100 µL para llevar a cabo una segunda etapa de precipitación del ARN con acetato de sodio 3 M pH 5.2. La conversión de ARN mensajero a ADN complementario fue realizada a través de la PCR retrotranscriptasa empleando el kit PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) de Takara Bio siguiendo el siguiente protocolo: 4 µL de 5X PrimerScript buffer, 1 µL de Enzyme mix, 1 µL de Oligo dT, 4 µL de Random 6 mers, 1 µg de ARN y agua estéril libre de ARNasas en un volumen final de 20 µL por reacción, la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 minutos, seguido de una etapa de inactivación (85°C, 5 segundos) y mantenimiento a 4°C.

Una vez culminada esta etapa, el ADNc fue sometido a un tratamiento con ARNasa I a una concentración de 0.7 U a 37°C durante 20 min por muestra, para eliminar el ARN remanente. Por último, el ADNc fue nuevamente cuantificado y evaluada su calidad para proceder a la estandarización de la qPCR.

Para la estandarización de la qPCR, primeramente, se realizaron PCR *in silico* para determinar que los oligonucleótidos fueran adecuados para la correcta amplificación, el tamaño del amplicón, la

temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) y la probabilidad de presentar hibridación entre los oligonucleótidos. Para lo anterior fueron empleados los softwares SerialCloner 2.6 y PerlPrimer v1.1.21. Las características de los oligonucleótidos se resumen en la tabla 3.

Posteriormente, de acuerdo con los datos obtenidos previamente, se seleccionaron los mejores parámetros para realizar PCR punto final con gradiente de temperatura y asegurar de manera experimental que la amplificación se lleve a cabo de la forma esperada. Se agregaron 200 ng de ADNc, 2  $\mu$ L de Buffer de reacción 10X, 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido (forward y reverse), 0.2 mM de cada dNTP, 5 U de Taq polimerasa en un volumen final de 20  $\mu$ L, y las condiciones de las etapas de PCR para cada par de oligonucleótidos se presentan en la tabla 4. Para observar si se presenta hibridación de oligonucleótidos en la temperatura óptima, se agregó una reacción sin ADNc para cada par de oligonucleótidos, mientras que las reacciones con ADNc se sometieron a un gradiente de temperatura entre 65-75°C para determinar las mejores condiciones de reacción. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis de agarosa y visualizados mediante luz UV, en donde se observó que no hay hibridación de nucleótidos y que los oligonucleótidos amplifican adecuadamente de acuerdo con el tamaño de amplicón esperado.

El siguiente paso consistió en realizar la PCR cuantitativa utilizando distintas diluciones de ADNc de cada muestra por triplicado (1/10, 1/100, 1/1,000 y 1/10,000) para determinar la concentración más óptima, se utilizó agua como control negativo de amplificación. Con base en lo anterior, fue seleccionada la dilución 1/10 de ADN (100 ng) para las reacciones posteriores. Para llevar a cabo la qPCR fue empleado el kit Maxima SyBrGreen/ROX qPCR Master Mix de Thermo Scientific™ como se describe a continuación: 5  $\mu$ L de Maxima SyBrGreen Master mix, 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 100 ng de ADNc y agua estéril libre de ARNasas y ADNasas hasta un volumen final de 10  $\mu$ L por reacción, siguiendo las condiciones descritas para la PCR punto final de la tabla 4.

Para las posteriores qPCR, el gen constitutivo  $\beta$ -actina fue utilizado como gen de referencia, y el  $\log_2$ FoldChange fue calculado a partir de las siguientes formulas:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen de interés}) - Ct (\text{gen de referencia})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{gen de interés}) - \Delta Ct \text{ promedio (gen de referencia)}$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

El análisis estadístico consistió en ANOVA de una vía seguida por una prueba posterior de Dunnet para evaluar cambios significativos en log<sub>2</sub> fold change con respecto al control.

**Tabla 3.** Características de los oligonucleótidos utilizados en este estudio

Gen	Secuencia de oligonucleótido	Longitud	T <sub>m</sub> (°C)	Longitud del amplicón
β-actina	F: GTG GGC CGC CCT AGG CAC CAG	21	72.37	603 nt
	R: GGA GGA AGA GGA TGC GGC AGT	24	66.84	
IL-6.1	F: GAGGATACCACTCCCAACAGACC	23	64.44	141 nt
	R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	24	61.63	
IL-1β	F: CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC	20	58.74	447 nt
	R: CAGGATGAGGACATGAGCACC	21	63.03	
IL-10	F: CTGAGGCGCTGTCATCGATTCTC	24	66.1	106 nt
	R: TGGCCTGTAGACACCTTGGTCTT	24	66.23	
iNOS	F: GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC	20	60.02	325 nt
	R: GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT	20	60.38	
TGF-β	F: CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG	24	64.95	128 nt
	R: GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT	24	64.80	
TNF-α	F: TTGACCTCAGCGCTGAGTTG	20	63.21	374 nt
	R: CCTGTAGCCCACGTCGTAGC	20	65.2	

\*F: forward o secuencia 5'-3'; R: reverse

**Tabla 4.** Condiciones de PCR de cada par de oligonucleótidos.

Gen	Etapa 1 (1X)	Etapa 2 (30X)			Etapa 3 (1X)
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
$\beta$ -actina	94°C, 4 minutos	94°C, 30 segundos	73.1°C, 30 segundos	72°C, 2 minutos	4°C ( $\infty$ )
IL-6.1	94°C, 4 minutos	94°C, 30 segundos	67°C, 30 segundos	72°C, 2 minutos	4°C ( $\infty$ )
IL-1 $\beta$	94°C, 4 minutos	94°C, 30 segundos	67°C, 30 segundos	72°C, 2 minutos	4°C ( $\infty$ )
IL-10	94°C, 4 minutos	94°C, 30 segundos	68.7°C, 30 segundos	72°C, 2 minutos	4°C ( $\infty$ )
iNOS	94°C, 4 minutos	94°C, 30 segundos	65°C, 30 segundos	72°C, 2 minutos	4°C ( $\infty$ )
TGF- $\beta$	94°C, 4 minutos	94°C, 30 segundos	67°C, 30 segundos	72°C, 2 minutos	4°C ( $\infty$ )
TNF- $\alpha$	94°C, 4 minutos	94°C, 30 segundos	68.7°C, 30 segundos	72°C, 2 minutos	4°C ( $\infty$ )

\*X= Número de ciclos

## Capítulo 3. Resultados

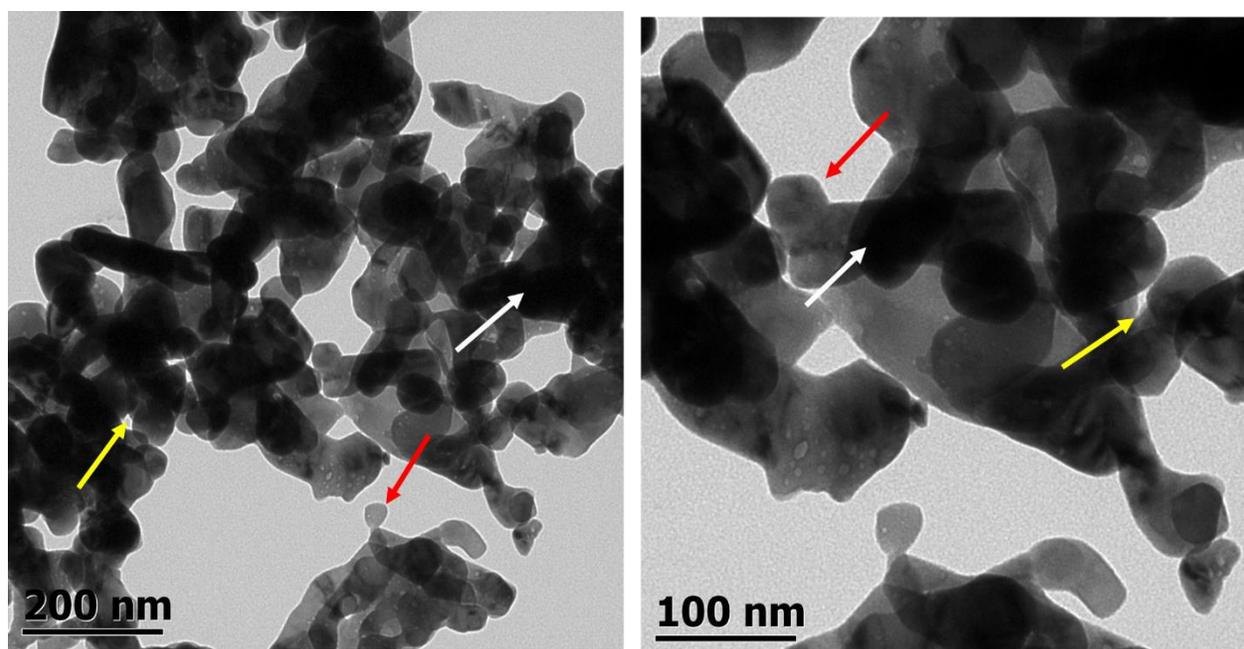
### 3.1 Caracterización fisicoquímica de las CuO-NPs

Con la finalidad de conocer las características fisicoquímicas de las nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs), se realizaron mediciones mediante microscopía electrónica de transmisión, dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopía UV-Vis, los resultados se resumen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Características fisicoquímicas de CuO-NPs dispersadas mediante sonicación y ultrasonicación utilizadas en este estudio.

Método de dispersión de las CuO-NPs	Diámetro reportado por el proveedor (nm)	Radio hidrodinámico promedio por DLS (nm)	Potencial Zeta (mV)	Banda de absorción (nm)
CuO-NPs sonicadas	25-50 nm	1170±347.3	-17.2±5.19	277.22
CuO-NPs ultrasonicadas	25-50 nm	825.4±312.6	-36.7±4.41	275.11

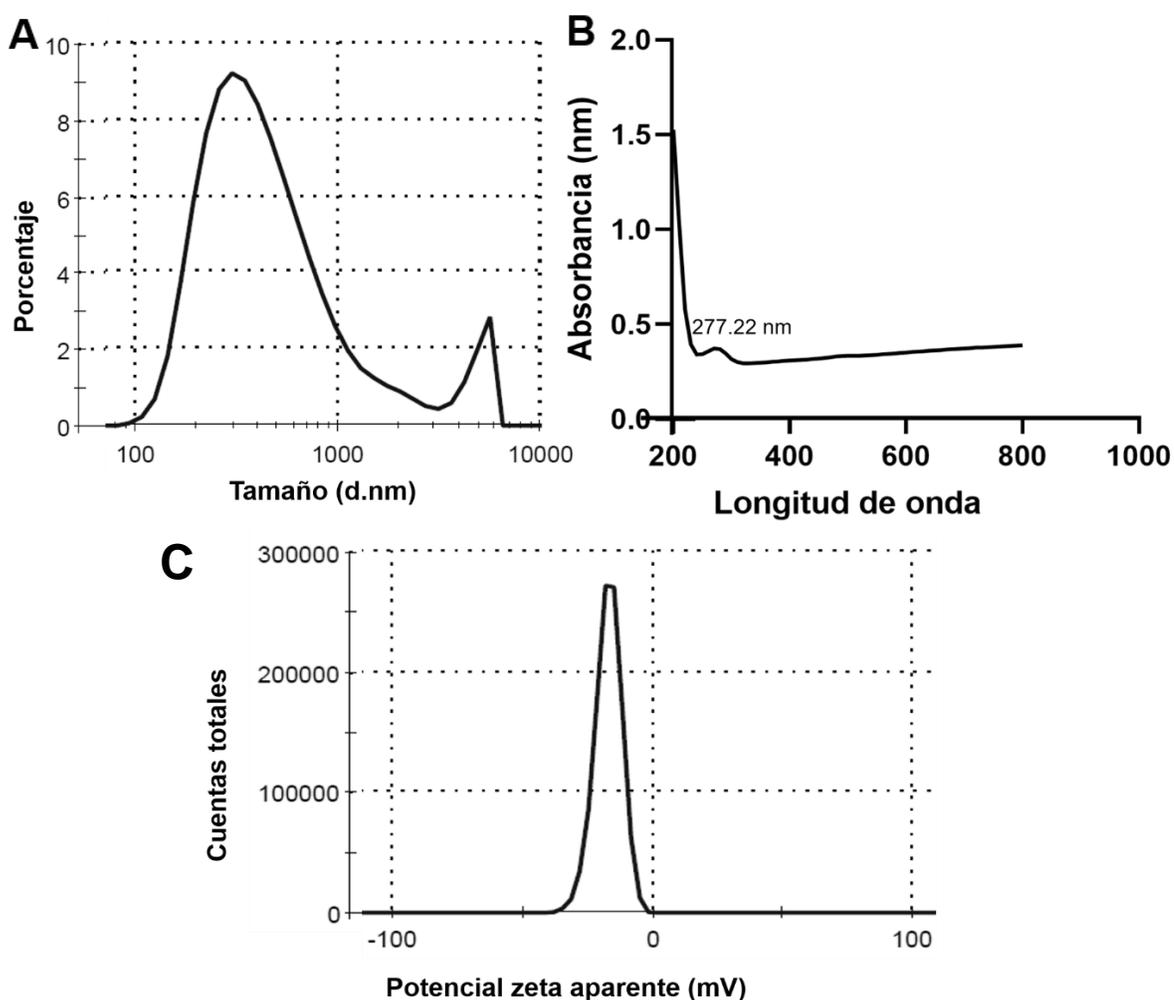
Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (figura 6) de las CuO-NPs muestran partículas de tamaño y morfología variable, así como una alta tendencia a la aglomeración/agregación.



**Figura 6.** Micrografía de nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. Las flechas rojas señalan las partículas de menor tamaño, las amarillas indican vacíos entre los agregados/aglomerados, y las flechas blancas apuntan a zonas de alta densidad electrónica.

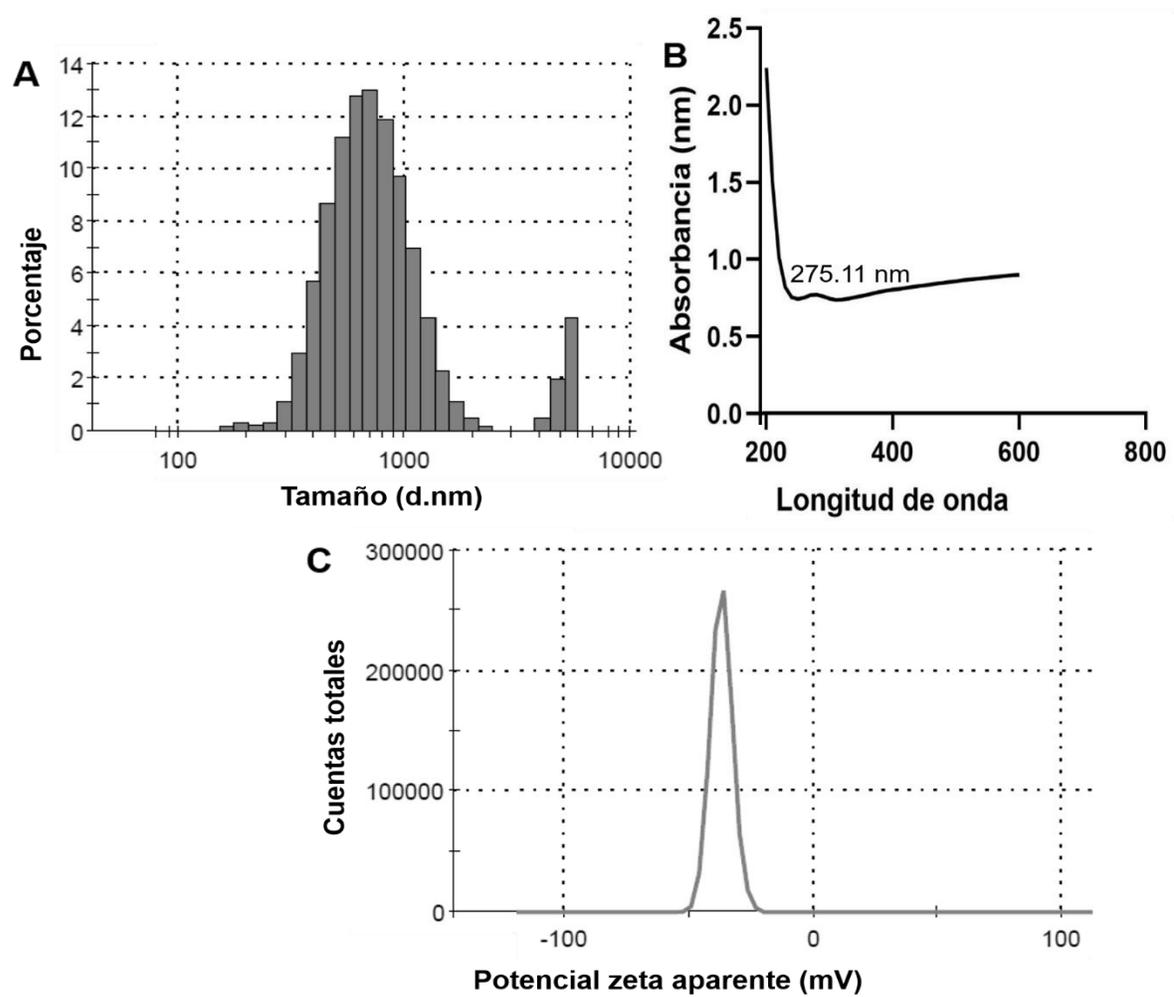
Algunas de las partículas coinciden con el tamaño reportado por el proveedor, no obstante, estas se encuentran aglomeradas. El análisis de las imágenes a través del software ImageJ indica un tamaño promedio de  $38.74 \pm 11.5$  nm, similar al proporcionado por el proveedor.

En la figura 7A, se observa una distribución de tamaño de partícula amplia, que va desde los 100 nm hasta cerca de 6000 nm, el radio hidrodinámico de las CuO-NPs sonicadas indica un tamaño promedio de  $1170 \pm 347.3$  nm, lo que sugiere una alta aglomeración/agregación. La banda de absorción de las nanopartículas presenta dos bandas de absorción localizadas en 200 nm y aprox. 277.22 nm, características para nanopartículas de CuO (Berra *et al.*, 2018) (figura 7B).



**Figura 7.** Caracterización del diámetro hidrodinámico, banda de absorción y potencial zeta de nanopartículas de CuO dispersadas mediante sonicación. El radio hidrodinámico promedio es de  $1170 \pm 347.3$  nm (A); la banda de absorción presenta una señal en 277.22 nm (B), mientras que el potencial zeta es de  $-17.2 \pm 5.19$  mV (C).

La presencia de dos bandas de absorción podría deberse a la diversidad de tamaño y forma de nanopartículas por la aglomeración. Las CuO-NPs dispersadas por sonicación, tienen un potencial zeta de  $-17.2 \pm 5.19$  mV (figura 7C), lo que sugiere poca estabilidad debido a una baja repulsión electrostática entre partículas. Esto es consistente con los grandes tamaños de partícula analizados por TEM y DLS, ya que la baja repulsión podría causar la aglomeración/agregación de nanopartículas, dando lugar a partículas de tamaño considerable en el orden de micras. Los análisis mediante dispersión dinámica de luz de las CuO-NPs dispersadas por ultrasonificación muestran una gran variedad de tamaños de partícula que van desde los aprox. 170 nm hasta 6000 nm, con un diámetro hidrodinámico promedio de  $825.4 \pm 312.6$  nm (figura 8A); mientras que se presenta una ligera señal de la banda de absorción en 275.11 nm. El potencial zeta de estas CuO-NPs tiene un gran valor negativo ( $-36.7 \pm 4.41$  mV) lo que indica que las partículas presentan alta estabilidad; sin embargo, los grandes tamaños de partícula observados por las micrografías del TEM, sugieren aglomeración/agregación.



**Figura 8.** Caracterización del diámetro hidrodinámico, banda de absorción y potencial zeta de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonificación. El tamaño promedio es de  $825.4 \pm 312.6$  nm (A) con una señal en 275.11 nm correspondiente a la banda de absorción típica para CuO-NPs (B) y un potencial zeta de  $-36.7 \pm 4.41$  mV (C).

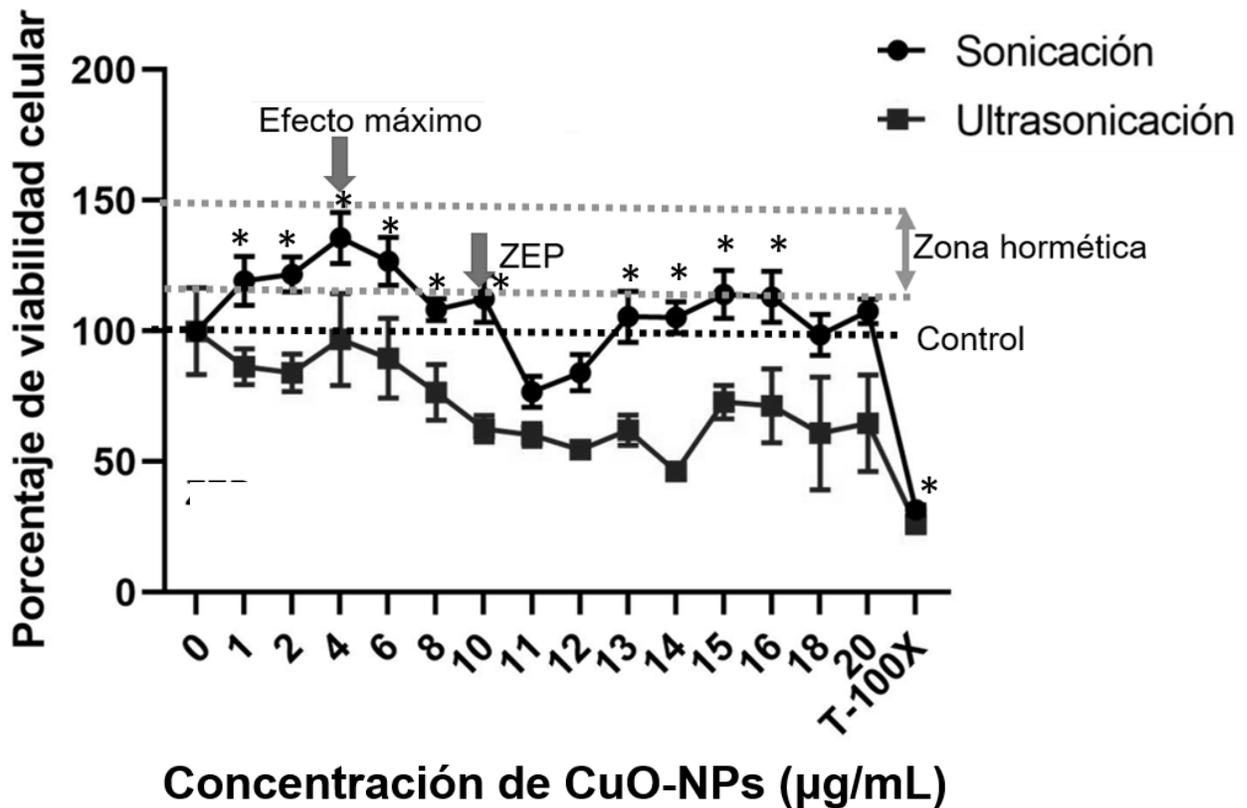
### 3.2 Efecto de la exposición aguda a distintas concentraciones de CuO-NPs en la viabilidad celular de macrófagos RAW264.7

En la figura 9 se presenta el porcentaje de viabilidad de macrófagos (eje Y) expuestos durante 24 h a distintas concentraciones (eje X) de CuO-NPs dispersadas mediante sonicación (●) y ultrasonicación (■). La gráfica presenta un comportamiento bimodal, en donde las concentraciones de 11 y 12  $\mu\text{g/mL}$  muestran una ligera toxicidad, seguida por concentraciones superiores que no presentan toxicidad (13,14, 18 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ) ya que la viabilidad es igual a la del control. En las concentraciones de a 15 y 16  $\mu\text{g/mL}$  de CuO-NPs, éstas ocasionan un ligero incremento en la viabilidad de los macrófagos con respecto al control de las células sin tratamiento; sin embargo, este no es estadísticamente significativo.

Por otro lado, los macrófagos expuestos a concentraciones de 1-6  $\mu\text{g/mL}$  de CuO-NPs dispersadas mediante sonicación, muestran un porcentaje de viabilidad superior al control, esta respuesta celular se conoce como hormesis. La hormesis es una respuesta adaptativa de los sistemas biológicos a un estímulo moderadamente estresante, a través del cual el sistema mejora su funcionalidad y/o tolerancia a desafíos posteriores de mayor intensidad. La hormesis es considerada como una medida de resiliencia por sobrevivir y adaptarse al entorno, e incluso se ha definido como una estrategia evolutiva que depende de la plasticidad biológica (Calabrese y Mattson, 2017). El efecto hormético se caracteriza por una curva de dosis-respuesta en forma de U invertida, en donde se obtiene un intervalo de bajas concentraciones que causan un estímulo de mínimo el 10% por encima del control, seguido por concentraciones superiores que causan una reducción en la viabilidad de al menos 20% por debajo del control, lo que se define como respuesta tóxica, mientras que la zona hormética se describe como el ancho de la región estimulante, y se localiza 10% por encima del control (Nascarella y Calabrese, 2012). El modelo de hormesis descrito por Nascarella *et al.*, 2009 se muestra en la figura 46.

Interesantemente, los macrófagos expuestos a las CuO-NPs dispersadas mediante ultrasonicación no sólo no exhiben un efecto hormético, sino que además tienen un efecto tóxico superior que las dispersadas mediante sonicación, ya que desde 8  $\mu\text{g/mL}$  se aprecia una disminución en la viabilidad superior al 20% con respecto al control. Lo anterior sugiere que las características fisicoquímicas principalmente el tamaño de partícula, juegan un papel clave en la toxicidad de las nanopartículas y la respuesta celular suscitada debido a la exposición, ya que aparentemente, nanopartículas de la misma naturaleza pueden causar distintos efectos en las células.

Con base en lo anterior, para los estudios posteriores de exposición subcrónica se seleccionaron las concentraciones de 2, 3, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{CuO}$ -NPs dispersadas mediante ultrasonificación debido a su baja toxicidad, las cuales se conocen como concentraciones subtóxicas.

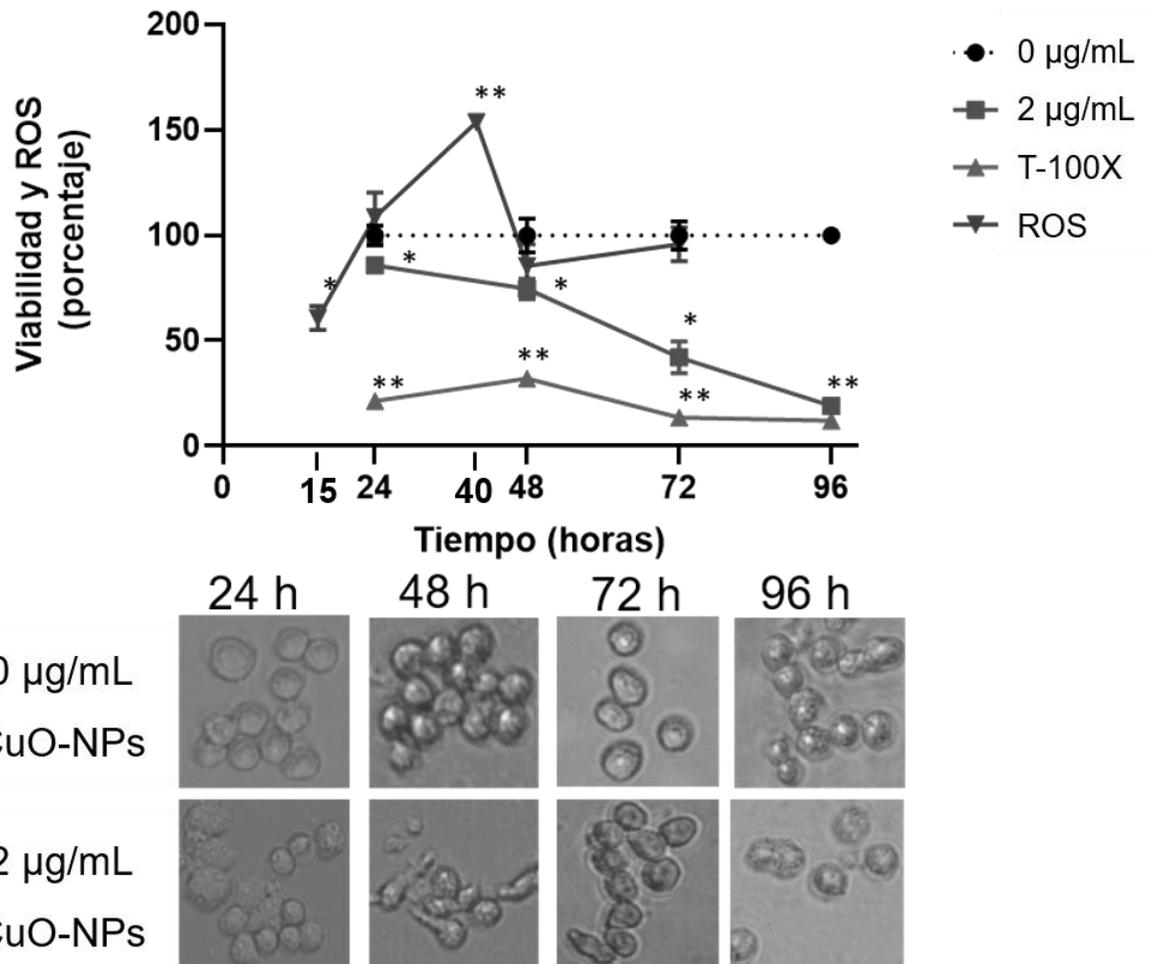


**Figura 9.** Viabilidad de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos durante 24 horas a concentraciones entre 1-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanopartículas de  $\text{CuO}$  dispersadas mediante sonicación y ultrasonificación. Macrófagos expuestos a  $\text{CuO}$ -NPs sonicadas presentan un efecto hormético a bajas concentraciones (1-6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ),  $*<0.05$ . ZEP=Punto cero equivalente; T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

### 3.3 Efecto de la exposición subcrónica a $\text{CuO}$ -NPs en la viabilidad, morfología y respuestas celulares de macrófagos RAW264.7

Se evaluó el efecto de la exposición subcrónica a  $\text{CuO}$ -NPs ultrasonificadas en macrófagos expuestos durante 96 h a 2, 3, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La producción de ROS, nitritos y viabilidad celular fue medida constantemente y la morfología celular fue monitoreada por microscopía óptica. Como control de viabilidad celular, fue empleado medio DMEM suplementado sin tratamiento con nanopartículas (●), como control negativo de viabilidad se utilizó Tritón-100X al 0.5% en PBS (▲). Las figuras 10, 11, 12, 13 y 14 muestran los resultados obtenidos a 2, 3, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{CuO}$ -NPs, respectivamente.

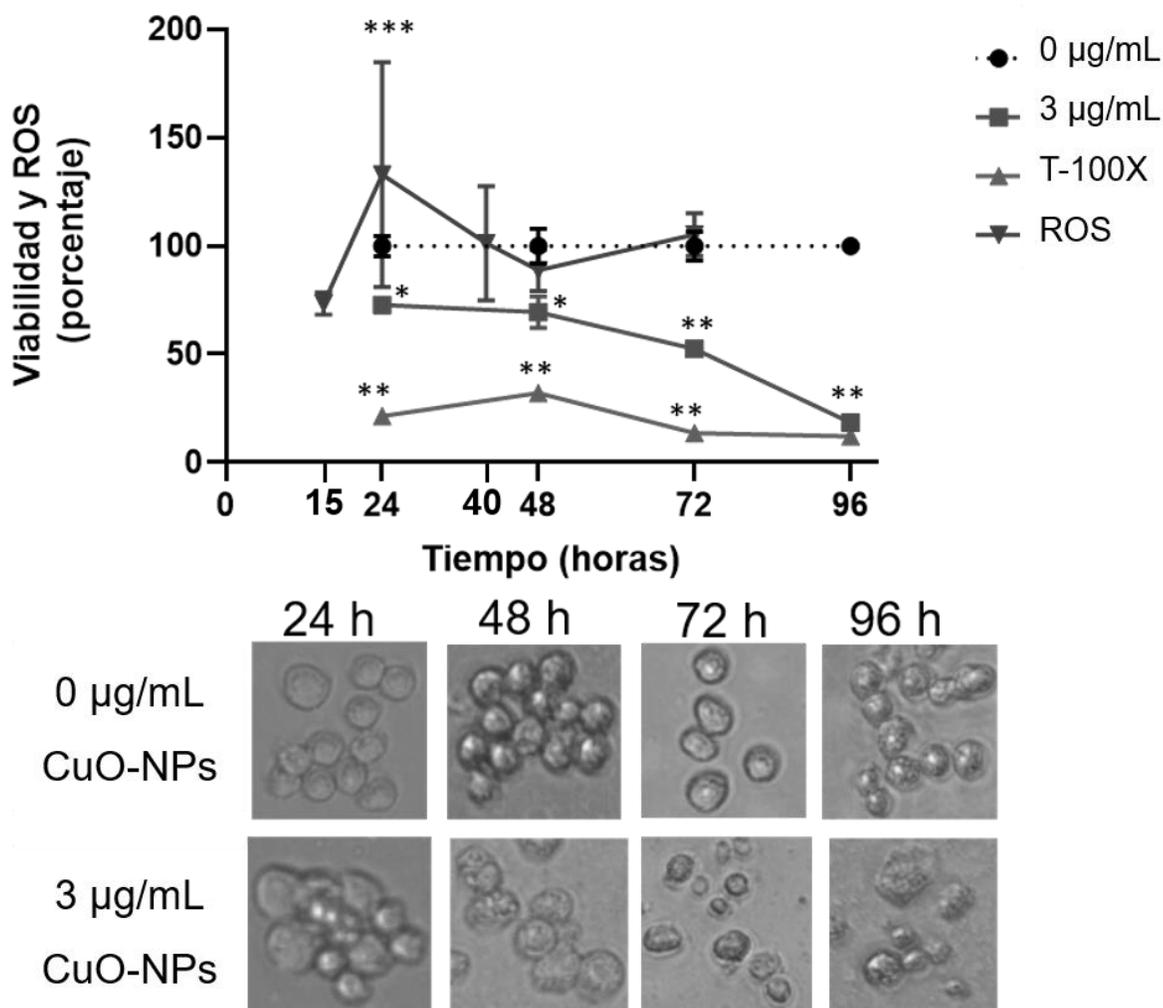
En la figura 10 se observa un ligero efecto tóxico durante las primeras 24 horas de exposición a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{CuO}$ -NPs, cuya intensidad va aumentando con el tiempo hasta reducir considerablemente la viabilidad celular después de las 96 horas de exposición a las nanopartículas.



**Figura 10.** Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanopartículas de  $\text{CuO}$  dispersadas mediante ultrasonificación. Durante las primeras 15 horas, la exposición de los macrófagos a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{CuO}$ -NPs ocasiona una disminución de la producción de ROS, seguido por un considerable incremento a las 40 horas. Sin embargo, esta exposición causa cambios morfológicos y toxicidad a través del tiempo, lo que evidencia su potencial inmunotóxico. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

Por otro lado, durante las primeras 15 horas de exposición a la concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{CuO}$ -NPs, se presenta una disminución en los niveles de ROS, seguido de un incremento considerable a las 40 horas que tiende a normalizarse a las 48 horas. Sin embargo, aparentemente las células no son capaces de

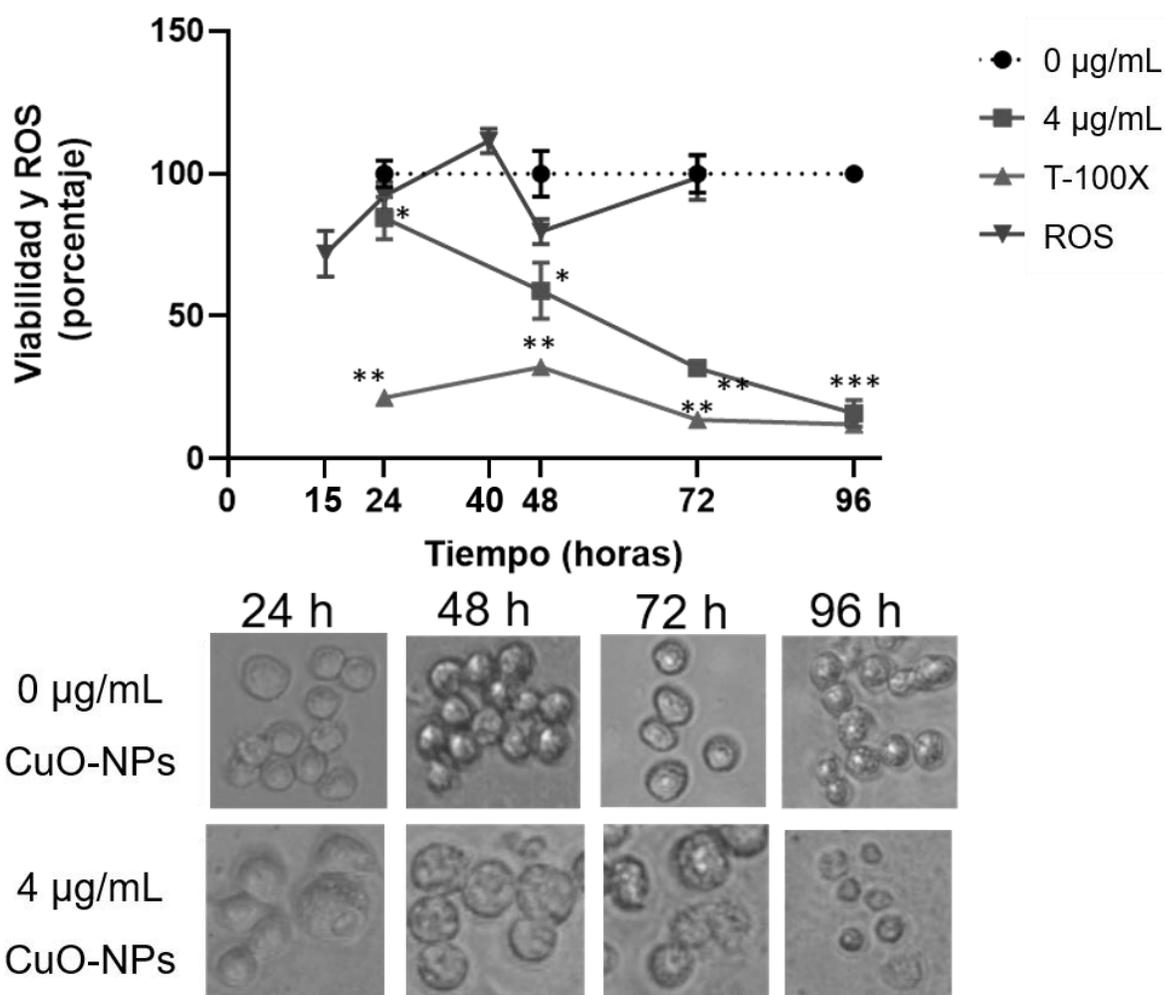
adaptarse, ya que en las micrografías inferiores se aprecia la pérdida de la morfología típica de los macrófagos, disminución del tamaño, presencia de vacuolas, etc. Además, es necesario considerar que, a pesar de que los niveles de ROS sean del 100%, es decir, igual al control, es probable que estas células tengan aumentados sus niveles de ROS debido a la disminución en la viabilidad celular a las 72 horas; es decir, hay un menor número de células que en el control y la fluorescencia del DCFDA es similar.



**Figura 11.** Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 3 µg/mL de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonificación. La exposición a 3 µg/mL de CuO-NPs en macrófagos disminuye durante las primeras 15 horas la producción de ROS, y causa cambios morfológicos y toxicidad a través del tiempo, lo que evidencia su potencial inmunotóxico. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

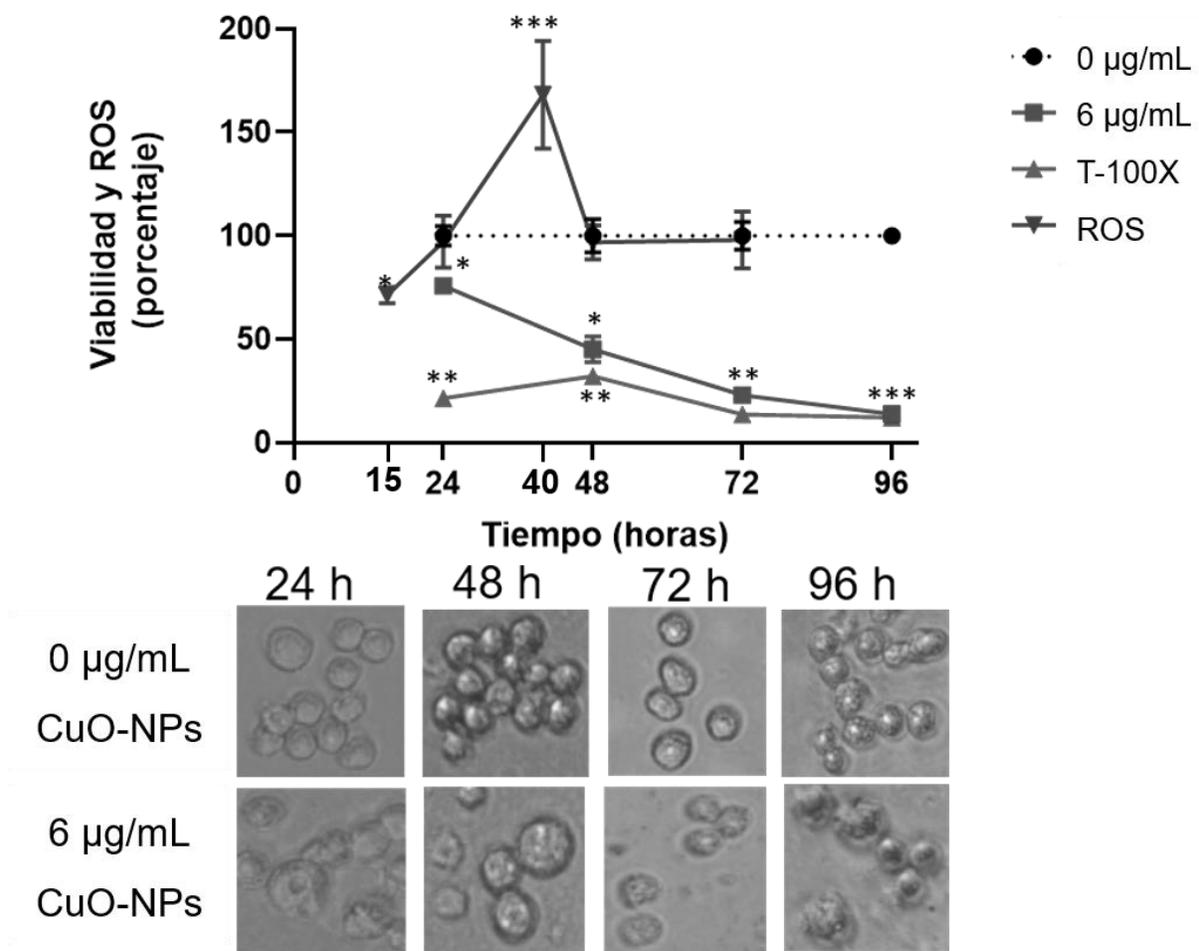
En la figura 11 se observa que la viabilidad de los macrófagos expuestos a 3  $\mu\text{g/mL}$  de CuO-NPs presenta una tendencia similar a los efectos ocasionados por la exposición a 2  $\mu\text{g/mL}$  de CuO-NPs, así como niveles alterados de ROS y severos cambios morfológicos, lo que pone en evidencia la citotoxicidad de las CuO-NPs.

En la figura 12, se muestran los resultados del efecto de la exposición de los macrófagos a 4  $\mu\text{g/mL}$  de CuO-NPs, es posible observar una disminución en la viabilidad evidente a partir de las 48 horas.



**Figura 12.** Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 4  $\mu\text{g/mL}$  de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonificación. La exposición de los macrófagos a 4  $\mu\text{g/mL}$  de CuO-NPs no altera de manera significativa la producción de ROS, y causa cambios morfológicos y toxicidad a través del tiempo, lo que evidencia su potencial inmunotóxico. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

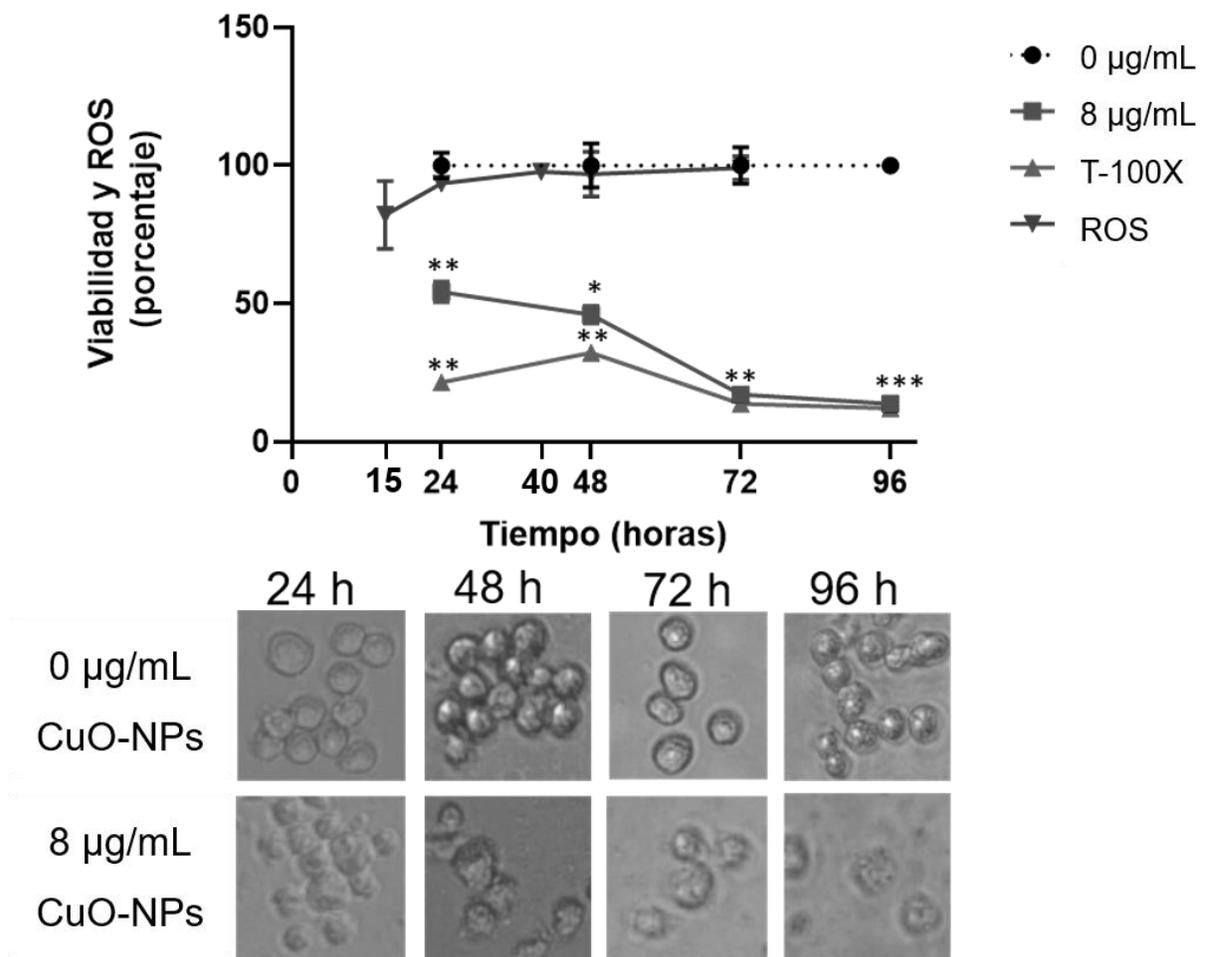
Además, se observan vacuolas desde las primeras 24 horas de exposición y la disminución en el tamaño celular a las 96 horas es muy evidente. Sin embargo, no hay diferencias significativas en los niveles de ROS con respecto al control; aunque hay que tener en cuenta que quizá esto pueda deberse a la diferencia en el número de células debido a la baja viabilidad celular. La viabilidad disminuye gradualmente en macrófagos expuestos a 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CuO-NPs hasta ser prácticamente nula, a su vez, los niveles de ROS disminuyen de manera significativa durante las primeras 15 horas seguido de un aumento considerable a las 40 horas de exposición, y en las micrografías se aprecian cambios que se relacionan con daño celular como pérdida de la morfología y disminución del tamaño (figura 13).



**Figura 13.** Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonificación. La exposición a 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a CuO-NPs en macrófagos disminuye durante las primeras 15 horas la producción de ROS, seguido por un incremento a las 40 h y causa cambios morfológicos y toxicidad a través del tiempo, lo que evidencia su potencial inmunotóxico. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

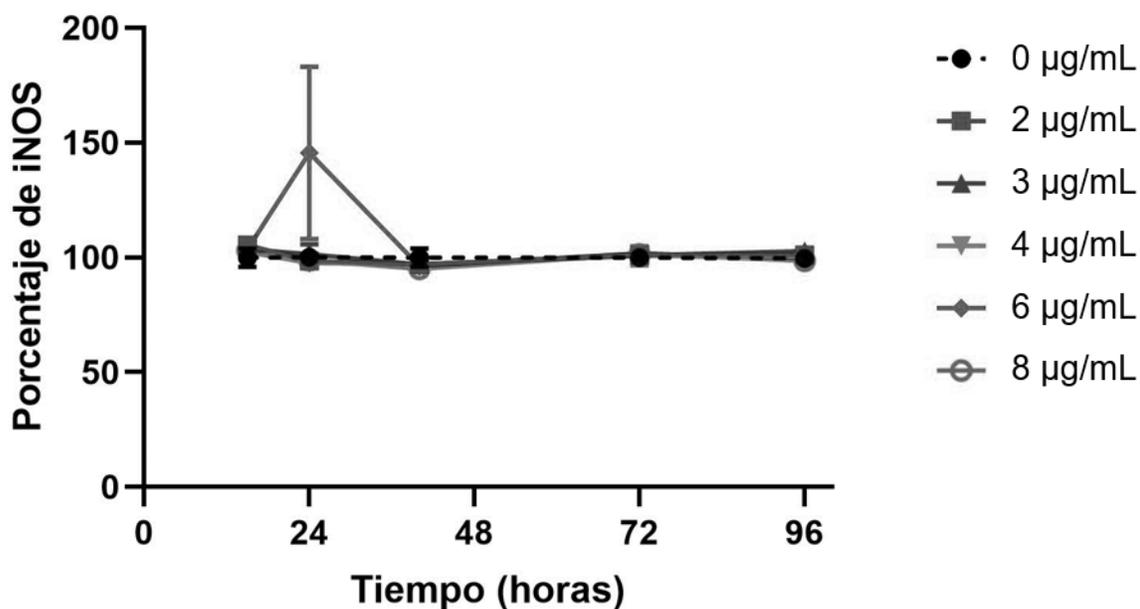
Por último, en la figura 14, se presentan los resultados de la viabilidad celular de los macrófagos expuestos a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la cual es mínima desde las 72 horas, lo que indica que la citotoxicidad es dependiente de la concentración y del tiempo- De manera similar a la figura 10 y 12, los niveles de ROS no presentan diferencias significativas; sin embargo, esto no quiere decir que no sean altos en macrófagos tratados con CuO-NPs.

La citotoxicidad de las CuO-NPs en macrófagos es potencialmente inmunotóxico, debido a que la disminución en el número de macrófagos en un organismo podría alterar de manera negativa las respuestas inmunológicas debido a las funciones esenciales de los macrófagos en la inmunidad innata, en orquestar la inmunidad adaptativa y en el mantenimiento de la homeostasis.



**Figura 14.** Viabilidad y producción de ROS de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanopartículas de CuO dispersadas mediante ultrasonificación. La exposición a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CuO-NPs en macrófagos no altera de manera significativa la producción de ROS, y causa cambios morfológicos y toxicidad a través del tiempo, lo que evidencia su potencial inmunotóxico. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

Con la finalidad de evaluar si la exposición a CuO-NPs puede desencadenar la activación de los macrófagos a través de procesos citotóxicos, se realizó el ensayo de Griess para medir los niveles de especies reactivas de nitrógeno (NOS), y se observó que no hay incremento en la producción de estas especies en ninguna de las concentraciones de CuO-NPs empleadas en este estudio a distintos tiempos de exposición, ya que no hay diferencias significativas entre el control (macrófagos sin tratamiento) y macrófagos expuestos a bajas concentraciones de CuO-NPs (figura 15). Si bien la ausencia de iNOS sugiere que los macrófagos no presentan un fenotipo citotóxico, se requiere realizar experimentos más precisos para determinar si la exposición a CuO-NPs está causando la polarización de macrófagos ya sea hacia un fenotipo M1 (proinflamatorio), M2 (antiinflamatorio) o ninguno de ellos.



**Figura 15.** Concentración de nitritos en medio extracelular de macrófagos expuestos a bajas concentraciones de nanopartículas de CuO. La exposición a bajas concentraciones de CuO-NPs en macrófagos RAW264.7 no tiene efecto en la producción de especies de óxido nítrico.

### 3.4 Caracterización fisicoquímica de ZnO-NPs

Con la finalidad de conocer las características fisicoquímicas de las nanopartículas de óxido de zinc utilizadas en este estudio, se llevó a cabo la caracterización de la morfología y el tamaño mediante microscopía electrónica de transmisión, del radio hidrodinámico y potencial zeta mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y del plasmón de resonancia superficial por espectroscopía UV-Vis, los resultados se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6.** Características fisicoquímicas de ZnO-NPs dispersadas mediante sonicación y ultrasonicación utilizadas en este estudio.

Tipo de nanopartículas	Diámetro reportado por el proveedor (nm)	Diámetro hidrodinámico promedio obtenido por DLS (nm)	Potencial Zeta (mV)	Plasmón de resonancia (nm)
ZnO-NPs sonicadas	10-30 nm	405.3±443.6	-11.8±5.88	372.22
ZnO-NPs ultrasonicadas	10-30 nm	677.4±264.3	-3.61±5.19	369.4

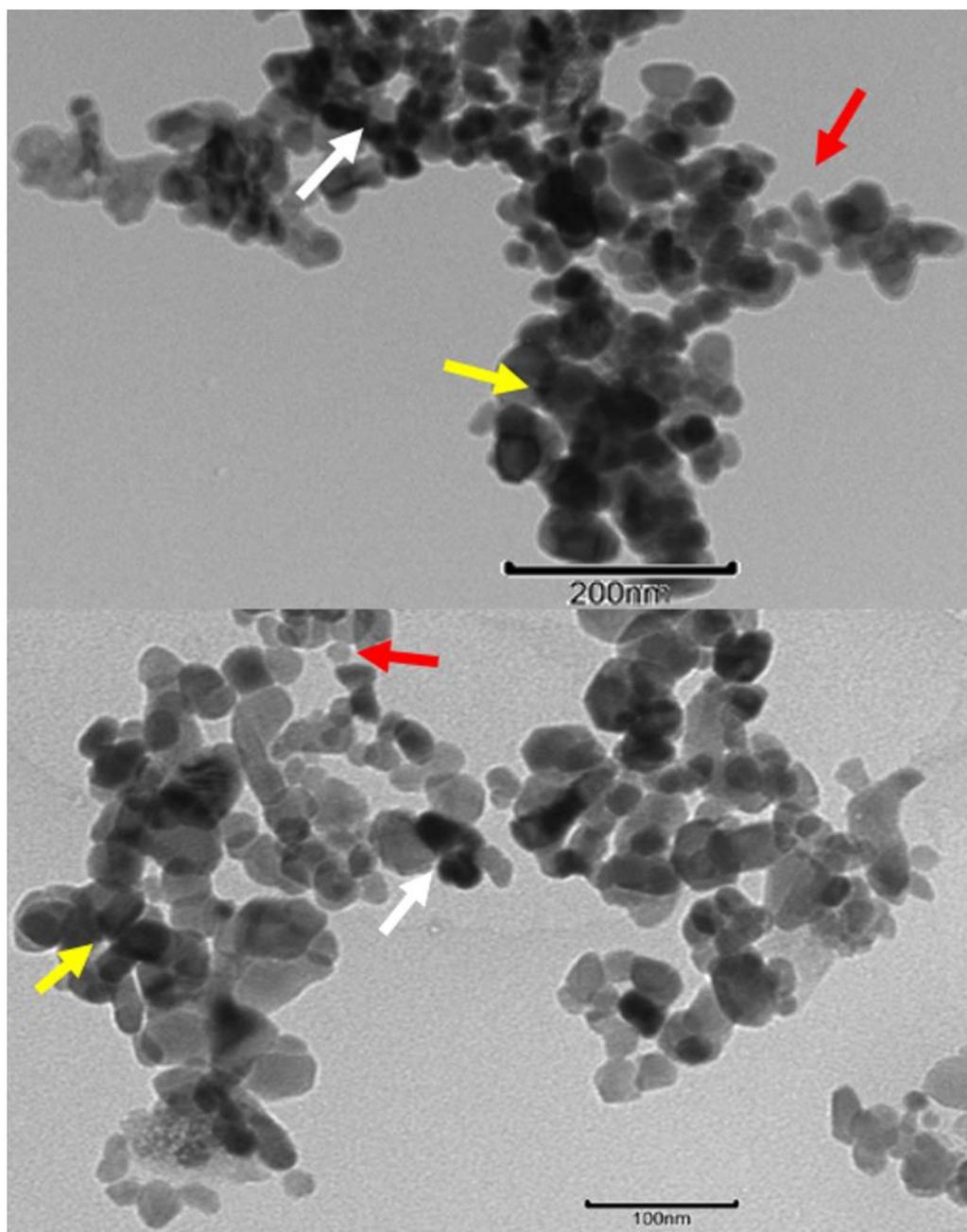
Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (figura 16) de las ZnO-NPs muestran partículas de tamaño y morfología variable, así como una alta tendencia a la aglomeración/agregación.

El análisis de las micrografías de TEM por ImageJ para determinar el tamaño de partícula sugieren que el tamaño es de aprox.  $33\pm 9.3$  nm, el cual coincide con el reportado por el proveedor, no obstante, de acuerdo con los resultados del diámetro hidrodinámico por dispersión dinámica de luz, estas podrían encontrarse aglomeradas.

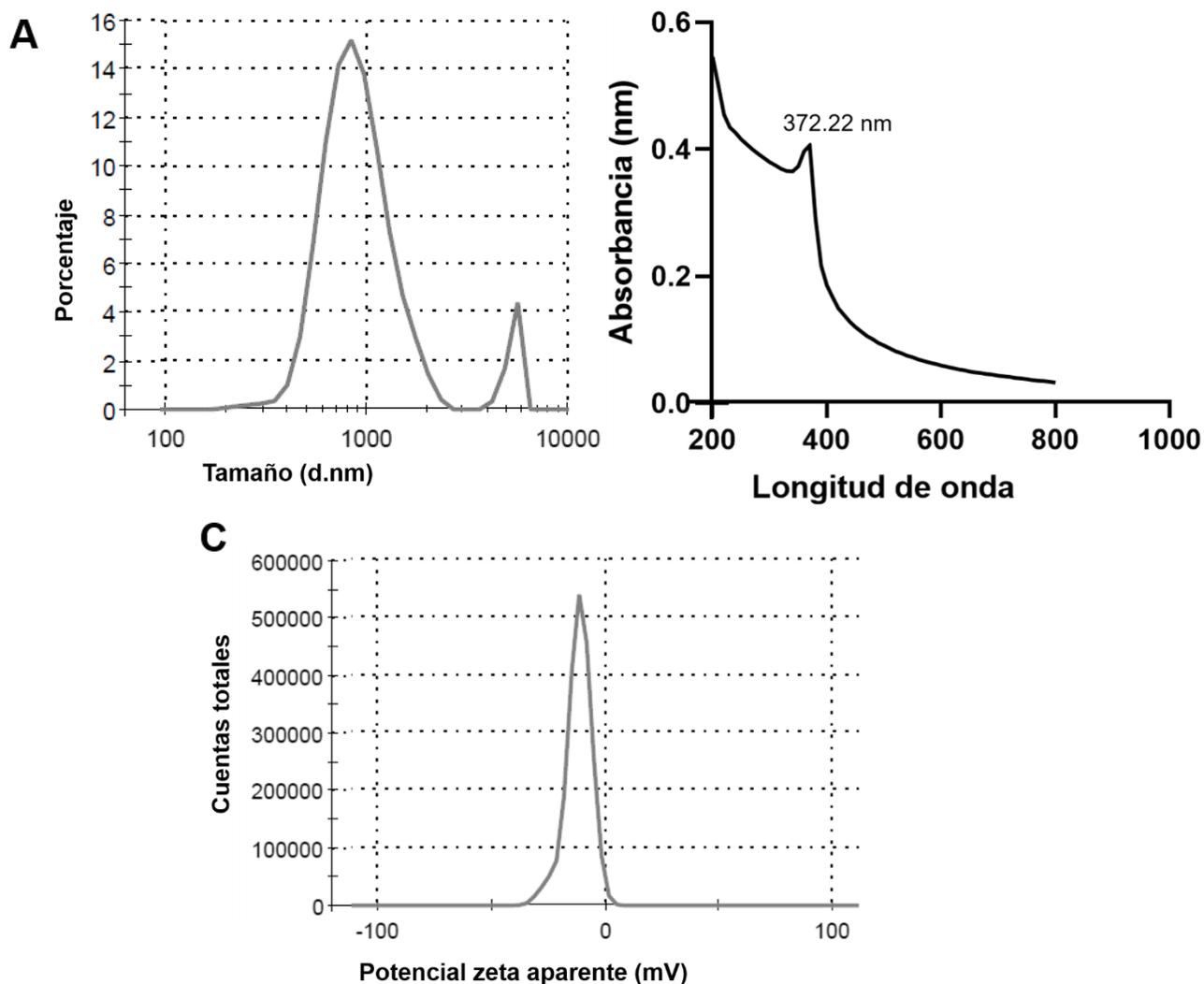
De acuerdo con los resultados obtenidos por DLS, el diámetro hidrodinámico promedio de las ZnO-NPs dispersadas mediante sonicación es de  $405.3\pm 443.6$  nm; sin embargo, la figura 18A muestra una gran heterogeneidad en tamaños de diámetro, con tamaños que van desde 100 hasta 6000 nm.

Esto concuerda con la aglomeración de las nanopartículas que se observa en las micrografías obtenidas por TEM en la figura 16, que incrementa el tamaño de partícula de manera heterogénea. Lo anterior puede ser explicado por la poca estabilidad de las nanopartículas reflejada en su potencial zeta relativamente bajo ( $-11.8\pm 5.88$  mV) (figura 17C), el cual es una medida de la magnitud de la repulsión electrostática.

Por otro lado, la caracterización por espectroscopía UV-Vis del plasmón de resonancia superficial de las ZnO-NPs sonicadas, indica una banda de absorción en 372.22 nm, la cual es similar a la banda de absorción típica de las ZnO-NPs reportado por otros autores (Aquino-Granados, 2016).



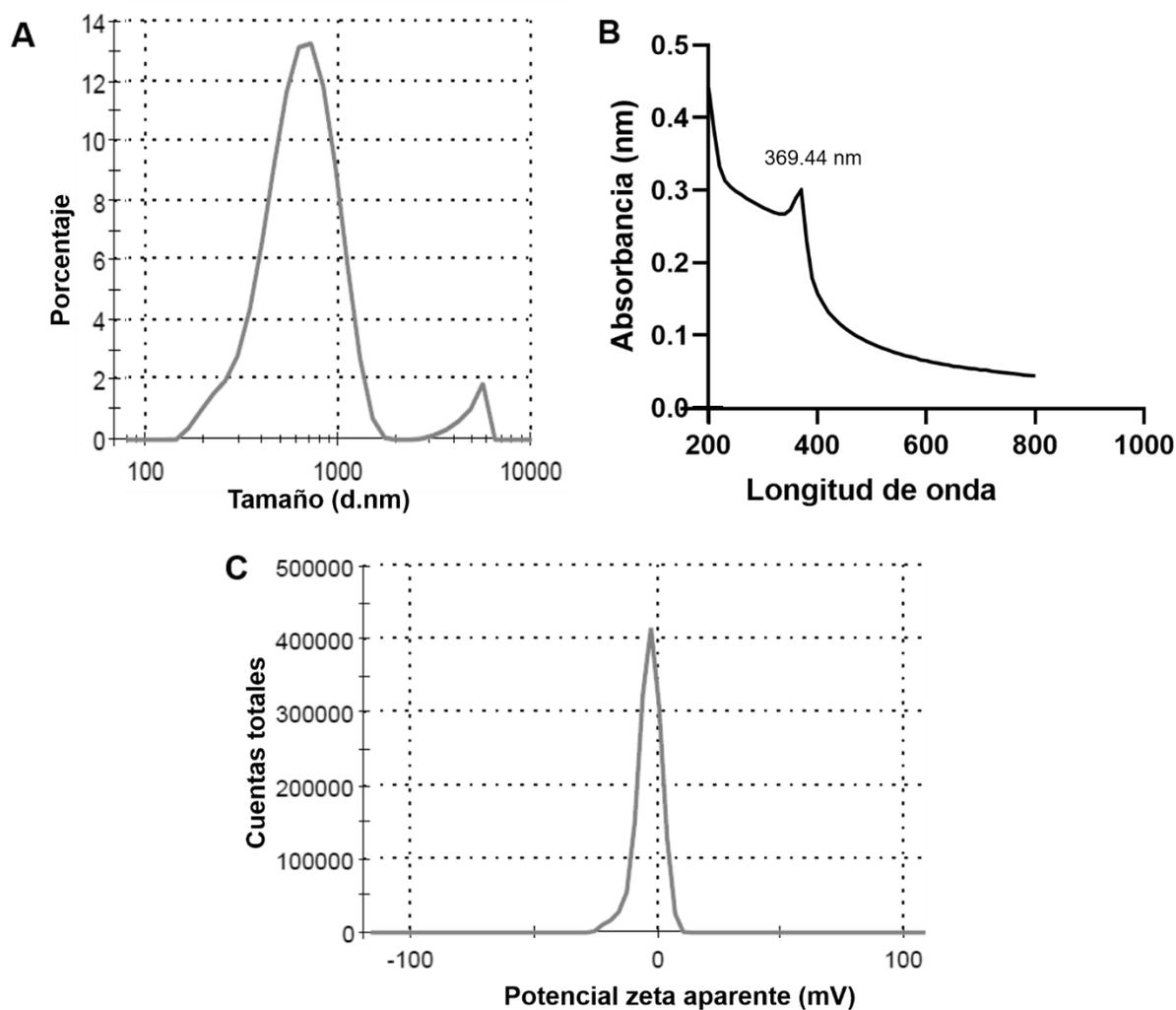
**Figura 16.** Micrografía de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) obtenida por microscopía electrónica de transmisión. Las flechas rojas señalan las partículas de menor tamaño, las amarillas indican vacíos entre los agregados/aglomerados, y las blancas apuntan a zonas de alta densidad electrónica.



**Figura 17.** Caracterización del diámetro hidrodinámico, plasmón de resonancia superficial y potencial zeta de las nanopartículas de ZnO dispersadas mediante sonicación. El tamaño promedio es de  $405.3 \pm 443.6$  nm (A) con una señal de plasmón de resonancia superficial en 372.22 nm (B) y potencial zeta de  $-11.8 \pm 5.88$  mV (C).

La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación se presenta en la figura 18A, se muestra el radio hidrodinámico de las ZnO-NPs obtenido por DLS, cuyo promedio es de  $677.4 \pm 264.3$  nm, con una amplia distribución de tamaños entre 150 y 6000 nm, en la figura 19B se observa el espectro del plasmón de resonancia superficial, el cual presenta una banda de absorción característica en los 369.44 nm, y un potencial zeta considerablemente bajo ( $-3.61 \pm 5.19$  mV) (figura 18C). El diámetro hidrodinámico promedio es considerablemente mayor al de las ZnO-NPs dispersadas mediante sonicación y la repulsión electrostática disminuyó en comparación con las ZnO-NPs sonicadas. El incremento en el tamaño de las nanopartículas dispersadas mediante ultrasonificación podría deberse a que este método es más agresivo que la sonicación, y podría causar la

destrucción o pérdida de la cubierta de PVP, aumentando la atracción electrostática entre partículas, ya que el PVP tiene como función aumentar la estabilidad de las partículas.

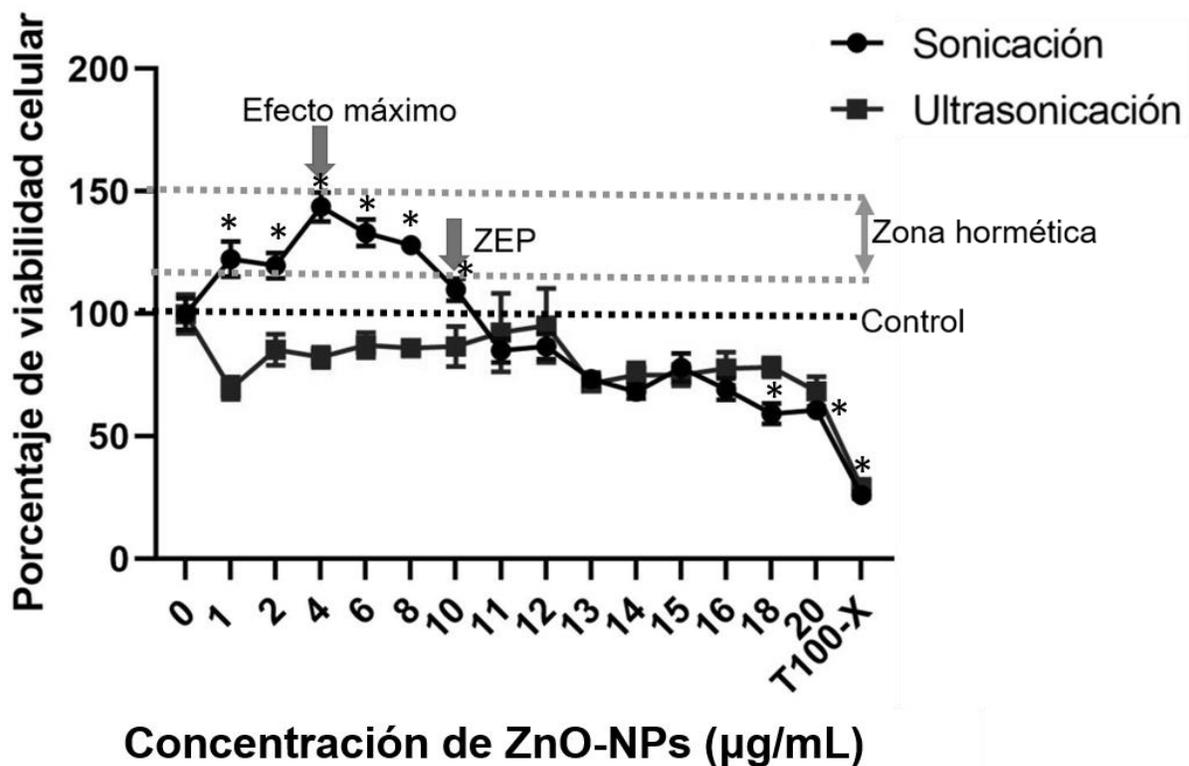


**Figura 18.** Caracterización del diámetro hidrodinámico, plasmón de resonancia superficial y potencial zeta de las nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación. El tamaño promedio es de  $677.4 \pm 264.3$  nm (A); (B) El plasmón de resonancia superficial es de 369.44 nm; mientras que el potencial zeta presenta un valor de  $-3.61 \pm 5.19$  mV (C).

### 3.5 Efecto de la exposición aguda a distintas concentraciones de ZnO-NPs en la viabilidad celular de macrófagos RAW264.7

En la figura 19 se presenta el porcentaje de viabilidad de macrófagos (eje Y) expuestos durante 24 h a distintas concentraciones (eje X) de ZnO-NPs dispersadas mediante sonicación (●) y ultrasonificación (■). La gráfica presenta un comportamiento bifásico, ya que a concentraciones entre 1-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-

NPs sonicadas, se observa un incremento en la proliferación de macrófagos, con un efecto máximo a los 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, y en donde el punto cero equivalente, que es la concentración en la que la respuesta es igual al control, se encuentra en los 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; mientras que a concentraciones entre 10-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se aprecia una disminución en la viabilidad celular de aproximadamente 40% con respecto al control. Como se mencionó anteriormente, el incremento en la viabilidad por arriba del 110% es un efecto característico de una respuesta celular conocida como hormesis, que refleja la adaptación a las condiciones estresantes mediante el incremento en la tolerancia y la función celular, como resultado de la plasticidad biológica (Calabrese y Mattson, 2017). Al igual que en los macrófagos expuestos a las CuO-NPs dispersadas mediante ultrasonificación, este efecto se encuentra ausente en macrófagos expuestos a las ZnO-NPs ultrasonificadas, probablemente esto se deba a que la toxicidad de las nanopartículas depende de sus características fisicoquímicas, principalmente del tamaño. Con base en los resultados descritos anteriormente, se seleccionaron las concentraciones de 2, 3, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs dispersadas mediante ultrasonificación para los ensayos de exposición subcrónica debido a su baja toxicidad.



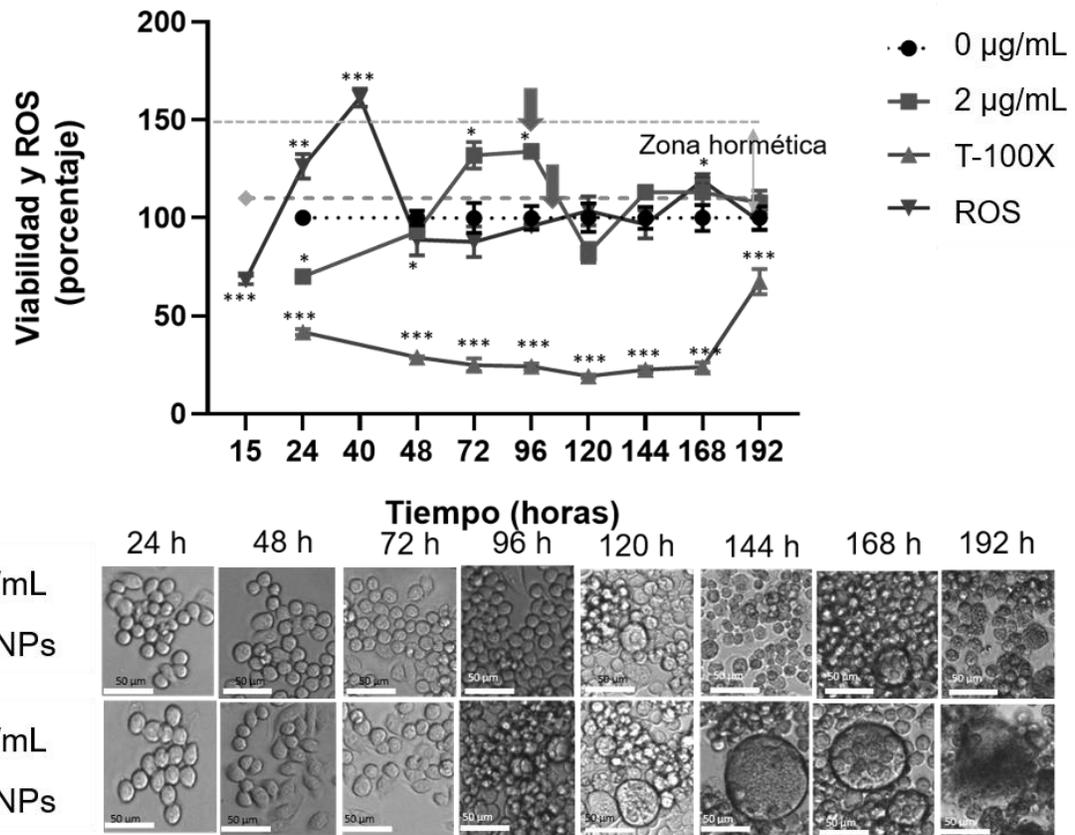
**Figura 19.** Viabilidad de macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos durante 24 horas a concentraciones entre 1 a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante sonicación y ultrasonificación. Macrófagos expuestos a ZnO-NPs sonicadas presentan un efecto hormético a bajas concentraciones (1-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ), \* $<0.05$ . ZEP=Punto cero equivalente; T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

### 3.6 Efecto de la exposición subcrónica a ZnO-NPs en la viabilidad, y respuestas celulares de macrófagos RAW264.7

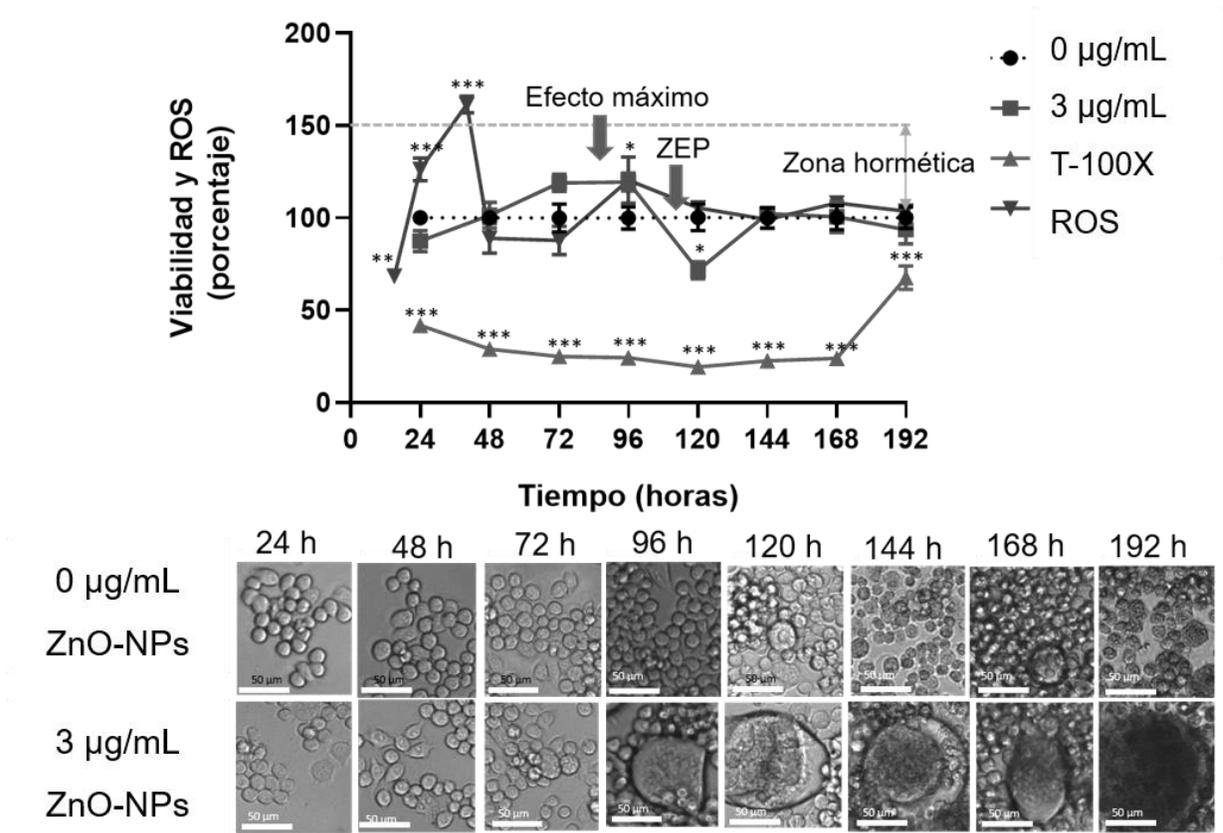
Para evaluar el efecto de la exposición subcrónica a ZnO-NPs ultrasonificadas en macrófagos, éstos fueron expuestos durante 192 h a las concentraciones subtóxicas de 2, 3, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs dispersadas mediante ultrasonificación, la producción de ROS, nitritos y viabilidad celular fue medida constantemente y la morfología celular fue visualizada por microscopía óptica. Como control de viabilidad, se utilizó medio DMEM suplementado sin tratamiento (línea negra punteada), como control negativo de viabilidad se utilizó Tritón-100X al 0.5% en PBS, mientras que la viabilidad de macrófagos expuestos a las distintas concentraciones de las ZnO-NPs ultrasonificadas se representa con el símbolo ■, y los niveles de ROS alterados por la exposición de los macrófagos a las ZnO-NPs con el símbolo ▼. Las figuras 20, 21, 22, 23 y 24 muestran los resultados de la viabilidad celular y la medición de ROS en macrófagos expuestos respectivamente a 2, 3, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs dispersadas mediante ultrasonificación durante 15 hasta 192 horas.

En la figura 20, se observa que los macrófagos expuestos durante diferentes tiempos a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs dispersadas mediante ultrasonificación, presentan una viabilidad celular bimodal, en donde durante las primeras 24 h se aprecia una disminución de la viabilidad de alrededor del 30%, de manera consistente con lo observado en la figura 19. Sin embargo, a partir de las 72 h continuas de exposición a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se presenta el efecto hormético, seguido de una ligera toxicidad después de 120 h de exposición, mientras que a las 144 h se observa un incremento en la viabilidad que se acerca nuevamente a la zona hormética. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las ZnO-NPs ultrasonificadas, inducen un periodo de precondicionamiento durante las primeras 72 horas en los macrófagos, antes de que se observe el efecto hormético. El precondicionamiento, también conocido como respuesta protectora, es un fenómeno en el cual una exposición previa a una dosis baja específica de un agente tóxico o estresante, reduce la toxicidad tras una exposición posterior dañina, esta dosis se conoce como dosis desafiante, el modelo de precondicionamiento descrito por Calabrese en el 2016, se muestra en la figura 47. Con respecto a los niveles de ROS, la exposición a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs causa una considerable disminución en la producción de ROS durante las primeras 15 horas, seguido de un incremento significativo a las 40 horas; sin embargo, los niveles de ROS disminuyen nuevamente a las 48 horas, lo que sugiere que se están suscitando respuestas celulares que conducen a la regulación en los niveles de ROS, o bien, a una adaptación a las condiciones estresantes. A partir de las 72 horas, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de ROS de los macrófagos expuestos a las ZnO-NPs y el control. Es importante destacar que el estrés oxidativo se encuentra íntimamente ligado al desarrollo de la respuesta

hormética (López-Díazguerrero *et al.*, 2013). Después de que los macrófagos han estado expuestos a las ZnO-NPs por 120 h, se observa la aparición de células gigantes multinucleadas, las cuales incrementan en número y volumen a través del tiempo, y después disminuyen. Si bien se aprecian algunas células de mayor volumen en el cultivo del control positivo, estas poseen menor tamaño y son menos numerosas. Las células gigantes multinucleadas son el resultado de la fusión de macrófagos con el objetivo de incrementar su área superficial y poder fagocitar partículas de mayor tamaño, y suelen asociarse con cuadros de inflamación crónica (Milde *et al.*, 2015).



**Figura 20.** Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 2 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación. La exposición a ZnO-NPs disminuye la producción de ROS durante las primeras 15 horas, seguido de un incremento considerable a las 40 horas. Los macrófagos expuestos a una concentración de 2 µg/mL de ZnO-NPs ultrasonificadas, exhiben un periodo de preconditionamiento seguido por un efecto hormético de manera dependiente del tiempo y la concentración. Se aprecia la formación de células gigantes multinucleadas a partir de las 120 horas de exposición. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X, barra inferior=50 µm. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . ZEP=Punto cero equivalente; T-100X=Tritón 100X a 0.5%.



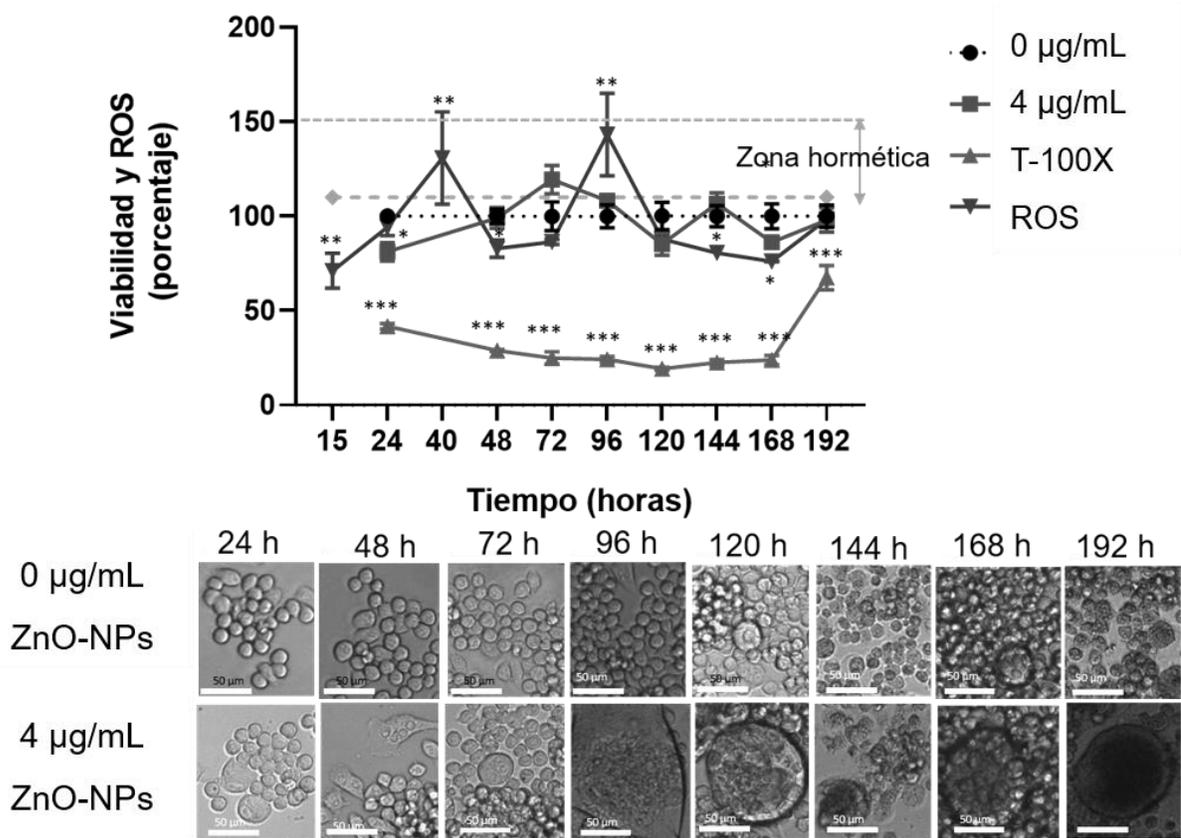
**Figura 21.** Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 3 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación. Los macrófagos expuestos a las ZnO-NPs ultrasonificadas exhiben un periodo de precondicionamiento seguido por un efecto hormético de manera dependiente del tiempo y la concentración. La exposición a 3 µg/mL de ZnO-NPs disminuye la producción de ROS durante las primeras 15 horas, seguido de un incremento significativo a partir de 24 horas. Se aprecia la formación de células gigantes multinucleadas a partir de las 96 horas de exposición a las ZnO-NPs. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X, barra inferior=50 µm. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%. ZEP=Punto cero equivalente; T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

En la figura 21, se observa que la exposición de los macrófagos a una concentración de 3 µg/mL, de ZnO-NPs ocasiona un efecto de pre-acondicionamiento durante las primeras 24 a 72 horas, el cual es similar al observado en los macrófagos expuestos a 2 µg/mL de ZnO-NPs. Después de que los macrófagos han sido expuestos por 72 horas a las ZnO-NPs, se observa un efecto hormético en la viabilidad celular, y el punto cero equivalente se localiza entre las 96 y 120 horas.

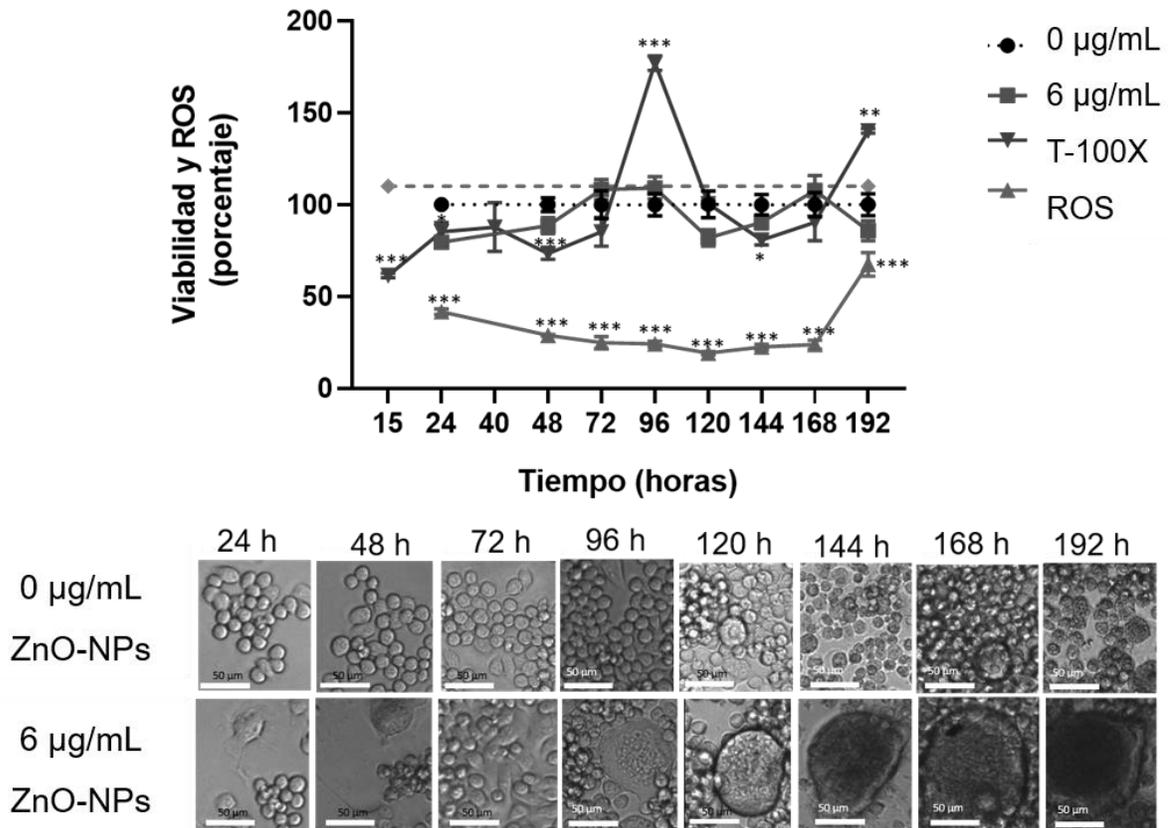
Después de las 120 horas de exposición a las NPs, hay una disminución significativa de la viabilidad de los macrófagos, la cual incrementa nuevamente a las 144 horas hasta igualar la viabilidad del control, manteniéndose constante hasta las 192 horas. Los niveles de ROS presentan una tendencia similar; sin

embargo, se aprecia un mayor incremento a partir de las 24 horas de exposición. La morfología de los macrófagos muestra que la formación de células gigantes multinucleadas aparece a las 96 horas de exposición a las ZnO-NPs, siendo por lo tanto más temprana (por 24 horas) que en los cultivos de macrófagos expuestos a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs.

De manera muy similar, las figuras 22, 23 y 24 muestran los niveles de ROS y la viabilidad celular de macrófagos expuestos respectivamente a 4, 6 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs durante 15 a 192 h. Es importante resaltar la ausencia del efecto hormético y una ligera toxicidad únicamente durante las primeras 24 horas de exposición a las ZnO-NPs.



**Figura 22.** Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación. La exposición de los macrófagos a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs ultrasonificadas, no afecta la viabilidad celular a través del tiempo; sin embargo, se presentan alteraciones en los niveles de ROS, que disminuyen durante las primeras 15 horas, seguido de un ligero incremento a las 40 horas de exposición. Se aprecia la formación de células gigantes multinucleadas a partir de las 96 horas de exposición a las ZnO-NPs. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X, barra inferior=50  $\mu\text{m}$ . Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.



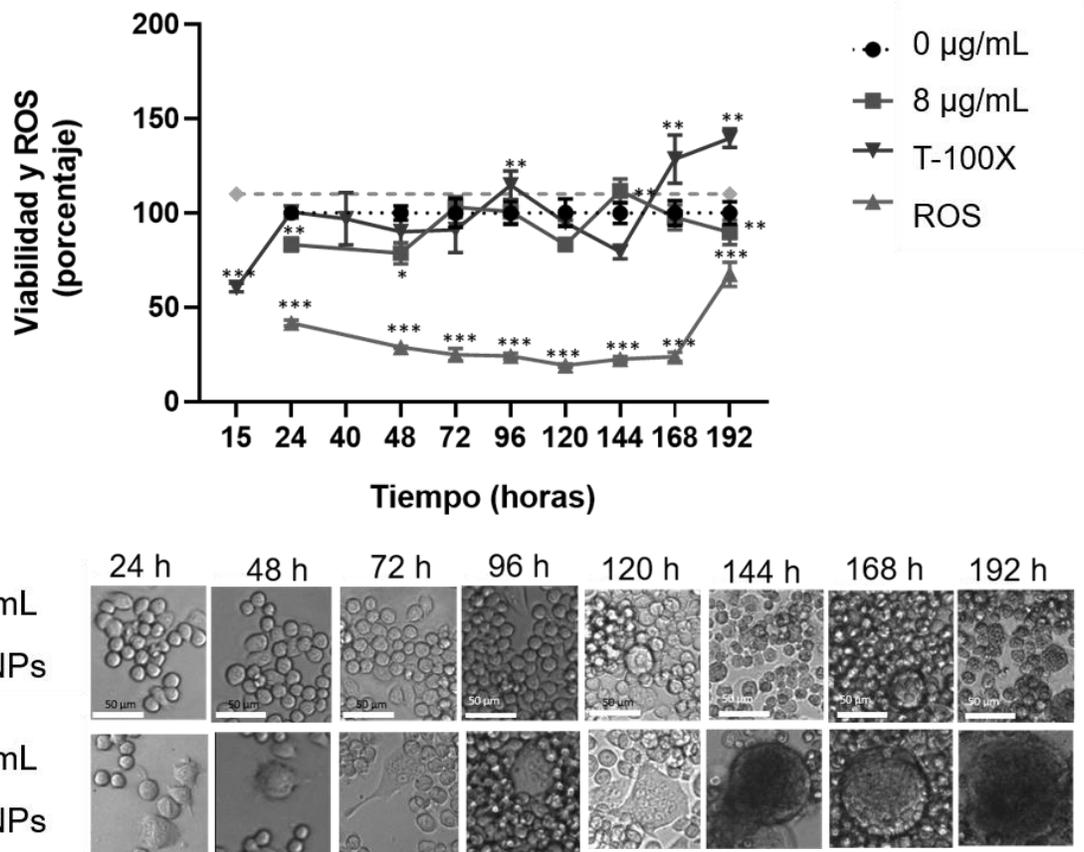
**Figura 23.** Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 6 µg/mL de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación. La exposición de los macrófagos a las concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs ultrasonificadas no afecta la viabilidad celular a través del tiempo de manera significativa; sin embargo, la exposición a 6 µg/mL de ZnO-NPs causa disminución en la producción de ROS. Se aprecia la formación de células gigantes multinucleadas a partir de 96 horas de exposición a las NPs. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X, barra inferior=50 µm. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

Interesantemente, a pesar de que los niveles de ROS también disminuyen durante las primeras 15 horas, éstos tienden a normalizarse y no se incrementan como sucedió con los macrófagos expuestos a 2 y 3 µg/mL de ZnO-NPs lo que respalda la relación entre el estrés oxidativo y la hormesis.

Además, se aprecia la formación de células gigantes multinucleadas después de las 96 horas de exposición a las NPs, lo que sugiere que no hay una relación intrínseca entre la hormesis y la formación de células gigantes multinucleadas; sin embargo, es importante resaltar que la densidad celular sí es un factor determinante en la formación de células gigantes multinucleadas, y que la exposición a esta concentración podría estar causando la activación de las funciones inflamatorias de macrófagos.

Las propiedades fisicoquímicas, la concentración de las ZnO-NPs y el tiempo de exposición a las NPs, son factores que influyen en la respuesta celular, el efecto hormético y la formación de células gigantes multinucleadas en cultivos de macrófagos RAW264.7, y que las ZnO-NPs podrían desencadenar funciones inflamatorias en los macrófagos.

Los experimentos que se presentan a continuación se realizaron únicamente con las concentraciones de 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs ultrasonificadas, ya que solamente en estas concentraciones se observaron respuestas celulares como el incremento en los niveles de ROS y el efecto hormético en la viabilidad celular.



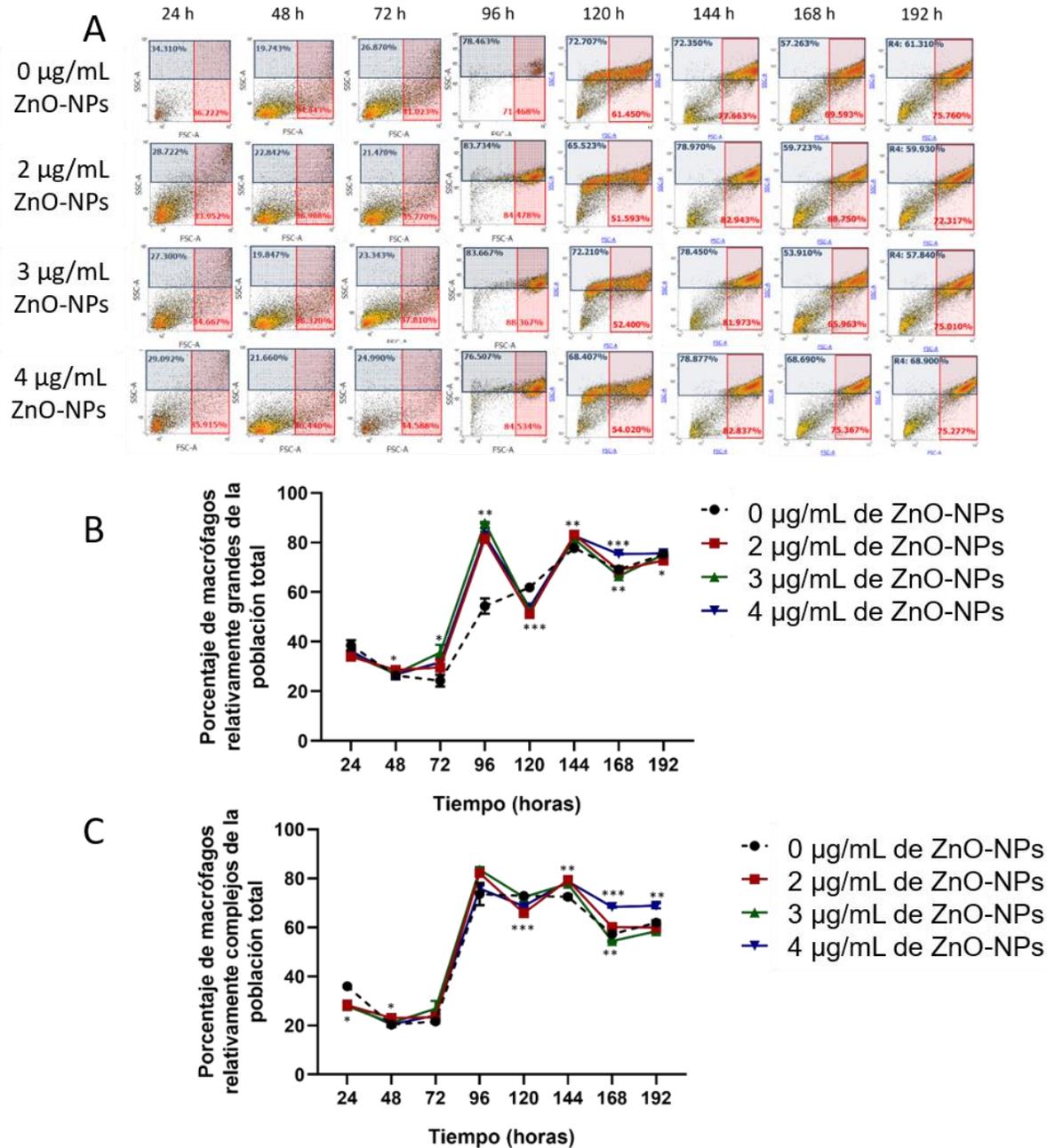
**Figura 24.** Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 192 horas a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanopartículas de ZnO dispersadas mediante ultrasonificación. La exposición de los macrófagos a las concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs ultrasonificadas no afecta la viabilidad celular a través del tiempo de manera significativa; sin embargo, la exposición a 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs causa disminución en la producción de ROS durante las primeras 15 horas. Se aprecia la formación de células gigantes multinucleadas a partir de las 96 horas de exposición a las ZnO-NPs. Micrografías de microscopio óptico con una magnificación de 10X, barra inferior=50  $\mu\text{m}$ . Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

### 3.7 Efecto de la exposición subcrónica a ZnO-NPs en la morfología y función de macrófagos RAW264.7

Se analizaron por citometría de flujo a los macrófagos expuestos a diferentes tiempos a las concentraciones de 2, 3, y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, para evaluar los cambios en el tamaño y la complejidad celular interna, y para caracterizar la aparición de las células gigantes multinucleadas. En la figura 25A se presentan los diagramas de densidad, en donde el eje X representa el tamaño relativo (rectángulo rojo, FSC-A) y el eje Y la complejidad interna relativa (rectángulo azul, SSC-A), en donde se observa que una población similar relativamente pequeña y poco compleja cambia a través del tiempo hasta diferenciarse en 4 poblaciones: i) pequeña y poco compleja; ii) pequeña y muy compleja; iii) grande y poco compleja, y iv) grande y muy compleja en los macrófagos expuestos a las 3 concentraciones de ZnO-NPs y en el control.

Durante las primeras 24 horas de exposición a las NPs, no hay diferencias significativas en el tamaño relativo entre los macrófagos expuestos a 2, 3, y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs y el control. A las 48 horas hay un ligero incremento en el tamaño relativo con respecto al control de macrófagos expuestos a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, y a las 72 horas de exposición a 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs se observa un incremento en el tamaño de los macrófagos tratados respecto al control. El mayor cambio en el tamaño de los macrófagos se observa a las 96 horas de exposición en todas las concentraciones de ZnO-NPs evaluadas. Curiosamente, el tamaño disminuye considerablemente con respecto al control a las 120 horas; pero vuelve a incrementar a las 144 horas en todas las concentraciones de ZnO-NPs, por último, a 192 horas la diferencia entre el tamaño de los macrófagos expuestos las ZnO-NPs y el control es mínima (figura 25B).

En relación a los cambios en la complejidad interna relativa, es posible observar en la figura 25C, que durante las primeras 24 horas, los macrófagos tratados con 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs disminuyen en complejidad celular en comparación con el control, probablemente debido a una disminución en la división celular que se ve reflejada en el decaimiento de la viabilidad celular; sin embargo, este efecto se invierte a las 48 horas. A las 96 horas de exposición a las NPs, la complejidad interna de los macrófagos expuestos a 2 y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs incrementa, pero a las 120 horas de exposición la complejidad celular es igual al control. En cambio, a las 144 horas de exposición a las ZnO-NPs, las células tratadas con todas las concentraciones de NPs se vuelven más complejas; por último, a 168 y 192 horas, los macrófagos tratados con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs son más complejos. De esta forma, es posible decir que la exposición de los macrófagos a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs causa cambios en el tamaño y la complejidad interna relativa a través del tiempo, y que el aumento en el tamaño, así como en la complejidad celular interna con respecto al control podría deberse a internalización de las ZnO-NPs.



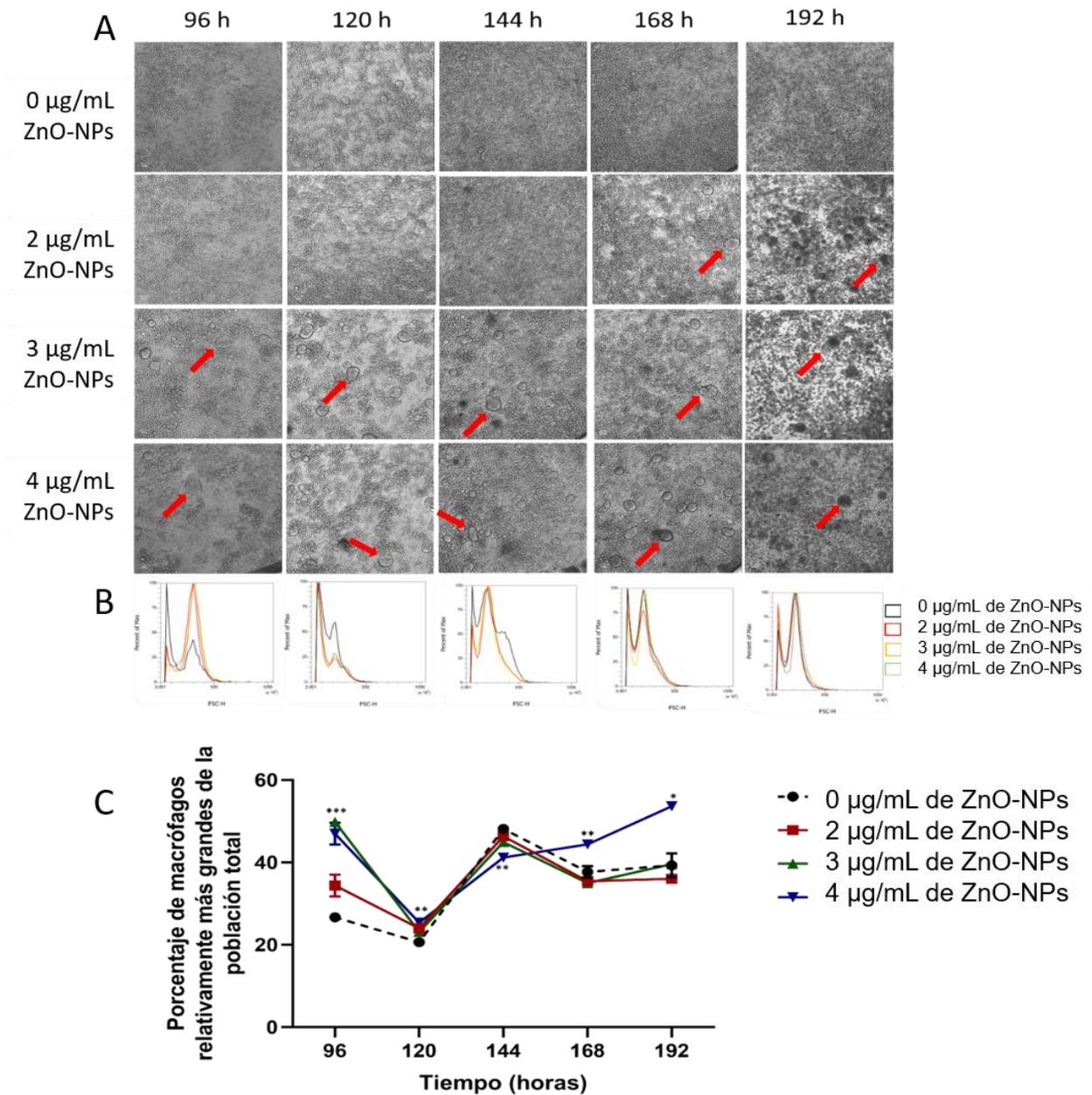
**Figura 25.** Análisis por citometría de flujo del tamaño y la complejidad interna relativa de macrófagos expuestos a 2, 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs durante 24 y hasta 192 horas. Se observan cambios en el tamaño y la complejidad relativa a partir de las 96 horas en todos los tratamientos y el control. A) Diagrama de densidad de tamaño relativo (eje X, rectángulo rojo, FSC-A) y complejidad interna relativa (eje Y, rectángulo azul, SSC-A); B) Cambios en el tamaño relativo (FSC-A); C) Cambios en la complejidad interna relativa (SSC-A). Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

La variación en el tamaño y número de células gigantes multinucleadas también fue calculada mediante citometría de flujo, incluyendo el parámetro de altura relativa (FSC-H). En la figura 26 se aprecian las células gigantes multinucleadas en el control y los tratamientos (A), el solapamiento de las gráficas de

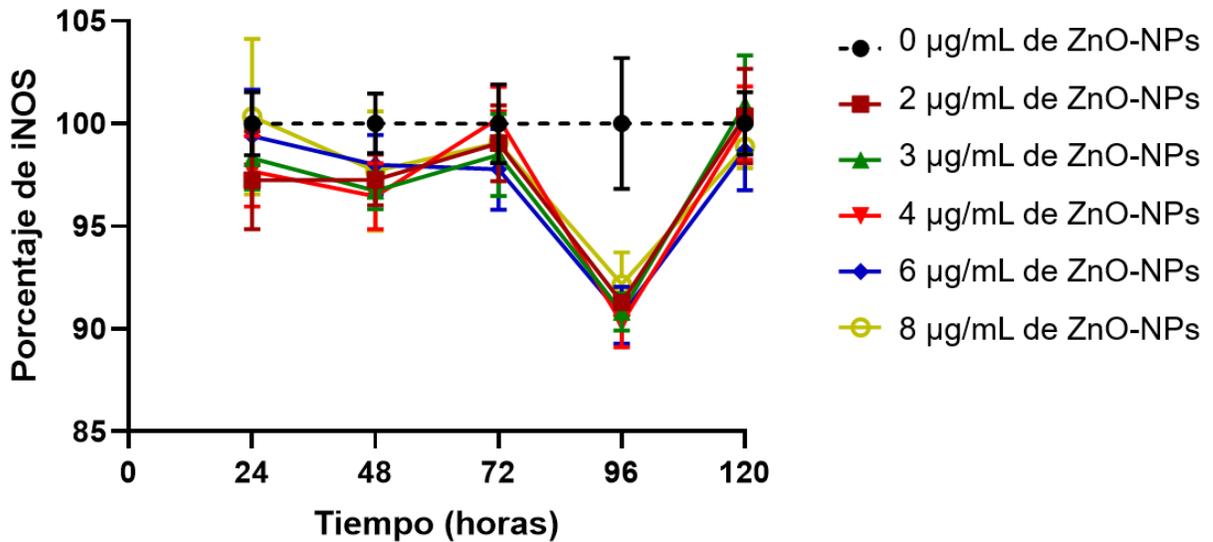
distribución de la altura (FSC-H) de la población control y de los tratamientos de células expuestas a ZnO-NPs por 96, 120, 144, 168 y 192 horas (B), en donde se observan los cambios de tamaño de las poblaciones tratadas con ZnO-NPs con respecto al control (línea negra). En la figura 26C, se observa que hay un aumento significativo en el porcentaje de macrófagos gigantes a 96 horas de exposición a 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, en comparación con el control, lo que sugiere que el porcentaje de la población total de células gigantes multinucleadas es mayor que el del control, tal y como se observó previamente por microscopía óptica. A pesar de que a las 48 horas esta diferencia en el porcentaje de macrófagos gigantes es menos pronunciada, sigue siendo significativamente mayor en los tratamientos que en el control. Lo anterior contrasta con lo descrito previamente en el tamaño relativo, en donde se observó que existe una disminución en este parámetro; sin embargo, esto podría deberse al enriquecimiento de una población de menor tamaño, disminuyendo el porcentaje global de macrófagos relativamente grandes, sin comprometer el número de células gigantes multinucleadas. Posteriormente, a 144 horas el porcentaje de la población de células gigantes multinucleadas de macrófagos sin tratamiento y tratados con 2 y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs no presentan diferencias significativas, mientras que a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, el porcentaje de células gigantes disminuye ligeramente, superando al control y a los tratamientos con 2 y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs a las 168 horas e incrementando a las 192 horas de exposición a las NPs.

De esta forma, la exposición de macrófagos a 2 y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs causa alteraciones en la formación de células gigantes multinucleadas adelantando su aparición y aumentando en número con respecto al control. Este efecto es más evidente en los macrófagos tratados con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs. Estos cambios podrían deberse al aumento en la división celular durante las primeras 96 horas, ya que la fusión de macrófagos para formar células gigantes multinucleadas depende de la densidad celular.

Debido a que las células gigantes multinucleadas son características de un cuadro inflamatorio crónico, se procedió a medir las especies reactivas de nitrógeno (NOS), que son consideradas un marcador de macrófagos activados clásicamente (inflamatorios). El óxido nítrico tiene importantes funciones biológicas, ya que actúa como una molécula mensajera que participa en respuestas inmunitarias y es producido en grandes cantidades por macrófagos activados, ya que es citotóxico debido a su reactividad (Moilanen y Vapaatalo, 1995). Como se observa en la figura 27, la exposición subcrónica de los macrófagos a las concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs no aumenta la producción de especies reactivas de nitrógeno (NOS), ya que no hay diferencias significativas entre el control (macrófagos sin tratamiento) y los macrófagos expuestos a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs. A pesar de que la ausencia de iNOS sugiere que los macrófagos no están siendo activados clásicamente, se requieren más ensayos que permitan evaluar las funciones inmunológicas de macrófagos para poder respaldar esta conclusión.



**Figura 26.** Cambios en la población de células gigantes multinucleadas como resultado de la fusión de macrófagos expuestos a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs. El tratamiento con ZnO-NPs provoca cambios en la población de células gigantes multinucleadas (CGM). A) Micrografías obtenidas con un microscopio óptico con una magnificación de 10X; B) Solapamiento de gráficas de distribución de altura (FSC-H) de macrófagos tratados con ZnO-NPs y control; C) Gráfica del porcentaje de la población de mayor altura relativa. Las flechas rojas señalan células gigantes multinucleadas. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

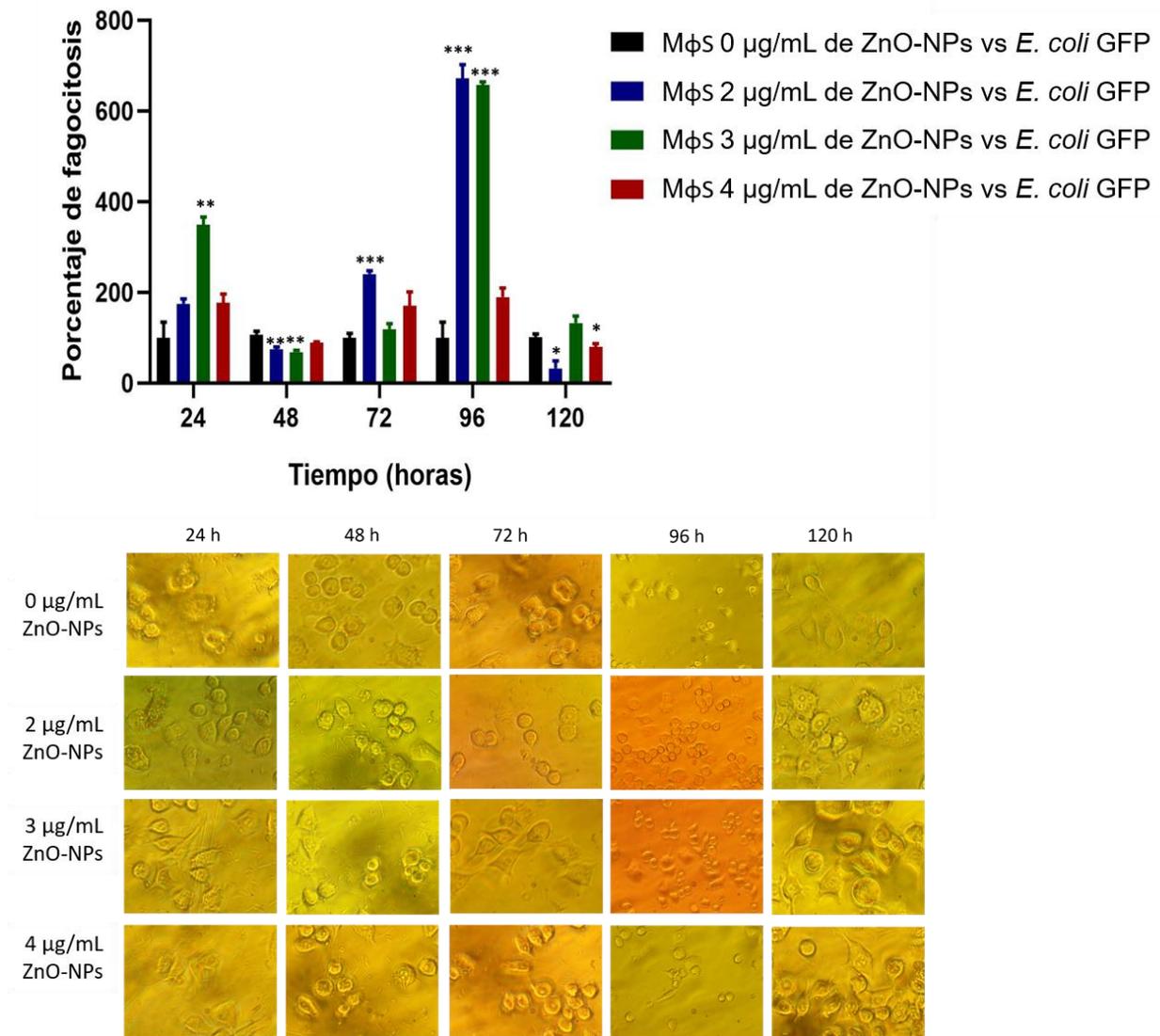


**Figura 27.** Concentración de nitritos en medio extracelular de macrófagos expuestos a concentraciones subtóxicas de nanopartículas de ZnO. La exposición de macrófagos RAW264.7 a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs no tiene efecto en la producción de especies de óxido nítrico. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

En este punto del trabajo, es importante determinar si la exposición subcrónica de los macrófagos a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs puede activar de forma clásica a los macrófagos y comprometer la función de fagocitosis de las células. Por lo que para resolver esta incógnita fue llevado a cabo un ensayo para evaluar la capacidad fagocítica de dichos macrófagos. Para ello, los macrófagos fueron expuestos previamente a las ZnO-NPs, y posteriormente fueron retados con *E. coli* productora de la proteína verde fluorescente (GFP) en una proporción 6:1 y se incubaron durante 3 horas para facilitar el proceso de fagocitosis. Si los macrófagos eran capaces de fagocitar a las bacterias productoras de la proteína verde fluorescente, entonces los macrófagos emitirán una fluorescencia interna de color verde debida a la presencia de bacterias en su interior.

Como se observa en la figura 28, los macrófagos expuestos durante 24 horas a 3 µg/mL de ZnO-NPs presentan un incremento significativo de la capacidad fagocítica; mientras que los macrófagos expuestos durante 48 horas a 2 y 3 µg/mL de ZnO-NPs son menos capaces de fagocitar bacterias.

Esto podría deberse a los altos niveles de ROS que se presentan a las 40 horas, puesto que el proceso de homeostasis podría tener un alto costo energético, comprometiendo la capacidad fagocítica durante algunas horas.



**Figura 28.** Capacidad fagocítica de macrófagos expuestos durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs. Se observan alteraciones en la capacidad fagocítica de macrófagos expuestos a ZnO-NPs, y cambios morfológicos como resultado del reto con *E. coli* GFP. Micrografías con una magnitud de 20X y 10X (96 horas). ANOVA de dos vías y prueba posterior de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

Después de 72 horas solamente la exposición a 2 µg/mL de ZnO-NPs incrementa la capacidad fagocítica de las células, pero la incubación con 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs no altera esta función celular. Interesantemente, los macrófagos incrementan casi 7 veces más la fagocitosis de bacterias a las 96 horas de exposición a 2 y 3 µg/mL de ZnO-NPs.

A pesar de que los macrófagos expuestos 96 horas a 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs presentan el mayor número de células gigantes multinucleadas, la capacidad fagocítica de aquellos macrófagos expuestos a 4

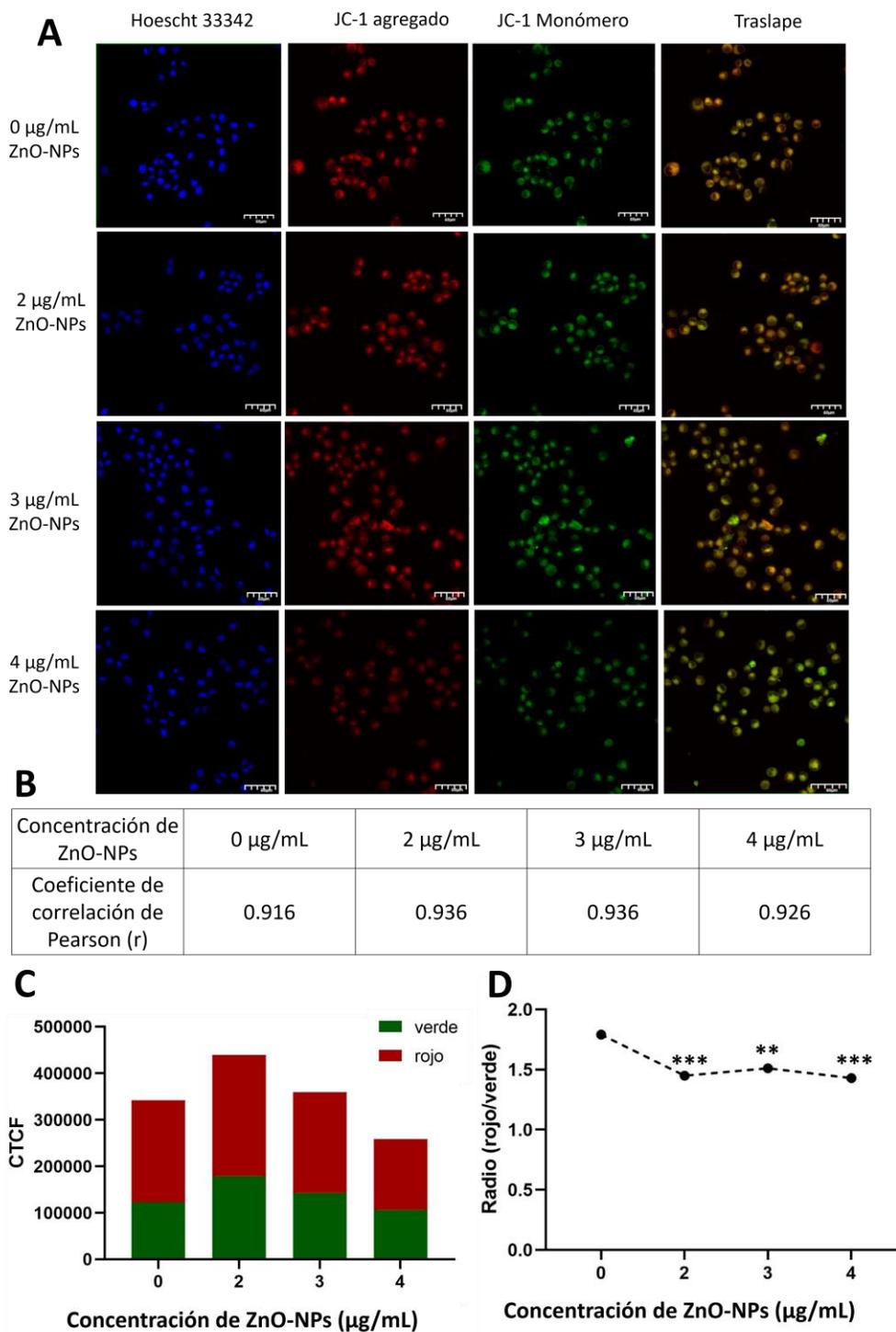
$\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs durante 96 horas no es diferente del control sin tratamiento con NPs, y a las 120 horas de exposición a las NPs, la fagocitosis disminuye considerablemente en los macrófagos tratados con 2 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, mientras que a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs no hay diferencias en comparación con el control.

Lo anterior sugiere que el incremento en la capacidad fagocítica no se debe a la presencia de células gigantes multinucleadas, es posible que los cambios en los niveles de zinc o la internalización de ZnO-NPs, o ambos procesos, podrían estar alterando las rutas de señalización implicadas en el proceso de fagocitosis, dependiendo de las respuestas celulares suscitadas en el momento de la exposición a las ZnO-NPs. En las micrografías de la figura 28 se aprecian los cambios morfológicos en los macrófagos previamente expuestos a las ZnO-NPs durante los retos con *E. coli* GFP.

Como la capacidad fagocítica es un proceso activo que requiere de la modificación de la membrana celular y, por lo tanto, de una demanda metabólica mitocondrial considerable, se decidió evaluar el potencial de membrana mitocondrial (PMM) utilizando el fluoróforo JC-1. Para lo cual los macrófagos fueron expuestos de manera subcrónica a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, y se seleccionó solamente algunos tiempos de exposición por las respuestas celulares relevantes que se observaron en ellos: a 40 horas por los altos niveles de ROS, a 96 horas por la presencia del efecto hormético y la formación de células gigantes multinucleadas; y a las 120 horas debido a la disminución en la viabilidad y la capacidad fagocítica. También se tiñeron los núcleos de las células con el fluoróforo Hoechst 33342 para observar la formación de las células gigantes multinucleadas (CGM).

El reactivo JC-1 es excitado en dos longitudes de onda para visualizar los monómeros (verde) y los agregados (rojo). En condiciones de homeostasis, el traslape de ambas imágenes se visualiza en color amarillo debido a la colocalización; sin embargo, la despolarización mitocondrial se caracteriza por una alteración en la proporción de la intensidad de fluorescencia rojo/verde. Los macrófagos teñidos fueron visualizados mediante microscopía láser confocal, y a partir de las imágenes obtenidas fue calculada la fluorescencia celular total corregida (CTCF), el coeficiente de correlación de Pearson y la relación de la fluorescencia rojo/verde.

La colocalización de monómeros y agregados del reactivo JC-1, da como resultado un tono naranja-amarillo, dicha colocalización fue evaluada mediante el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ), en donde un valor cercano a uno sugiere colocalización. Por otro lado, la fluorescencia celular total corregida (CTCF, por sus siglas en inglés) fue calculada como se describe en la metodología, y a partir de estos resultados se obtuvo la proporción de la fluorescencia en color rojo/verde.



**Figura 29.** Análisis del potencial de membrana mitocondrial de macrófagos expuestos durante 40 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs, utilizando el fluoróforo JC-1 mediante microscopía láser confocal. A) Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal,  $N = 0.75$ , con una magnitud 20X. Tinción nuclear en azul con Hoescht 3342, JC-1 agregado (filtro PI, rojo), JC-1 monómeros (verde, filtro FITC); B) Coeficiente de correlación de Pearson (r) de la fluorescencia de JC-1 agregado y monómero; C) Fluorescencia celular total corregida (CTCF); D) Radio entre fluorescencia celular total corregida (CTCF) rojo y verde. ANOVA de una vía y prueba posterior de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

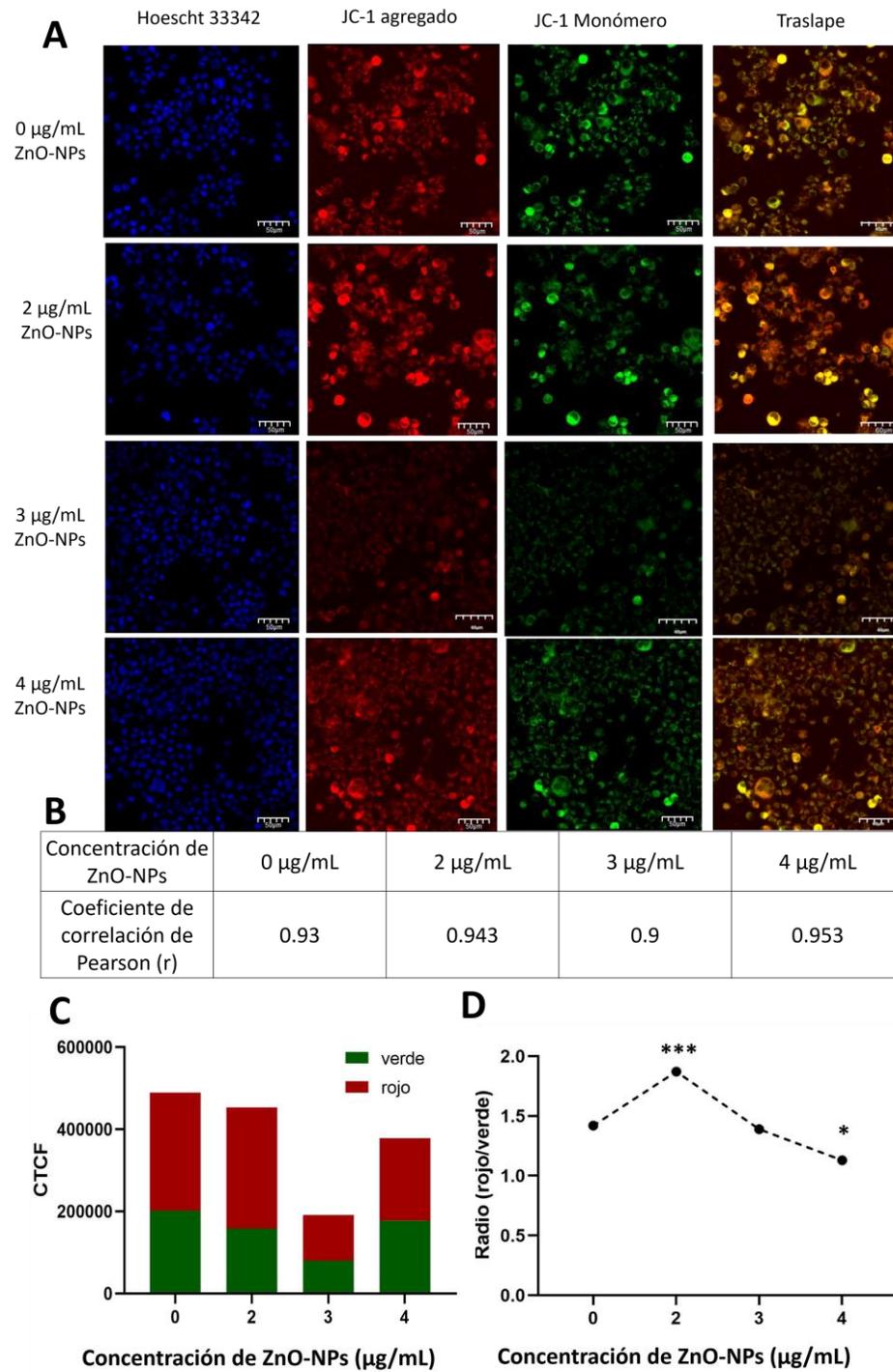
En la figura 29A, se presentan los resultados obtenidos por microscopía láser confocal de macrófagos expuestos durante 40 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, en donde se aprecian cambios en la intensidad de fluorescencia entre los tratamientos.

En la figura 29B, se presentan los valores del coeficiente de correlación de Pearson, los cuales demuestran una clara colocalización, mientras que los valores de CTCF tanto de monómeros (verde) como de agregados (rojo) también presentan alteraciones entre los tiempos de exposición y las concentraciones (figura 29C). La relación de la fluorescencia rojo/verde disminuye de manera significativa en los macrófagos expuestos a las ZnO-NPs con respecto al control, y en las imágenes, se observa ligeramente una mayor cantidad de color amarillo en las células tratadas que en los macrófagos sin tratamiento, lo que sugiere una despolarización de la membrana mitocondrial (figura 29D).

Esta despolarización de la membrana mitocondrial podría deberse a los altos niveles de ROS, o a las respuestas celulares de los macrófagos expuestos de forma subcrónica a las ZnO-NPs. A pesar de que no se aprecian diferencias entre la proporción de fluorescencia en color rojo/verde de los macrófagos tratados con las ZnO-NPs, en la figura 29C, se observa que la exposición durante 40 horas a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs causa un incremento tanto en la CTCF de monómeros (verde) como de agregados (rojo), lo que podría deberse a un incremento en el número de mitocondrias, también asociado al efecto hormético y al incremento en la viabilidad celular, mientras que a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs no se aprecian diferencias con respecto al control y a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs disminuyó la CTCF de agregados (rojo).

En la figura 30 se presentan los resultados obtenidos por microscopía confocal láser de los macrófagos expuestos durante 96 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs. Los valores del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) cercanos a uno demuestran colocalización (figura 30B). Se aprecia en las imágenes que la intensidad de la fluorescencia roja predomina en el traslape, lo cual se refleja en los valores de CTCF, exceptuando las imágenes de macrófagos expuestos durante 96 horas a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs, en donde se presenta una abrupta disminución de la CTCF tanto de monómeros como de aglomerados, a pesar de que la proporción rojo/verde no presente diferencias significativas con respecto al control (figura 30D).

En contraste con lo anterior, la proporción rojo/verde de la CTCF de macrófagos expuestos a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs no presenta diferencias significativas con respecto al control, no obstante, si se aprecia un ligero aumento en la CTCF tanto de monómeros (verde) como de agregados (rojo).



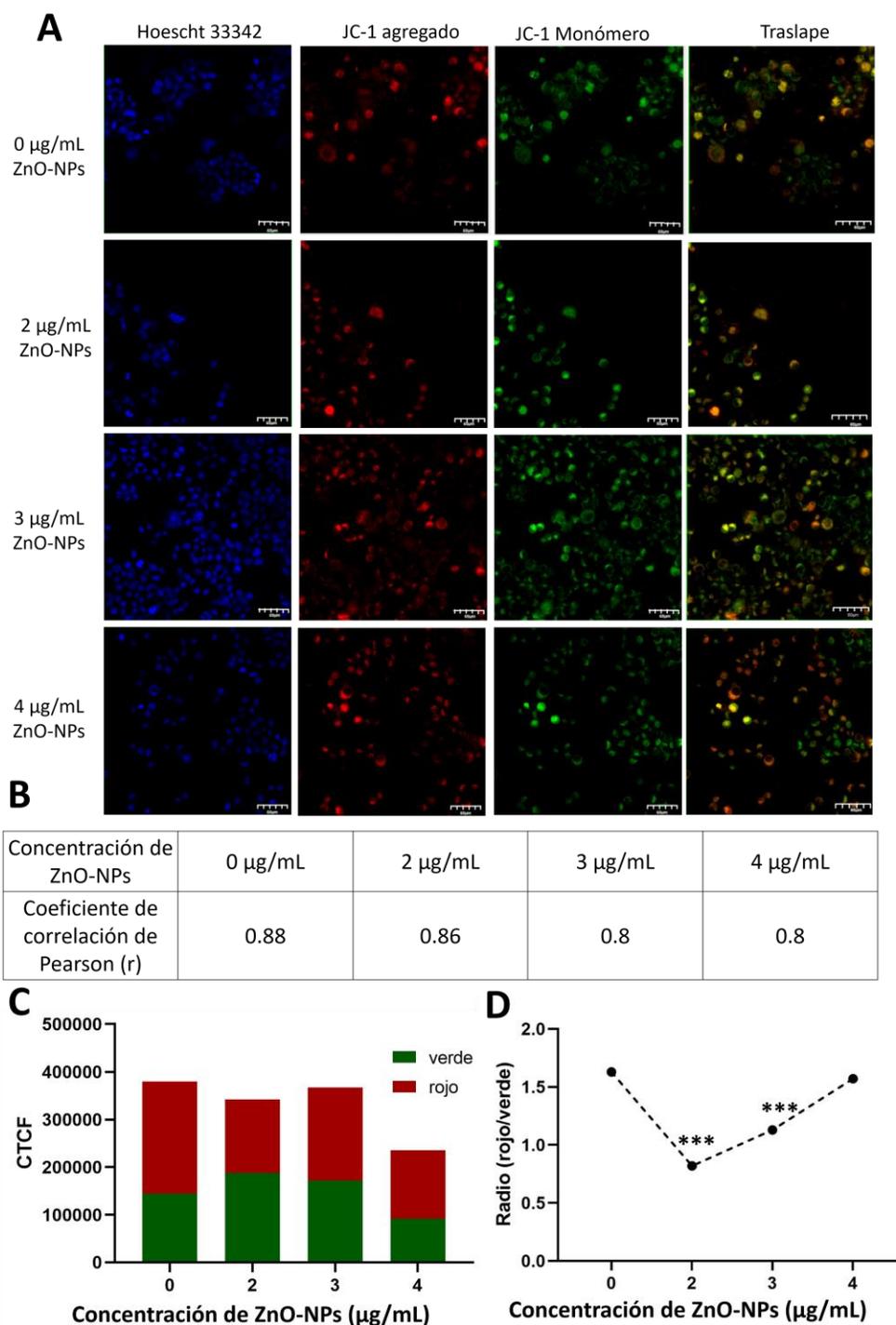
**Figura 30.** Análisis por microscopía láser confocal del potencial de membrana mitocondrial de macrófagos expuestos durante 96 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs con el fluoróforo JC-1. A) Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal, N.A=0.75, con una magnitud 20X. Hoechst 33342 (núcleos, azul), JC-1 agregado (filtro PI, rojo), JC-1 monómeros (verde, filtro FITC); B) Coeficiente de correlación de Pearson (r) de la fluorescencia de JC-1 agregado y monómero; C) Fluorescencia celular total corregida (CTCF); D) Radio entre fluorescencia celular total corregida (CTCF) rojo y verde. ANOVA de una vía y prueba posterior de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

Por último, la CTCF roja y verde de macrófagos expuestos a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs durante 96 horas disminuye con respecto al control como se observa en la figura 30C, lo que se correlaciona el valor en la proporción rojo/verde, en donde se presentan diferencias significativas con respecto al control, sugiriendo una despolarización de la membrana mitocondrial. En este sentido, la exposición de los macrófagos durante 120 horas a las ZnO-NPs también causa una disminución en la CTCF roja y verde y, por lo tanto, en la proporción de la fluorescencia roja/verde a 2 y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs; mientras que a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la relación se mantiene similar al control, a pesar de la considerable disminución de ambas CTCF.

En las imágenes de la figura 31A, se observa un aumento de la fluorescencia verde de los monómeros de JC-1, lo que sugiere una despolarización de la membrana mitocondrial. Interesantemente, en las imágenes de los macrófagos expuestos a ZnO-NPs (traslape) se observan poblaciones celulares en donde predomina la fluorescencia verde, y otras en donde se aprecia una mayor fluorescencia roja, lo que a su vez causa la disminución en el coeficiente de correlación de Pearson; sin embargo, éste sigue siendo aceptable. Lo anterior sugiere una heterogeneidad de las poblaciones; es decir, probablemente algunos macrófagos logran adaptarse y aumentar su tolerancia a las ZnO-NPs, mientras que otros mueren, explicando así la disminución en la viabilidad celular observada a las 120 horas de exposición a las ZnO-NPs en las concentraciones estudiadas.

Con base en los resultados descritos previamente, la exposición subcrónica a las ZnO-NPs causa una despolarización de la membrana mitocondrial, y dicha alteración permanece evitando que las células vuelvan a la homeostasis a través del tiempo, por lo que la mitocondria podría tener un papel fundamental en las respuestas celulares suscitadas y la adaptación de los macrófagos a la exposición constante a ZnO-NPs, así como en los procesos de fagocitosis y activación de los macrófagos.

Dado que los iones  $\text{Zn}^{2+}$  son considerados un importante inmunomodulador ya que juegan un papel importante en el sistema inmunológico tanto innato como adaptativo, las alteraciones en los niveles de este ion pueden afectar la función de los macrófagos. Por lo tanto, los efectos de la exposición de los macrófagos a las ZnO-NPs pueden asociarse con la liberación de iones  $\text{Zn}^{2+}$ . Para demostrar si las respuestas celulares observadas por la exposición subcrónica a ZnO-NPs son el resultado de los iones  $\text{Zn}^{2+}$ , las nanopartículas de ZnO, o de ambas, se expusieron macrófagos durante 96 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$  como agente donador de iones, y también a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs en presencia de EDTA 1 mM, un agente quelante de iones  $\text{Zn}^{2+}$ .



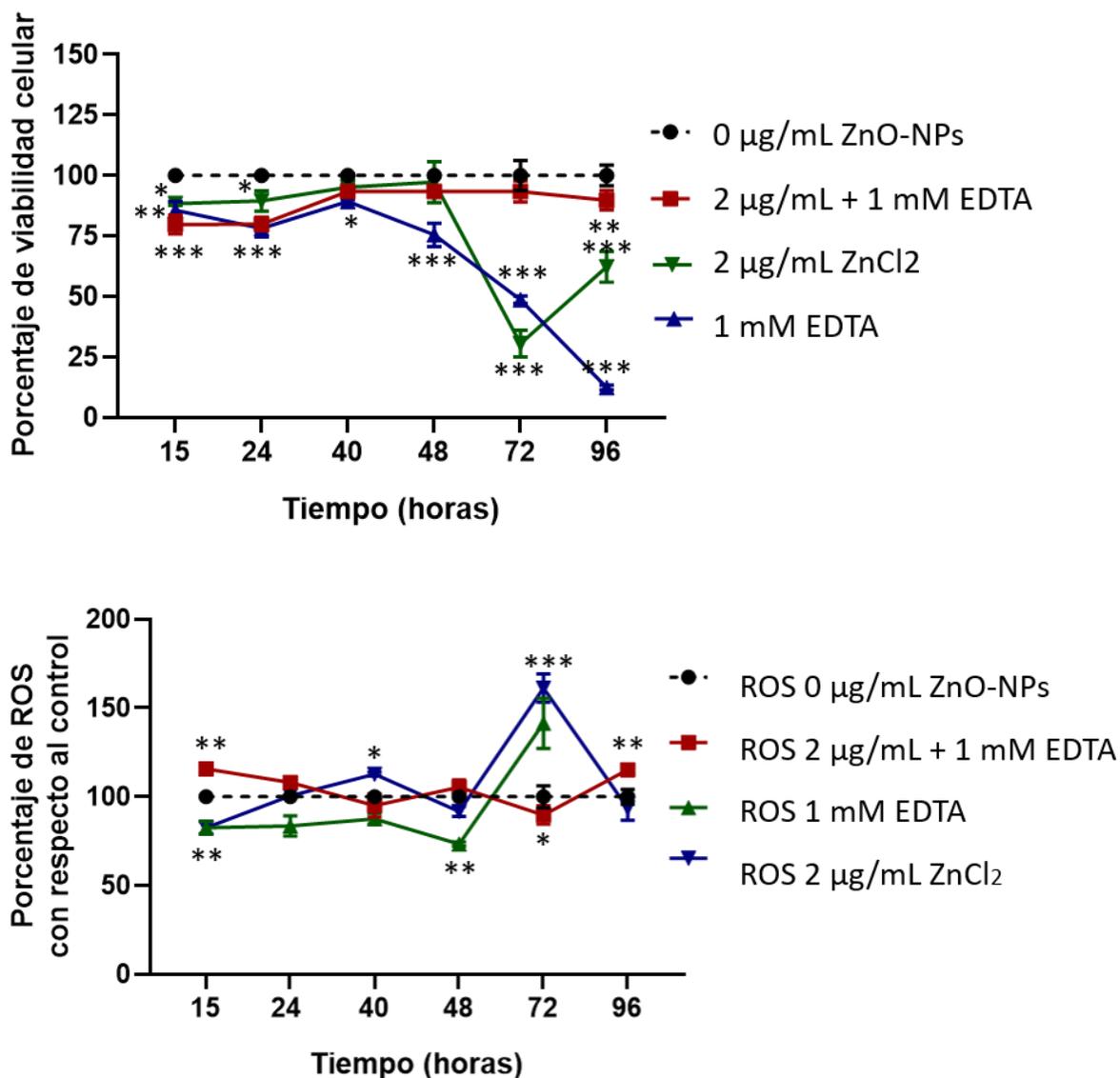
**Figura 31.** Análisis del potencial de membrana mitocondrial de macrófagos expuestos durante 120 horas a 2, 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs por microscopía láser confocal utilizando el fluoróforo JC-1. A) Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal, N.A=0.75, con una magnitud 20X. Hoechst 33342 (núcleos, azul), JC-1 agregado (filtro PI, rojo), JC-1 monómeros (verde, filtro FITC); B) Coeficiente de correlación de Pearson (r) de la fluorescencia de JC-1 agregado y monómero; C) Fluorescencia celular total corregida (CTCF); D) Radio entre fluorescencia celular total corregida (CTCF) rojo y verde. ANOVA de una vía y prueba posterior de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

En la figura 32, se observa que durante las primeras 24 horas hay una disminución significativa de la viabilidad de macrófagos expuestos a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs + 1 mM EDTA; sin embargo, posterior a las 40 horas no hay diferencias significativas con respecto al control. Por otro lado, la exposición a  $\text{ZnCl}_2$  causa una ligera disminución de la viabilidad durante las primeras 40 horas, y su toxicidad aumenta potencialmente después de 72 horas, lo que sugiere que los iones extracelulares son tóxicos para los macrófagos de la línea celular RAW264.7. Además, la exposición a 1 mM de EDTA causó una disminución gradual de la viabilidad a partir de las 72 horas, probablemente por la privación de iones  $\text{Zn}^{2+}$  vitales para el mantenimiento de las funciones y el metabolismo de los macrófagos. En cuanto a los niveles de ROS, los macrófagos expuestos a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs + 1 mM EDTA presentan un ligero aumento en los niveles de ROS durante las primeras 24 horas y después de las 96 horas de exposición, y se mantienen sin diferencias significativas entre estos tiempos; mientras que los niveles de ROS después de 72 horas de exposición a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$  incrementan considerablemente. Los niveles de ROS de macrófagos expuestos a 1 mM EDTA se mantienen ligeramente por debajo del control hasta las 72 horas, tiempo en el que se incrementan considerablemente, probablemente debido a la muerte celular.

Los macrófagos expuestos a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs + 1 mM EDTA y a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$  presentan resultados similares (figura 33), en donde aparentemente la presencia de únicamente ZnO-NPs no afecta severamente la viabilidad celular ni los niveles de ROS, mientras que 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$  disminuye la viabilidad celular y aumenta los niveles de ROS en los macrófagos a las 72 horas de exposición.

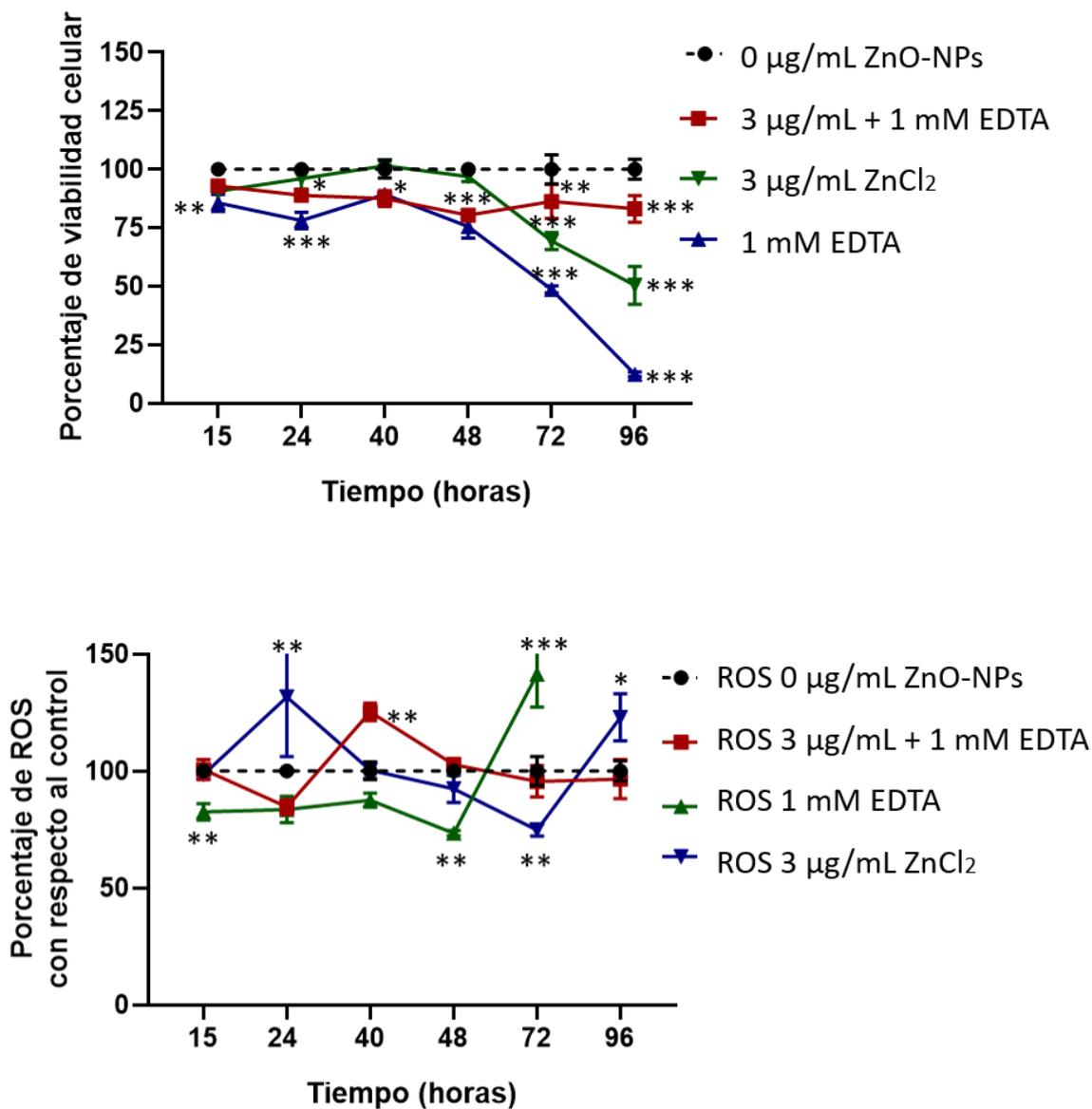
En la figura 34 se presentan los resultados obtenidos de la exposición de los macrófagos a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs + 1 mM EDTA y a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , es evidente que no hay diferencias significativas en la viabilidad de los macrófagos expuestos a ZnO-NPs hasta las 72 y 96 horas, en donde el número de células viables disminuye ligeramente. A las 72 horas no hay incremento en los niveles de ROS, por lo que el mecanismo que induce la muerte celular podría no estar relacionado directamente al estrés oxidativo. Interesantemente, la exposición a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$  es menos tóxica que a 2 y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a pesar del incremento en los niveles de ROS.

Lo anterior demuestra que las ZnO-NPs que no son capaces de liberar iones  $\text{Zn}^{2+}$  no causan una respuesta hormética en los macrófagos, y a su vez, que los iones  $\text{Zn}^{2+}$  no desencadenan la respuesta adaptativa. Por lo que las respuestas celulares observadas son causadas en conjunto por las ZnO-NPs y los iones  $\text{Zn}^{2+}$ , y por la liberación lenta y prolongada de los iones  $\text{Zn}^{2+}$  desde las NPs. Por lo tanto, las respuestas celulares observadas en este trabajo, están estrechamente ligadas al tamaño nanométrico. Además, no se observaron células gigantes multinucleadas, probablemente debido a la baja densidad celular, puesto que se observó una drástica disminución de la viabilidad a las 72 horas de exposición.



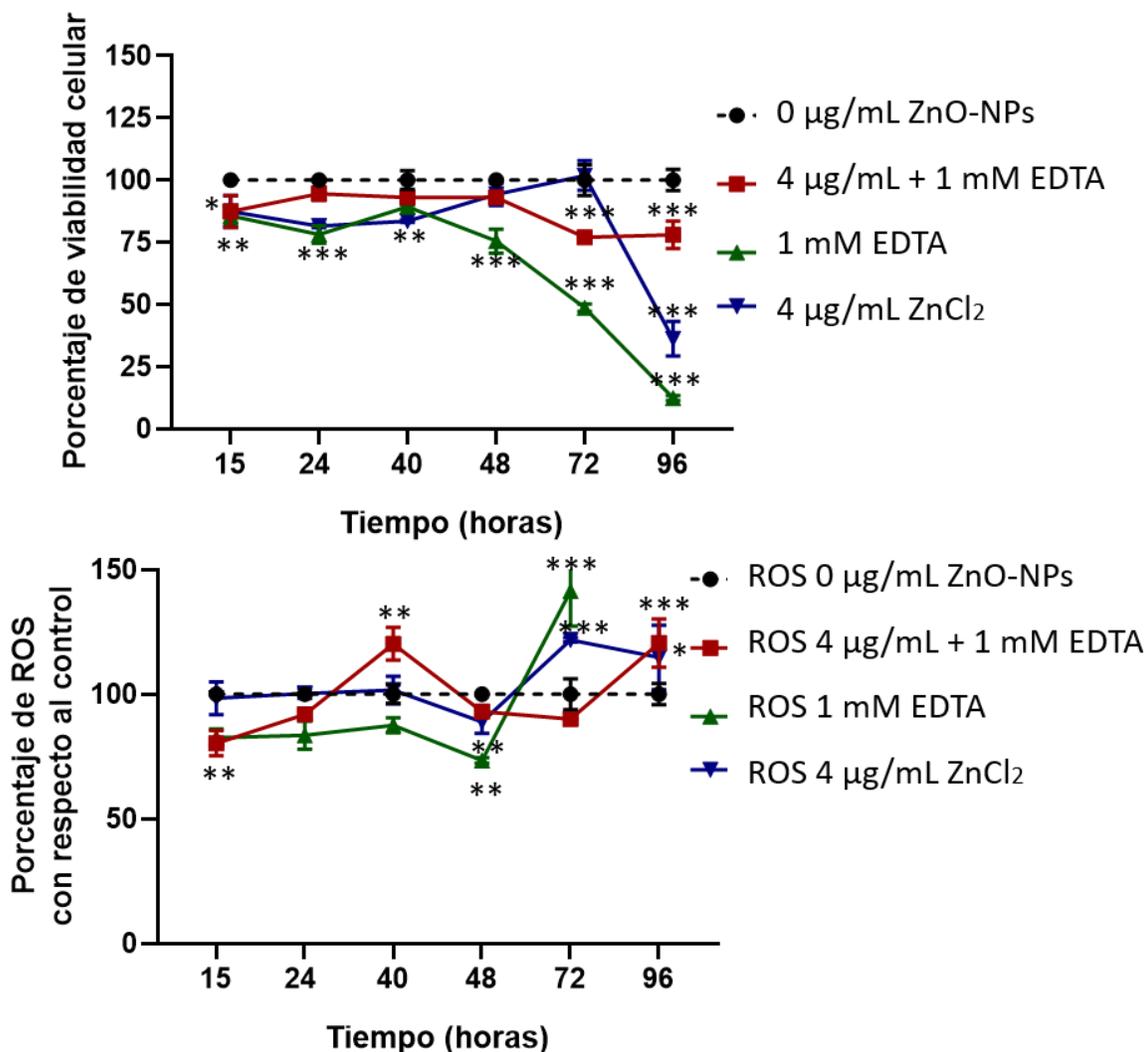
**Figura 32.** Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 2  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs + 1 mM EDTA como agente quelante de iones  $\text{Zn}^{2+}$ , y a 2  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$  como donador de iones  $\text{Zn}^{2+}$ . Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

Es importante mencionar que a las 72 horas los macrófagos expuestos a las ZnO-NPs ya presentan una respuesta hormética por lo que el efecto tóxico de los iones  $\text{Zn}^{2+}$  en este tiempo es determinante para la adaptación de las células y la decisión entre la proliferación o la muerte celular.



**Figura 33.** Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 3 µg/mL de ZnO-NPs + 1 mM EDTA como agente quelante de iones Zn<sup>2+</sup>, y a 3 µg/mL de ZnCl<sub>2</sub> como donador de iones Zn<sup>2+</sup>. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

Es necesario tomar en cuenta que, en estos experimentos, los iones Zn<sup>2+</sup> se encuentran presentes en el medio extracelular, por lo que la respuesta celular a iones Zn<sup>2+</sup> intracelulares podría ser distinta, y por lo tanto se requieren de mayores experimentos que puedan respaldar nuestra hipótesis.



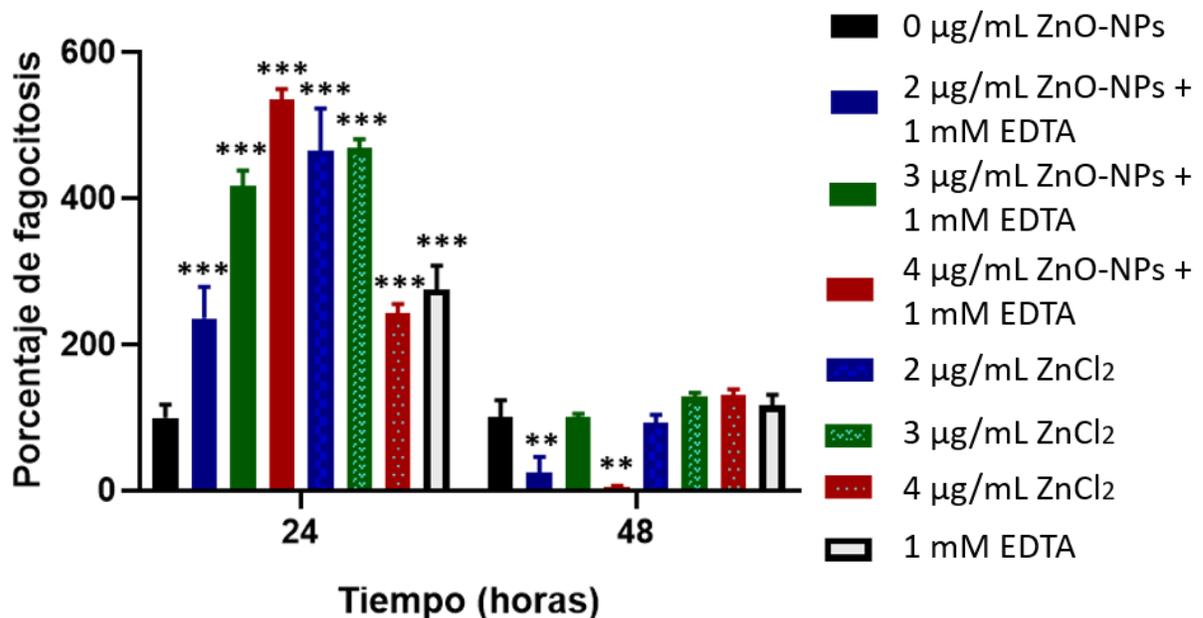
**Figura 34.** Viabilidad y producción de ROS en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos subcrónicamente durante 96 horas a 4 µg/mL de ZnO-NPs + 1 mM EDTA como agente quelante de iones Zn<sup>2+</sup>, y a 4 µg/mL de ZnCl<sub>2</sub> como donador de iones Zn<sup>2+</sup>. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . T-100X=Tritón 100X a 0.5%.

Debido a que las respuestas celulares de macrófagos expuestos a ZnO-NPs + 1 mM EDTA y a ZnCl<sub>2</sub> aparentemente causan respuestas celulares distintas a las observadas por la exposición a ZnO-NPs, se realizó el ensayo de fagocitosis previamente descrito. En la figura 35 se observa un considerable incremento en la capacidad fagocítica de macrófagos expuestos durante 24 horas a ZnO-NPs en presencia de un agente quelante de iones Zn<sup>2+</sup> y a ZnCl<sub>2</sub> como donador de iones Zn<sup>2+</sup>. Los macrófagos expuestos a 2, 3, 4 µg/mL ZnO-NPs + 1 mM EDTA, a 2, 3, 4 µg/mL de ZnCl<sub>2</sub> y a 1 mM EDTA durante 24 horas incrementan considerablemente su capacidad fagocítica con respecto al control, el incremento en la capacidad fagocítica de macrófagos expuestos a ZnCl<sub>2</sub> coincide con el potencial inmunomodulador de los iones Zn<sup>2+</sup>,

no obstante, para el caso de la exposición a ZnO-NPs en presencia de un agente quelante podría relacionarse a la interacción con el material a escala nanométrica.

El incremento en la fagocitosis de macrófagos expuestos a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$  no es tan considerable como a 2 y 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que podría deberse a que en estas concentraciones los iones  $\text{Zn}^{2+}$  no alteran la homeostasis del metabolismo del zinc en las células. De igual manera, el aumento de la fagocitosis en macrófagos expuestos a EDTA se puede deber a alteraciones en los niveles de zinc. Sin embargo, la fagocitosis de macrófagos expuestos a 2 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs + 1 mM EDTA durante 48 horas es prácticamente nula; mientras que a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y los macrófagos tratados con  $\text{ZnCl}_2$  mantienen su capacidad fagocítica igual al control; lo que indica que el efecto potenciador es temporal.

Con base en lo anterior, la capacidad fagocítica de macrófagos expuestos durante 24 horas a ZnO-NPs en presencia de un agente quelante y a  $\text{ZnCl}_2$  aumenta considerablemente debido probablemente a alteraciones en la homeostasis del metabolismo del zinc; además, podría haber un efecto antagónico entre los iones  $\text{Zn}^{2+}$  y las ZnO-NPs, ya que los macrófagos expuestos durante 24 horas a ZnO-NPs en ausencia de un agente quelante no presentaron un considerable incremento en su capacidad fagocítica.



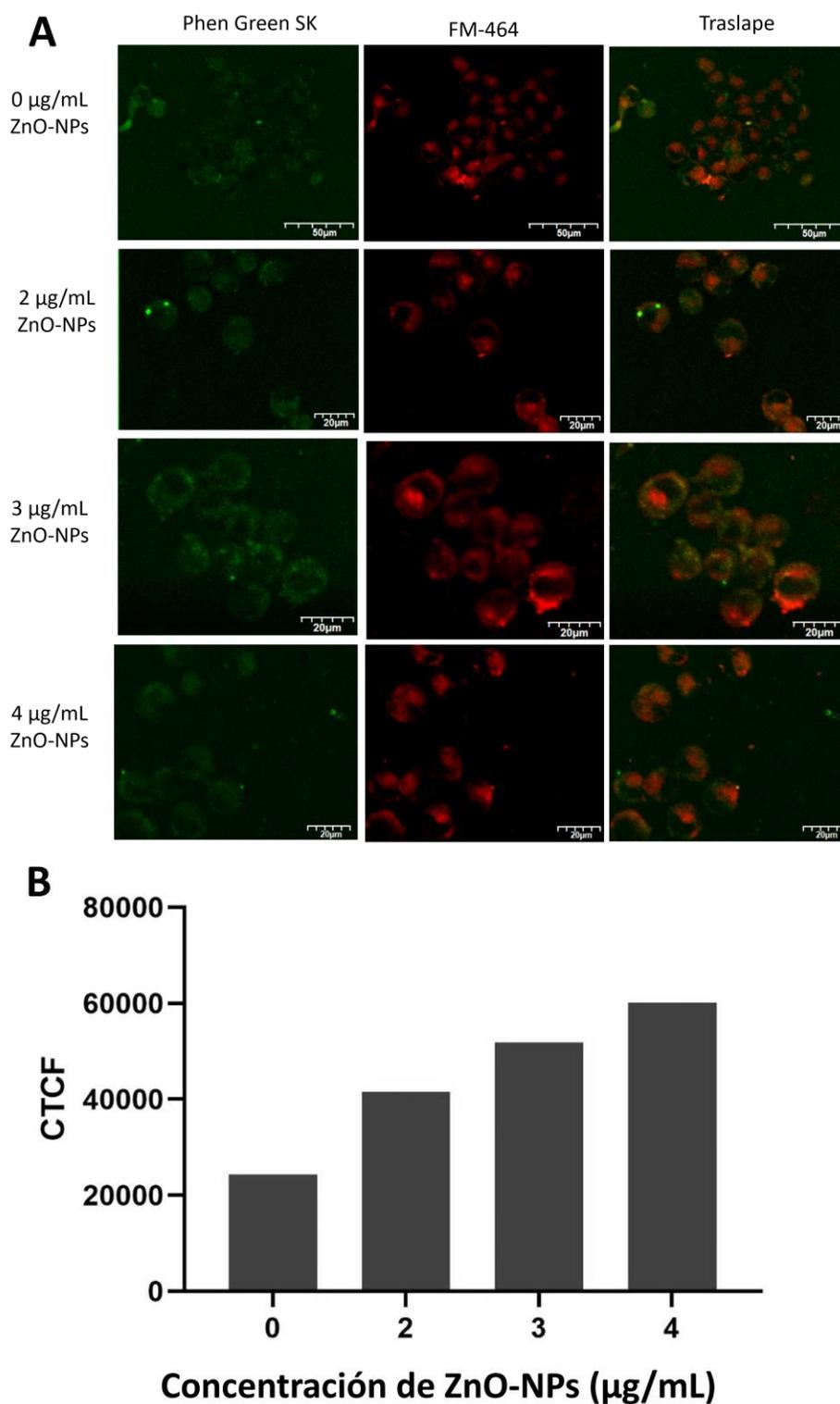
**Figura 35.** Capacidad fagocítica de macrófagos expuestos durante 24 y 48 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs + 1 mM de EDTA como agente quelante de iones  $\text{Zn}^{2+}$ , y a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Las alteraciones en la capacidad fagocítica de macrófagos no dependen únicamente de los iones  $\text{Zn}^{2+}$ . ANOVA de dos vías y prueba posterior de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

### 3.8 Efecto de la exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs en los niveles de iones en macrófagos

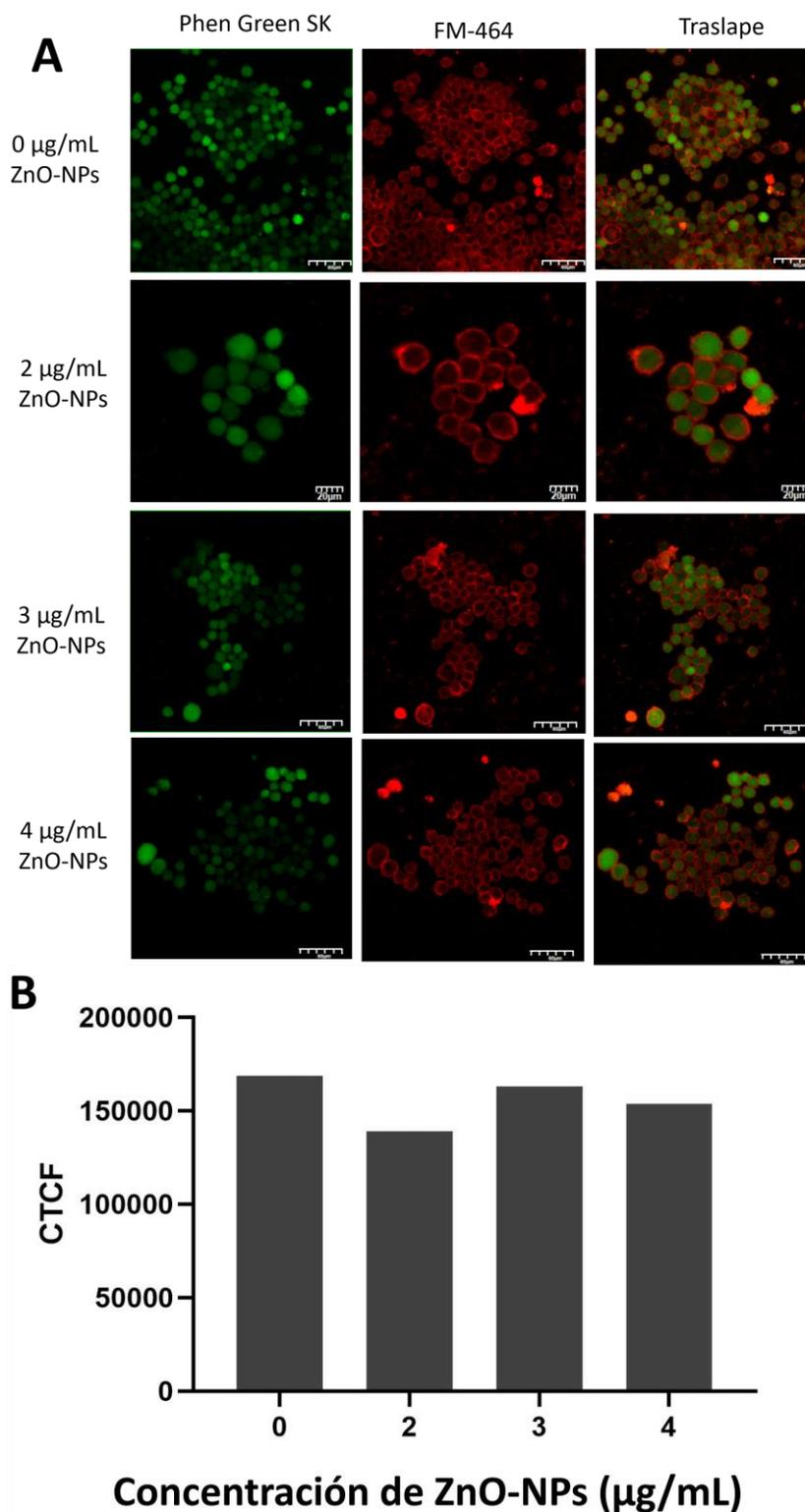
Debido a que el principal mecanismo de acción de los efectos de las ZnO-NPs involucra la liberación de iones  $Zn^{2+}$  y la internalización celular de los mismos, se decidió evaluar cualitativamente si la cantidad de iones zinc incrementaba en los macrófagos expuestos de forma subcrónica a las diferentes concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs. Por lo que macrófagos fueron expuestos durante 40, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs e incubados con el fluoróforo Phen Green SK, el cual funciona como un indicador de iones metálicos pesados como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , etc., y con el fluoróforo FM-464, con la finalidad de delimitar la membrana celular. Las células se visualizaron por microscopía confocal láser y las imágenes fueron analizadas mediante Fiji ImageJ para obtener la fluorescencia celular total corregida (CTCF).

En la figura 36 se presentan las imágenes obtenidas de macrófagos expuestos durante 40 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs, en donde se observan señales de fluorescencia verde puntuales en el citosol de las células, y la CTCF verde aumenta gradualmente en los macrófagos expuestos a las ZnO-NPs, lo que sugiere un incremento en los niveles de iones  $Zn^{2+}$ . Por otro lado, en la figura 37 se observa la fluorescencia del fluoróforo Phen Green SK en todo el citosol de macrófagos expuestos durante 96 horas a las distintas concentraciones de las ZnO-NPs, mientras que los valores de la CTCF de macrófagos tratados con las ZnO-NPs son similares con respecto al control, lo que sugiere que los macrófagos respondieron al incremento de iones reestableciendo el equilibrio. Los macrófagos expuestos subcrónicamente durante 120 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs presentaron una baja señal del fluoróforo Phen Green SK; sin embargo, la fluorescencia celular total corregida de macrófagos tratados con ZnO-NPs aumenta considerablemente en comparación con el control (figura 38). Lo anterior indica mayores niveles de iones metálicos  $Zn^{2+}$  en el interior de las células, que podrían estar relacionados con la internalización de ZnO-NPs, iones  $Zn^{2+}$ , o bien, con la inducción de respuestas celulares, ya que como se mencionó anteriormente, los iones  $Zn^{2+}$  tienen diversas funciones a nivel inmunológico y metabólico.

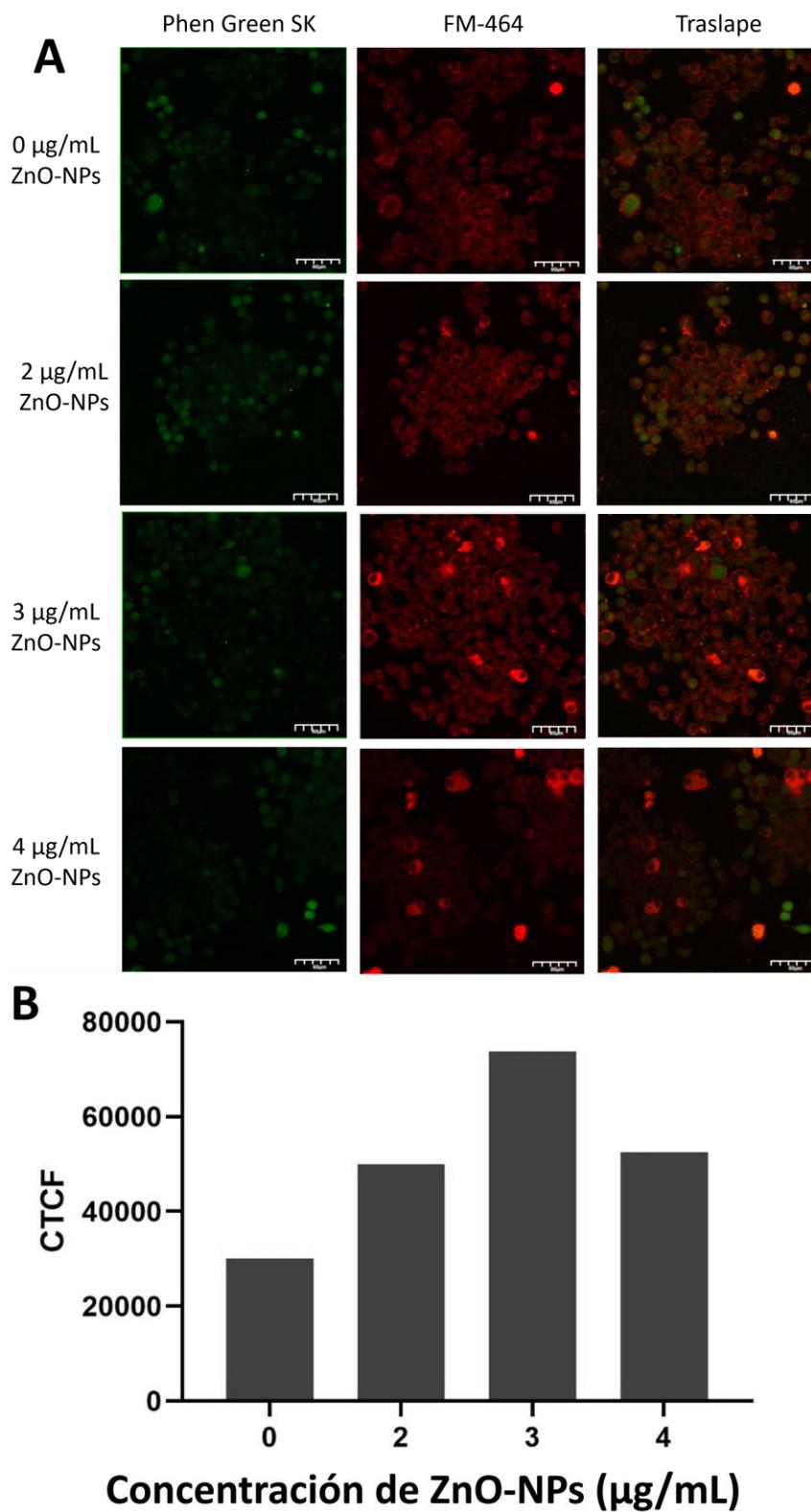
De manera general, la exposición subcrónica de los macrófagos a las ZnO-NPs causa un desequilibrio de los iones  $Zn^{2+}$  intracelulares, probablemente debido a la internalización de las ZnO-NPs o de los iones  $Zn^{2+}$ , no obstante, la cuantificación de iones  $Zn^{2+}$  a través de espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) podría complementar lo anterior para comparar los valores de manera más acertada.



**Figura 36.** Análisis de la presencia de iones zinc en macrófagos expuestos durante 40 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs mediante por microscopía láser confocal utilizando el fluoróforo Phen Green SK. A) Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal,  $N. A=0.75$ , con una magnitud 20X. FM-464 (filtro Texas Red, rojo), Phen Green SK (verde, filtro FITC); B) Fluorescencia celular total corregida (CTCF).



**Figura 37.** Análisis de la presencia de iones zinc en macrófagos expuestos durante 96 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs mediante por microscopía láser confocal utilizando el fluoróforo Phen Green SK. A) Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal,  $N. A=0.75$ , con una magnitud 20X. FM-464 (filtro Texas Red, rojo), Phen Green SK (verde, filtro FITC); B) Fluorescencia celular total corregida (CTCF).



**Figura 38.** Análisis de la presencia de iones zinc en macrófagos expuestos durante 120 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g/mL}$  de ZnO-NPs mediante por microscopía láser confocal utilizando el fluoróforo Phen Green SK A) Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal,  $N. A=0.75$ , con una magnitud 20X. FM-464 (filtro Texas Red, rojo), Phen Green SK (verde, filtro FITC); B) Fluorescencia celular total corregida (CTCF).

### **3.9 Efecto de la exposición subcrónica a ZnO-NPs en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunológica de macrófagos RAW264.7**

Para determinar si la exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs causa cambios en la expresión de genes involucrados en los procesos inmunológicos fundamentales de los macrófagos, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Para ello, se seleccionaron genes específicos que se relacionan con el fenotipo inflamatorio (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e iNOS) y el fenotipo antiinflamatorio (IL-10 y TGF $\beta$ ) que podrían ser resultado de la diferenciación o polarización de los macrófagos.

En la figura 39 se resumen los resultados obtenidos de la expresión relativa de genes que participan en procesos inflamatorios, en donde, de manera general, se presentan alteraciones a través del tiempo. Para comenzar, la interleucina 6 (IL-6) es una citocina tanto proinflamatoria como antiinflamatoria, que es secretada por los macrófagos en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos, e inducen cascadas de señalización que conducen a la producción de otras citocinas inflamatorias. La figura 39 carece de gráfica de expresión relativa (log<sub>2</sub> fold change) de IL-6 a las 40 horas debido a que no hubo amplificación a este tiempo. Sin embargo, a las 96 horas de exposición a 3  $\mu$ g/mL de ZnO-NPs se observa un aumento significativo con respecto al control de la expresión de IL-6, mientras que a las 120 horas no hay diferencias significativas a ninguna concentración.

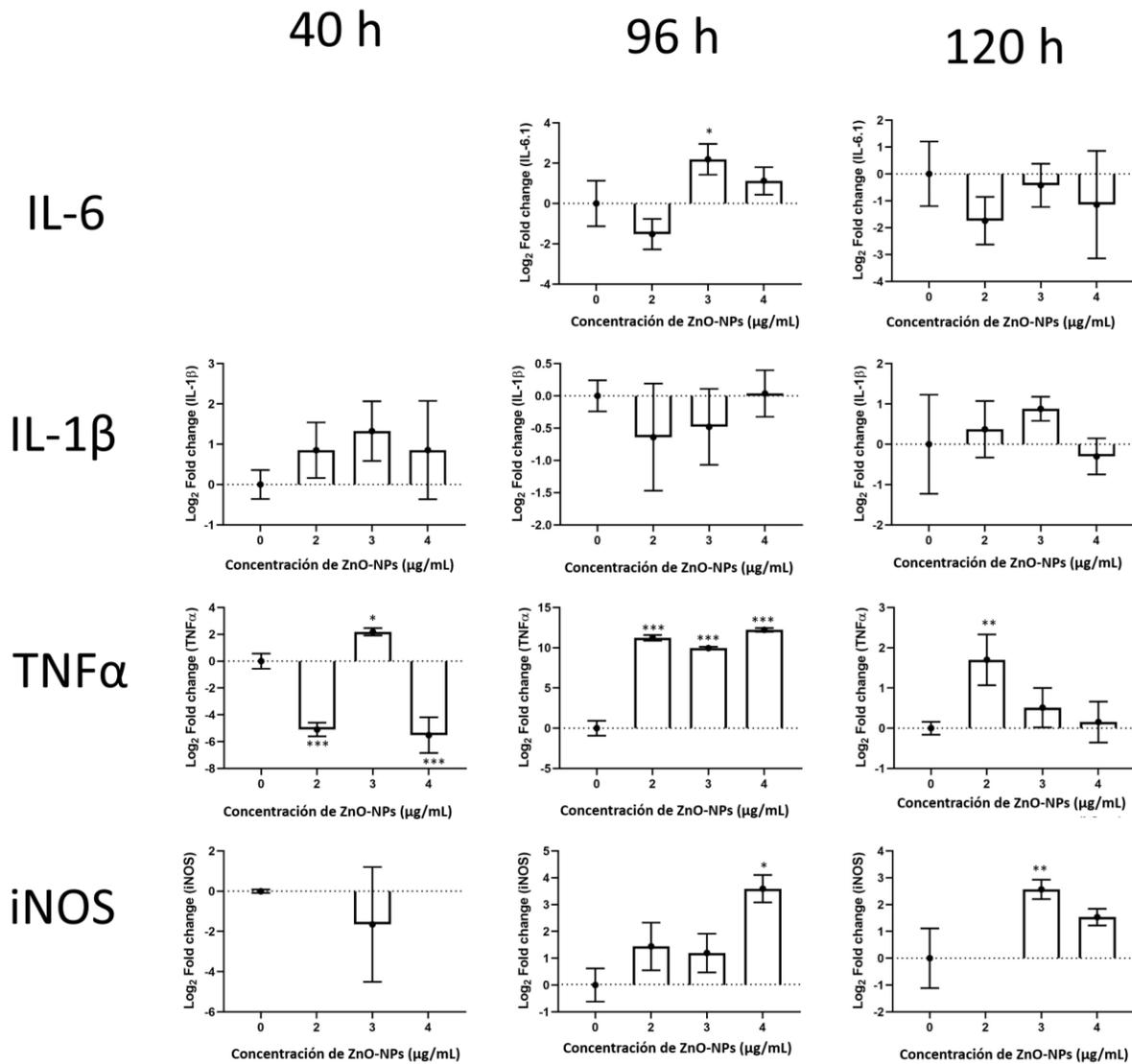
La expresión relativa del gen IL-1 $\beta$  no presenta diferencias significativas en comparación con el control a ninguna concentración ni tiempo de exposición a ZnO-NPs. El gen IL-1 $\beta$  codifica para la proteína que lleva el mismo nombre, y es considerado un marcador de respuesta inflamatoria de macrófagos.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una potente citocina inflamatoria y señalizadora, que ejerce funciones en distintos órganos e induce la producción de otras citocinas inflamatorias como IL-1 e IL-6. Debido a su función, también se encuentra involucrada en una gran variedad de enfermedades relacionadas con la inflamación crónica. Como se observa en la figura 39, este gen se encuentra sobreexpresado en los macrófagos expuestos durante 40 horas a 3  $\mu$ g/mL de ZnO-NPs, mientras que a 2 y 4  $\mu$ g/mL su expresión disminuye drásticamente con respecto al control. Interesantemente, después de 96 horas de exposición a las ZnO-NPs la expresión de TNF $\alpha$  aumenta drásticamente hasta 10 veces y vuelve a ser muy similar al control a las 120 horas. Lo anterior contrasta con los niveles de expresión de IL-6 e IL-1 $\beta$ , ya que la expresión de estos genes suele ser inducida por TNF $\alpha$ , por lo que podría haber una regulación negativa río abajo de estos genes.

La enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) tiene como función producir óxido nítrico, el cual es un mensajero y un potente bactericida. Solamente los macrófagos activados clásicamente (proinflamatorios) producen óxido nítrico. La exposición durante 40 horas a las ZnO-NPs no causa alteraciones en la expresión relativa del gen iNOS, pero a las 96 horas de exposición de los macrófagos a 4 µg/mL de ZnO-NPs sí hubo un incremento en el transcrito de este gen. Mientras que, a las 120 horas, se presenta un aumento significativo a 3 y 4 µg/mL de ZnO-NPs. A pesar de lo anterior, el ensayo de Griess, que mide los niveles de nitritos, no presenta diferencias en los niveles de las especies de óxido nítrico en ninguna concentración ni tiempo, por lo que podría haber una regulación negativa de dicha expresión río abajo. Con base en lo anterior, a pesar del considerable incremento en la expresión de TNF $\alpha$  por la exposición a las ZnO-NPs, aparentemente los macrófagos no presentan un fenotipo proinflamatorio.

En la figura 40 se presenta la expresión relativa de los genes antiinflamatorios de los macrófagos, IL-10 y TGF $\beta$ . Los macrófagos expuestos durante 40 horas a 3 µg/mL de ZnO-NPs presentan un aumento significativo en la expresión relativa de IL-10, disminuyendo drásticamente con respecto al control a las 96 horas en las células expuestas a 2 y 3 µg/mL de ZnO-NPs. Sin embargo, a las 120 horas de exposición a 4 µg/mL de ZnO-NPs la cantidad del transcrito aumenta considerablemente; mientras que, en las demás concentraciones, los niveles de expresión se vuelven similares al control. La interleucina 10 es una citocina antiinflamatoria que regula la inflamación a través de la inducción de otros agentes antiinflamatorios. Aparentemente, los niveles de expresión de TNF $\alpha$  e IL-10 se relacionan entre sí en los macrófagos expuestos durante 40 y 120 horas, mientras que, a las 96 horas, los niveles de IL-10 disminuyen drásticamente en contraste con los de TNF $\alpha$ , que se incrementan considerablemente. Se sabe que la IL-10 inhibe la liberación de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en los macrófagos.

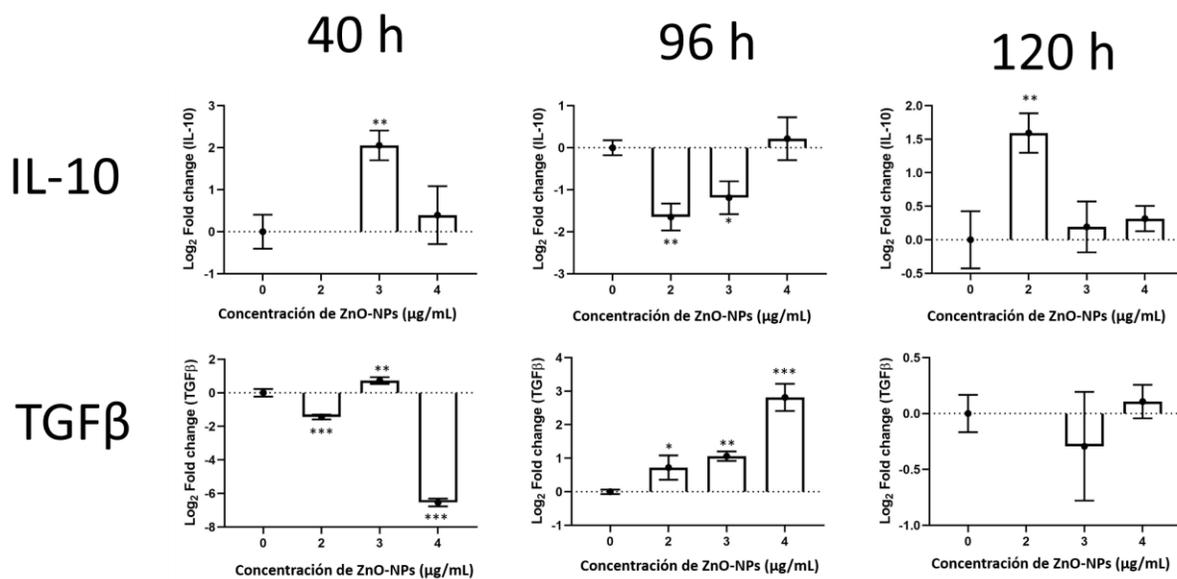
La expresión relativa de TGF $\beta$  presenta alteraciones con respecto al control a través del tiempo, excepto a las 120 horas de exposición. Durante las primeras 40 horas, la expresión de TGF $\beta$  disminuye ligeramente en respuesta a la exposición a 2 µg/mL de ZnO-NPs seguido de un ligero aumento con respecto al control a las 96 horas. Por otro lado, la exposición a 3 µg/mL de ZnO-NPs durante 40 horas induce un incremento mínimo en el transcrito de TGF $\beta$ ; sin embargo, dicho incremento se vuelve más pronunciado a las 96 horas. En contraste, la exposición a 4 µg/mL de ZnO-NPs durante 40 horas causa una disminución severa de la expresión relativa del gen TGF $\beta$ , y aumenta abruptamente a las 96 horas de exposición a ZnO-NPs. El factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) regula el crecimiento y la diferenciación de distintos tipos de células, entre ellas, las que componen el sistema inmunológico, controla la supervivencia, crecimiento, diferenciación y función efectora de las células.



**Figura 39.** Expresión relativa de los transcritos de genes proinflamatorios de macrófagos expuestos durante 40, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4 μg/mL de ZnO-NPs. ANOVA de una vía y prueba posterior de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

El incremento en los niveles de TGFβ a las 96 horas de exposición podría estar ligado a la formación de células gigantes multinucleadas, así como a la respuesta hormética que se está suscitando en ese momento.

De manera general, la exposición subcrónica de los macrófagos a las ZnO-NPs causa cambios en la expresión relativa de los genes IL-6, TNFα, iNOS, IL-10 y TGFβ, sin relacionarse aparentemente con algún fenotipo específico. Sin embargo, se requiere realizar un análisis más exhaustivo sobre la expresión de genes involucrados en procesos inmunológicos para concluir con certeza.



**Figura 40.** Expresión relativa de los transcritos de genes antiinflamatorios de macrófagos expuestos durante 40, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4 μg/mL de ZnO-NPs. ANOVA de una vía y prueba posterior de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ). \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Caracterización fisicoquímica de ZnO-NPs y CuO-NPs

La caracterización fisicoquímica de las ZnO-NPs y CuO-NPs sugiere que el tamaño de partícula es mucho mayor al proporcionado por el proveedor. El aumento en los parámetros fisicoquímicos de las ZnO-NPs dispersadas por sonicación y ultrasonificación se debe a la alta tendencia a la aglomeración/agregación observadas en las micrografías de TEM, lo que coincide con el bajo potencial zeta, e indica poca repulsión electrostática entre las partículas. Sin embargo, esta tendencia contrasta con lo observado en las nanopartículas de óxido de cobre, en donde las nanopartículas dispersadas mediante ultrasonificación presentan un tamaño menor que las dispersadas por sonicación. Aunado a estos hallazgos, las CuO-NPs ultrasonificadas poseen un alto potencial zeta lo que sugiere una alta estabilidad; no obstante, la amplia distribución de tamaño de partícula indica aglomeración/dispersión.

### 4.2 Citotoxicidad de las CuO-NPs en macrófagos RAW264.7

Líbalová *et al.*, 2018 sugieren que la citotoxicidad de las CuO-NPs se debe a la rápida disolución de las nanopartículas y la liberación de iones es uno de los principales factores que modulan la toxicidad, y que esta última no se relaciona con los niveles de ROS. No obstante, Shafagh *et al.*, 2015 reportó que la citotoxicidad de las CuO-NPs en la línea celular de cáncer humano K562, es mediante la generación de especies de oxígeno altamente reactivas, por lo que, al igual que con las ZnO-NPs, el papel de las ROS y el potencial oxidante o antioxidante se encuentra en discusión.

Por otro lado, Arancibia *et al.*, 2015 estudiaron el efecto en la respuesta inmunológica de macrófagos de ratones expuestos a nanopartículas de cobre por vía intraperitoneal, y observaron que existía un reclutamiento de macrófagos en el sitio de inyección, así como la inhibición en la producción de citocinas proinflamatorias y en la producción de óxido nítrico (NO) de manera dosis dependiente en macrófagos *in vitro* estimulados con LPS, y sugieren que el mecanismo involucrado se encuentra asociado al incremento en la actividad arginasa, cuya actividad enzimática se encuentra vinculada a la de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) dado que ambas enzimas utilizan el mismo sustrato. Por ello, los autores concluyen que la exposición a las CuO-NPs causa la supresión de la respuesta inmune innata por parte de los macrófagos.

### 4.3 Respuestas celulares de macrófagos RAW264.7 expuestos subcrónicamente a ZnO-NPs

La hormesis es comúnmente percibida como un fenómeno benéfico; sin embargo, dicha afirmación depende del contexto, ya que el efecto hormético se ha relacionado con trastornos metabólicos, enfermedades neurodegenerativas, entre otras. Se han reportado una gran cantidad de agentes que inducen una respuesta hormética entre las que se encuentran la radiación, metales pesados, antibióticos, entre otros; dicha respuesta involucra la expresión de un conjunto de genes que codifican para proteínas con funciones protectoras como enzimas antioxidantes, chaperonas, entre otras (López-Díazguerrero *et al.*, 2013). En la figura 41 se esquematiza la ruta de señalización de la hormesis. Diversos autores han reportado hormesis como respuesta a la exposición a nanomateriales en una gran variedad de sistemas biológicos, y ha ganado interés en los últimos años debido al incremento en la exposición a bajas concentraciones de nanomateriales (Iavicoli *et al.*, 2018). La disminución en los niveles de ROS de los macrófagos expuestos a las ZnO-NPs a las 15 horas, coincide con lo reportado por diversos autores sobre las propiedades antioxidantes de las ZnO-NPs; mientras que el posterior incremento en los niveles de ROS a las 40 horas seguido de la regulación del nivel de ROS, sugiere que se desencadenan mecanismos celulares de protección antioxidante tal y como lo plantea López-Díazguerrero *et al.*, 2013.

Se sabe que la expresión de genes protectores que participan en la respuesta hormética se modifican en aproximadamente 9 horas después de la exposición a un agente inductor, y a su vez, la expresión de genes relacionados con crecimiento y proliferación disminuye. Además, la hormesis permite que las células acondicionadas sean resistentes alrededor de 30 horas posteriores del estímulo inductor (Pickering *et al.*, 2013). Sin embargo, para el caso de los experimentos de este estudio, el estímulo inductor, es decir la exposición a las ZnO-NPs, permanece de manera constante, por lo que el efecto hormético podría prolongarse. Lo anterior coincide con los resultados previamente descritos, ya que se observa que a las 40 horas el incremento considerable en los niveles de ROS podría inducir el efecto hormético a través del aumento en la síntesis de enzimas antioxidantes y sus rutas de señalización intracelular, ya que a las 48 horas los niveles de ROS se normalizan, y una vez controlado el estrés oxidativo, la expresión de genes de crecimiento y proliferación se puede regular, y las células adaptadas podrían continuar con su ciclo celular. En este sentido, el incremento en los niveles de ROS es fundamental para el desarrollo de la respuesta hormética.

En un estudio conducido por Zhang *et al.*, 2020, los niveles de ROS se incrementaron después de 24 horas de exposición a 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs de aprox. 30 nm; mientras que en los resultados de

este estudio muestran una ligera disminución en dichos niveles. En contraste, Safawo *et al.*, 2018 concluye que las ZnO-NPs de 10.4 nm tienen actividad antioxidante. Además, Wang *et al.*, 2014 observaron un incremento en los niveles de ROS después de 12 horas de exposición a 100 µg/mL de ZnO-NPs de aprox. 50 nm. Actualmente existe una controversia sobre si las nanopartículas de ZnO incrementan o disminuyen los niveles de ROS, aunque de manera general, estas conclusiones dependen de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, las concentraciones y los tiempos de exposición empleados en cada estudio.

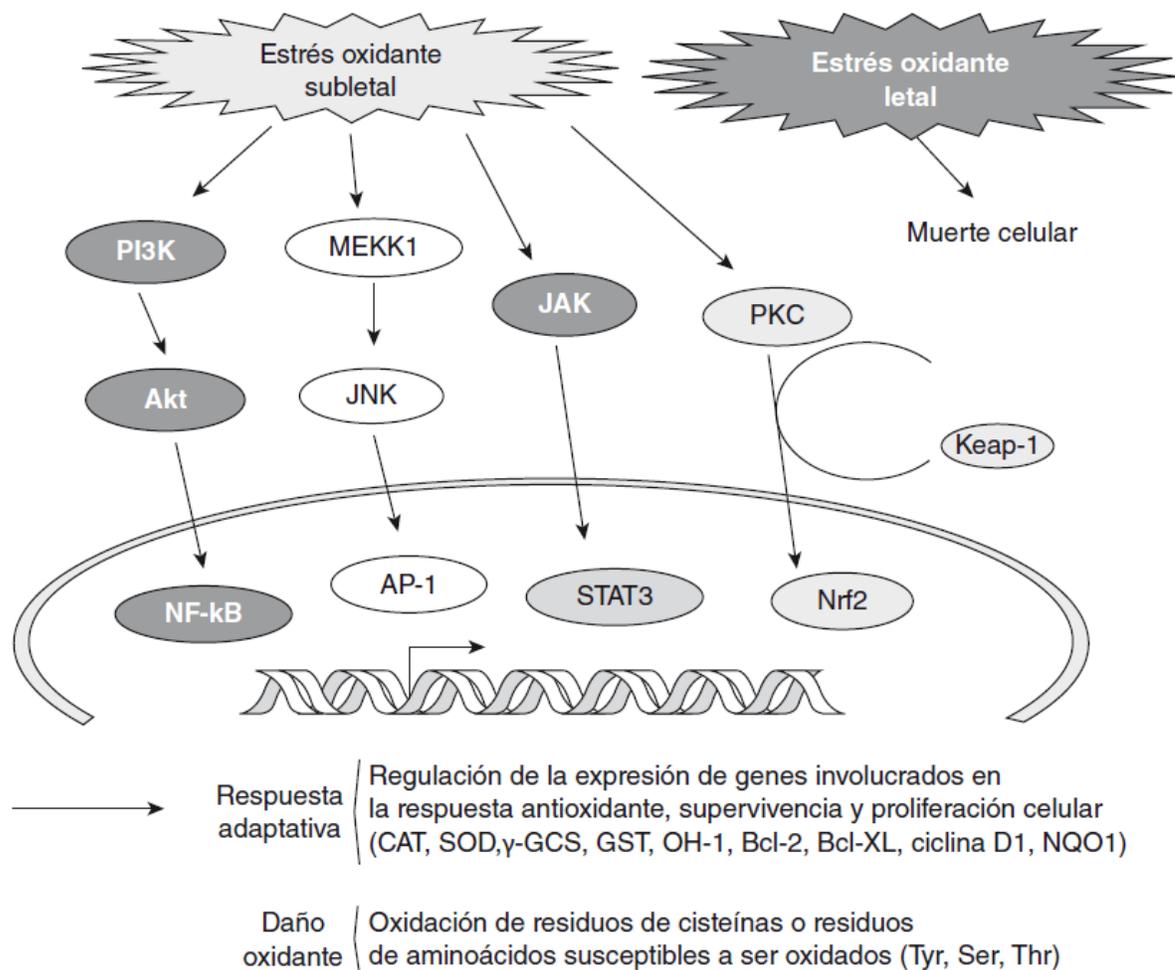
Keshavarzi *et al.*, en el año 2019 evidenciaron un efecto hormético en las mitocondrias aisladas del hígado de ratas expuestas a óxido de cobre de tamaño nanométrico y micrométrico. Sin embargo, nuestro estudio es el primero en evidenciar el efecto hormético y el periodo de preconditionamiento en macrófagos RAW264.7 expuestos a las ZnO-NPs y CuO-NPs.

Como se mencionó anteriormente, la exposición subcrónica a las ZnO-NPs causó la formación de células gigantes multinucleadas después de 96 horas de exposición, estas células se asocian con la inflamación crónica, lo que sugiere que las ZnO-NPs causan la activación de los macrófagos e inducen sus funciones inflamatorias. Sin embargo, conforme se incrementa el tiempo de exposición a las ZnO-NPs, el número de células gigantes disminuye, lo que podría deberse a una posterior disminución de la respuesta inflamatoria, o simplemente a la alta confluencia celular tras varios días de cultivo. Uno de los mecanismos más populares propuestos de fusión de macrófagos involucra la presencia de IL-4; sin embargo, Helming y Gordon, 2009 esquematizan otro mecanismo molecular de fusión de macrófagos que incluye la síntesis y exocitosis de la metaloproteína 9 (MMP9), enzima que emplea iones  $Zn^{2+}$  como cofactor. En la figura 42 se describe el mecanismo mencionado anteriormente. En este contexto, en el año 2013, Sousa *et al.*, reportaron la formación de células gigantes multinucleadas en cerdos de Guinea después de 12 semanas de recibir implantes en la mandíbula de nanocristales de ZnO de un tamaño promedio de 21 nm. Sin embargo, de acuerdo con búsquedas bibliográficas recientes, nuestro trabajo es el primero en reportar la formación de células gigantes multinucleadas de macrófagos expuestos *in vitro* a ZnO-NPs.

#### **4.3.1 Tamaño y complejidad relativa de los macrófagos expuestos a ZnO-NPs**

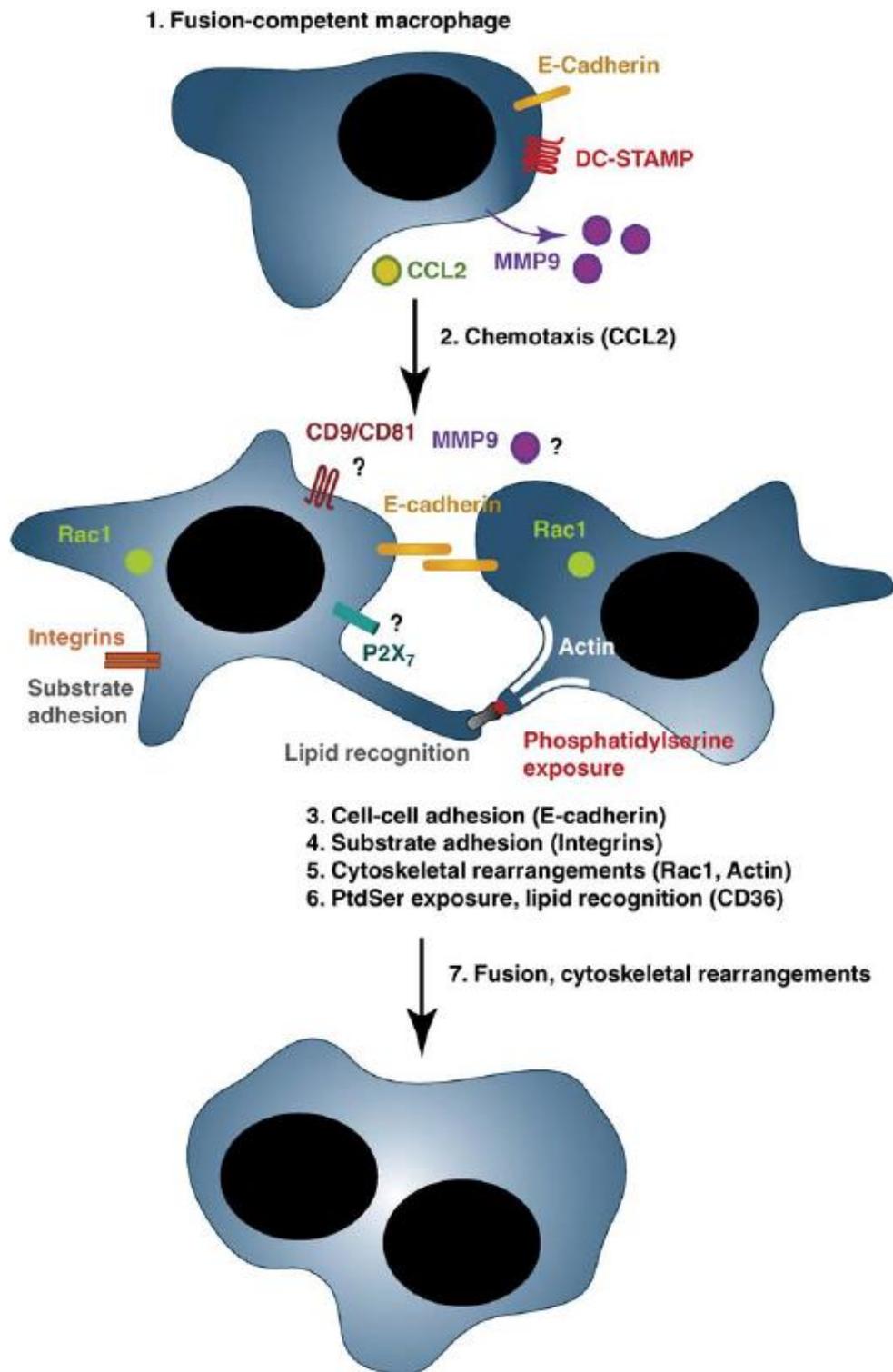
Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo sobre el tamaño y la complejidad interna relativa celular de los macrófagos, muestran una población heterogénea que cambia a través del tiempo en respuesta a la exposición a ZnO-NPs y aparentemente a la densidad celular del cultivo.

Como se mencionó anteriormente, los macrófagos incrementan su tamaño de manera considerable después de 96 horas de exposición a las ZnO-NPs, no obstante, la complejidad interna relativa se mantiene igual a la de macrófagos sin tratamiento.



**Figura 41.** Ruta de señalización de la hormesis. El estrés oxidante subletal conduce a la activación de rutas señaladoras dependientes de cinasas, que activan factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular; si el estrés oxidante es letal, éste conduce a la muerte celular. Tomado de López-Diazguerrero *et al.*, 2013.

En este contexto, Wilhelmi *et al.*, 2011 reportaron una disminución de tamaño y aumento de la granularidad o la complejidad celular interna en macrófagos expuestos durante 24 horas a 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ZnO-NPs de 10 nm. Este efecto fue atribuido a la muerte celular programada e internalización de nanopartículas, respectivamente; sin embargo, el aumento de la granularidad podría deberse a la formación de cuerpos apoptóticos.



**Figura 42.** Mecanismo molecular de fusión de macrófagos y formación de células gigantes multinucleadas. Tomado de Helming y Gordon, 2009.

Por otro lado, Roy *et al.*, 2013 evidenciaron un incremento considerable en la complejidad interna relativa de macrófagos expuestos durante 2 horas a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs de alrededor de 50 nm. Además, en contraste con los resultados reportados en nuestro estudio, reportaron alta citotoxicidad a la exposición durante 24 horas a bajas concentraciones (1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mientras que la exposición por dos horas a altas concentraciones (50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no tiene efecto citotóxico. El aumento de la complejidad interna de las células, se relaciona con la formación de endosomas a causa de la internalización de nanopartículas, la cual disminuyó drásticamente al utilizar bloqueadores de rutas de endocitosis como caveolas, clatrininas y receptores scavenger. Con base en los resultados, los autores sugieren que la alta concentración de nanopartículas podrían aumentar la probabilidad de aglomeración y de la interacción del nanomaterial con la célula. Aunado a estas observaciones, encontramos que la disminución del tamaño y la complejidad interna de los macrófagos expuestos por 120 horas a las ZnO-NPs coincide con la disminución en la viabilidad, probablemente debido a un decaimiento en la proliferación celular posterior a la respuesta hormética.

Los macrófagos murinos con fenotipo M1 y M2 se diferencian por su metabolismo de L-arginina, en donde los macrófagos M1 sintetizan óxido nítrico a partir de L-arginina; mientras que los M2 sintetizan poliaminas tomando la L-arginina como precursor, las cuales son de suma importancia para la proliferación celular (Modolell *et al.*, 1995). Con base en lo anterior, los resultados de nuestro trabajo en relación a los niveles de óxido nítrico, sugieren que probablemente la exposición a las ZnO-NPs dirige a los macrófagos hacia un fenotipo M2 que se caracteriza por sus funciones antiinflamatorias; sin embargo, esta hipótesis contrasta con lo observado anteriormente en la morfología de los macrófagos. En este sentido, Kim y Jeong, 2015 estudiaron las propiedades antiinflamatorias de ZnO-NPs de aprox. 200 nm en macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS e IFN- $\gamma$ , y observaron una inhibición de la producción de óxido nítrico y de citocinas proinflamatorias a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Además, Chia-Der *et al.*, 2014 observaron una disminución de los niveles de óxido nítrico; mientras que Roy *et al.*, 2013 reportaron un aumento en la concentración de nitritos en el medio de macrófagos tratados durante 24 horas con 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs. Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que no hay incremento en la producción de especies reactivas de nitrógeno en los macrófagos que fueron expuestos de forma subcrónica a las ZnO-NPs.

### 4.3.2 Capacidad fagocítica

La fagocitosis es un proceso activo mediado por receptores y dependiente de energía que tiene como finalidad la internalización de partículas en vesículas hacia el interior celular, y es una de las principales funciones de los macrófagos frente a una infección. Además, la fagocitosis es crucial para la comunicación entre el sistema inmune innato y el adaptativo, ya que este último depende de dicho proceso. Existe controversia sobre los efectos de las nanopartículas de óxido de zinc en las funciones fagocíticas de los macrófagos. Los resultados del presente estudio sugieren alteraciones en la capacidad de fagocitar bacterias de macrófagos expuestos previamente a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs de manera dependiente del tiempo de exposición y la concentración. Interesantemente, el aumento en la fagocitosis a las 96 horas de exposición a las ZnO-NPs coincide con el incremento de tamaño y el efecto hormético, lo que plantea un posible incremento tanto en la tolerancia como en las funciones celulares de los macrófagos expuestos a las ZnO-NPs. Aunado a esto, diversos autores mencionan que la internalización de ZnO-NPs podría ocurrir a través de los receptores que desencadenan fagocitosis. En este contexto, la fagocitosis de ZnO-NPs podría dirigir al aumento en la expresión de los receptores scavenger, de manosa, entre otros; que tendría como consecuencia el incremento en la probabilidad de detectar e interactuar con microorganismos. Por otro lado, la disminución de la fagocitosis a las 120 horas de exposición a las ZnO-NPs, podría estar relacionada con la disminución en la viabilidad, el tamaño y la complejidad celular como consecuencia de la culminación del proceso adaptativo conocido como hormesis. En ese sentido, no se encontraron en la literatura estudios previos sobre el efecto de la exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs en la capacidad fagocítica de macrófagos, por lo que los resultados obtenidos en esta investigación representan el primer estudio de dichos efectos.

El aumento de la fagocitosis es consistente con los resultados obtenidos por Chia-Der *et al.*, 2014, en donde ratones expuestos durante dos semanas por vía intranasal a 14 y 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs de 50 nm fueron infectados con *Haemophilus influenzae* no tipificable. El nivel de *H. influenzae* no tipificable en lavado broncoalveolar aumentó en ratones tratados con 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs en comparación con los ratones sin tratamiento, mientras que el nivel de dicha bacteria en el tejido pulmonar se incrementó por el tratamiento con ambas concentraciones de ZnO-NPs. Además, reportaron una disminución considerable en los niveles de macrófagos activados en ratones tratados con 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs e infectados con *H. influenzae* no tipificable, lo que sugiere un retraso en la resolución de la infección debido a la exposición a ZnO-NPs, y, por lo tanto, un aumento en el riesgo de infección pulmonar debida a la exposición previa a NPs.

Triboulet *et al.*, 2014 evaluaron las respuestas celulares de macrófagos RAW264.7 expuestos durante 24 horas a 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs catiónicas de aprox. 32 nm, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs de aprox. 117 nm y 120  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  y observaron una disminución minimamente significativa en el porcentaje de células fagocíticas (aprox. 90% con respecto al control) en los tres tratamientos, a pesar de las perturbaciones metabólicas y el daño al ADN.

En un estudio conducido por Aude-García *et al.*, 2015 emplearon la misma concentración y tiempo de exposición de ZnO-NPs previamente descritas por Triboulet *et al.*, 2014 en la línea celular de macrófagos J774, los resultados obtenidos difieren drásticamente de lo reportado en el estudio anterior, ya que el porcentaje de células fagocíticas decayó hasta 10% con respecto al control. La comparación de estas investigaciones indica que las respuestas celulares varían considerablemente en relación a las características fisicoquímicas de las ZnO-NPs y a la línea celular empleada.

#### **4.3.3 Potencial de membrana mitocondrial**

Una característica distintiva de las primeras etapas de la muerte celular programada es la alteración de las mitocondrias activas. Esta alteración mitocondrial incluye cambios en el potencial de membrana y alteraciones en el potencial de oxidación-reducción de las mitocondrias. Se presume que los cambios en el potencial de membrana están asociados con la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPTP), lo que permite el paso de iones y moléculas pequeñas. El equilibrio de iones resultante conduce a su vez al desacoplamiento de la cadena respiratoria y la liberación de citocromo c en el citosol. Un parámetro que indica la estabilidad de la función mitocondrial es el potencial de membrana mitocondrial, este parámetro es fundamental para mantener la función fisiológica de generación de ATP a través de la cadena respiratoria, por lo que si se encuentra comprometido podría conducir a la muerte celular.

La sonda fluorescente JC-1 es ampliamente utilizada en la determinación del potencial de membrana mitocondrial y emite a dos longitudes de onda a fin de detectar monómeros y agregados. En condiciones de homeostasis, se presenta una mayor fluorescencia de agregados (rojo) que de monómeros (verde) debido al interior energizado y cargado negativamente; mientras que una mayor intensidad de monómeros indica despolarización de la membrana mitocondrial.

Los resultados obtenidos en este estudio, en la exposición de los macrófagos a ZnO-NPs durante 40 horas, muestran una disminución en la relación agregados/monómeros con respecto al control, lo cual es un indicativo de la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Esto podría deberse al incremento en los niveles de ROS, sin embargo, se ha reportado que la activación de los macrófagos por LPS causa una despolarización de la membrana mitocondrial debido al costo energético, por lo que la alteración del potencial de membrana mitocondrial que se encontró en este estudio, podría ser causada por otro fenómeno que implique un alto costo energético, como podría ser la internalización de ZnO-NPs.

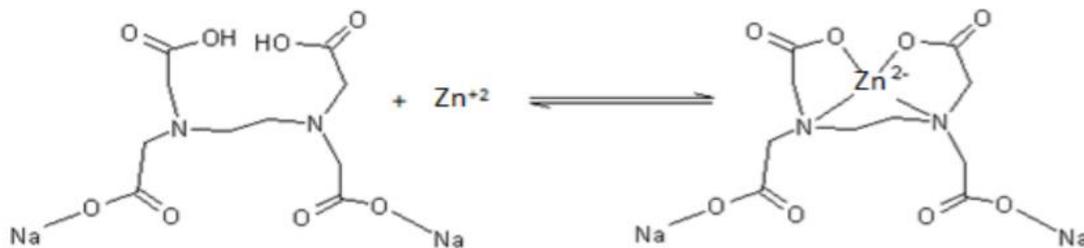
Resultados similares fueron obtenidos por Aude-Garcia *et al.*, 2015, en donde observaron una drástica disminución en el porcentaje de células positivas a JC-1 en macrófagos expuestos durante 24 horas a 8 µg/mL de ZnO-NPs de aprox. 32 nm. De manera consistente, Zhang *et al.*, 2012 reportaron disminución del potencial de membrana mitocondrial con respecto al control por exposición durante 24 horas a 5, 10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL de ZnO-NPs de 100 nm, 30 nm y 10-30 nm. No obstante, no existe en la literatura un estudio de las alteraciones a través del tiempo en el potencial de membrana mitocondrial debido a la exposición subcrónica a las ZnO-NPs.

Por otro lado, la transición entre los estados polarización/despolarización del potencial de membrana mitocondrial a través del tiempo en las distintas concentraciones de ZnO-NPs podrían ser resultado de la mitohormesis. La mitohormesis es una respuesta al estrés que conduce a adaptaciones que ocurren cuando los macrófagos pasan de un estado de respuesta contra LPS, a uno de tolerancia hacia dicho estímulo, lo que conlleva a la alteración de la transcripción de genes proinflamatorios (Timblin *et al.*, 2021). Esta respuesta inducida mediante enfoques farmacológicos causa la supresión del metabolismo oxidativo mitocondrial y de la producción de acetil-CoA, sustratos clave para la acetilación de histonas y la regulación de genes proinflamatorios, imponiendo un estado de tolerancia al estímulo LPS. En este sentido, el oxígeno reactivo mitocondrial (mtROS) y las especies electrofílicas mitocondriales (mtRES) participan como moléculas de señalización que desencadenan la mitohormesis como un mecanismo de retroalimentación negativa para contener la inflamación a través de la tolerancia. Los procesos moleculares propuestos incluyen la fosforilación reversible río abajo de la cascada de señalización de AMP cíclico (AMPC) y la desacetilación mediada por sirtuina (Palmeira *et al.*, 2019), conduciendo al aumento de la actividad de chaperonas mitocondriales (HSF1), la resistencia al estrés oxidativo mitocondrial (NRF2) y la glucólisis aeróbica para inducir la tolerancia, al mismo tiempo, disminuye el metabolismo oxidativo (Timblin *et al.*, 2021). En este caso, el estímulo constante por la interacción de ZnO-NPs con TLRs en los macrófagos y el posible aumento de mtROS y mtRES podría desencadenar la mitohormesis.

#### 4.3.4 Respuestas celulares de los macrófagos a los iones $Zn^{2+}$

Como se ha mencionado previamente, diversos autores proponen que las respuestas celulares observadas por la exposición de las células a las ZnO-NPs se deben a la liberación de iones  $Zn^{2+}$ . El zinc es un oligoelemento debido a que los seres humanos requieren concentraciones pequeñas para el correcto funcionamiento del organismo, y se encuentra en constante recambio. Los iones  $Zn^{2+}$  forman parte del núcleo catalítico como estabilizadores estructurales de más de 300 enzimas, por lo que se encuentra distribuido en el núcleo, membranas y en el citoplasma, y existen diversos grupos de proteínas que participan en la regulación y homeostasis de los niveles intracelulares de  $Zn^{2+}$  (Wang *et al.*, 2020). Por lo tanto, las alteraciones en la homeostasis del zinc, ya sea deficiencia o exceso, comprometen el funcionamiento de la maquinaria celular y podrían alterar procesos fisiológicos como el crecimiento y la respuesta inmunitaria (Fukada *et al.*, 2011).

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fue utilizado como agente quelante de iones divalentes, debido a su capacidad de coordinar metales pesados de forma reversible por cuatro posiciones acetato y dos amino, por lo que se le denomina ligando hexadentado (Chirinos, 2016). De estos enlaces, al menos dos forman un enlace coordinado con el ión metálico. La reacción conduce a la formación del quelato, nombre que reciben los compuestos de coordinación como resultado de la unión entre el agente quelante y el ión metálico, en donde el EDTA actúa con una especie de “pinza” que envuelve el ion divalente (Segura *et al.*, 1997). El zinc forma un complejo soluble y estable 1:1 con el EDTA como se muestra en la figura 43.



**Figura 43.** Reacción química del agente quelante EDTA con iones  $Zn^{2+}$ . Tomado de Chirinos, 2016.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sobre la viabilidad de macrófagos expuestos hasta las 96 horas a  $ZnCl_2$ , muestran un efecto tóxico sólo después de las 72 horas de exposición a la sal de zinc. En contraste con lo anterior, Triboulet *et al.*, 2014 reportaron una disminución en la viabilidad de macrófagos RAW264.7 expuestos durante 24 horas a  $Zn^{2+}$  (140-200  $\mu M$ ), y observaron un incremento en los niveles de

este ion en el interior celular de los macrófagos expuestos a ZnO-NPs y acetato de sodio. En cuanto al estrés oxidativo, los autores sugieren que los iones  $Zn^{2+}$  y las ZnO-NPs no inducen por sí mismos estrés oxidativo severo, como sí lo hacen los iones  $Cu^{2+}$  o  $Fe^{2+}$ , debido a que el ion  $Zn^{2+}$  no puede participar en ciclo de reducción-oxidación (redox) entre iones de diferentes valencias; por lo tanto, el aumento de estrés oxidativo sería un resultado indirecto de las perturbaciones celulares. Esta podría ser la razón por la cual en nuestro trabajo se encontró que las CuO-NPs son altamente tóxicas, mientras que los macrófagos pueden adaptarse a las diferentes concentraciones de ZnO-NPs.

Como se mencionó anteriormente en la sección de resultados, la exposición a  $ZnCl_2$  y a ZnO-NPs en presencia de EDTA no causa aumento en los niveles de ROS ni respuesta hormética en los macrófagos, lo que soporta la teoría de que las ROS desencadenan la hormesis; esto también indica que la hormesis depende tanto de la liberación de iones  $Zn^{2+}$  como del tamaño nanométrico del material.

La fagocitosis de patógenos y la activación del estallido respiratorio para su posterior eliminación, se encuentran influenciadas positivamente por los niveles del ion  $Zn^{2+}$  (Itoh *et al.*, 2005), esto se refleja con los resultados de nuestro trabajo sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos previamente expuestos a las ZnO-NPs,  $ZnCl_2$  y ZnO-NPs+EDTA; sin embargo, se observó que este efecto no se mantiene a través del tiempo y varía entre los distintos tratamientos, lo que sugiere que hay otro mecanismo que podría estar alterando la capacidad de fagocitar agentes exógenos y que pudiera estar vinculado probablemente al tamaño nanométrico, haciendo que el efecto de los iones  $Zn^{2+}$  sea temporal, hasta que los mecanismos de regulación de este tipo de iones se encarguen de que la célula vuelva a sus niveles de homeostasis.

#### **4.4 Niveles de iones metálicos intracelulares**

Los resultados obtenidos del análisis de las imágenes de fluorescencia del reactivo Phen Green SK obtenidas mediante microscopía láser confocal, indican alteraciones en los niveles de iones metálicos intracelulares en macrófagos expuestos a las ZnO-NPs a través del tiempo, en donde tras 40 horas de exposición hay un aumento gradual de la fluorescencia por el tratamiento con 2, 3 y 4  $\mu g/mL$  de ZnO-NPs. Sin embargo, después de 96 horas de exposición, se observa que la intensidad de la fluorescencia es similar en macrófagos tratados y sin tratamiento, lo que sugiere que los macrófagos son capaces de regular los niveles de iones  $Zn^{2+}$  volviendo a la homeostasis a pesar de la constante presencia de las ZnO-NPs. No

obstante, a las 120 horas se aprecia claramente la existencia de otra etapa de incremento en la fluorescencia que se relaciona con los niveles de iones  $Zn^{2+}$ , por lo que esa regulación previa puede ser nuevamente rebasada cuando se agregan nuevamente ZnO-NPs al medio extracelular. Esto podría ser indicativo de que los macrófagos se adaptan al estímulo estresante y esto les permite regularlo a pesar de que aumente a niveles que podrían causar la muerte celular; sin embargo, las respuestas celulares se encaminan en volver a la homeostasis más que adaptarse al nuevo entorno.

Los macrófagos tienen mecanismos de regulación de los niveles de  $Zn^{2+}$ , entre los que se encuentra el factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a metales (MTF-1) que sensa los iones  $Zn^{2+}$  libres a través de 6 dominios de dedos de zinc que estabilizan los niveles de iones a través de la regulación de la transcripción de metaloproteínas y transportadores de  $Zn^{2+}$  (Litchen *et al.*, 2011). Además, la expresión de transportadores de zinc es regulada por citocinas como  $TNF\alpha$  e IL-6, por lo que las alteraciones en los niveles de  $Zn^{2+}$  intracelular también se encuentran ligadas a la expresión de dichas citocinas (Cousins *et al.*, 2006). Para determinar esto, es necesario llevar a cabo un análisis transcriptómico o proteómico que nos permita averiguar si los genes y proteínas involucrados en dichos procesos aumentan su expresión y concentración, respectivamente, a causa de la exposición a ZnO-NPs.

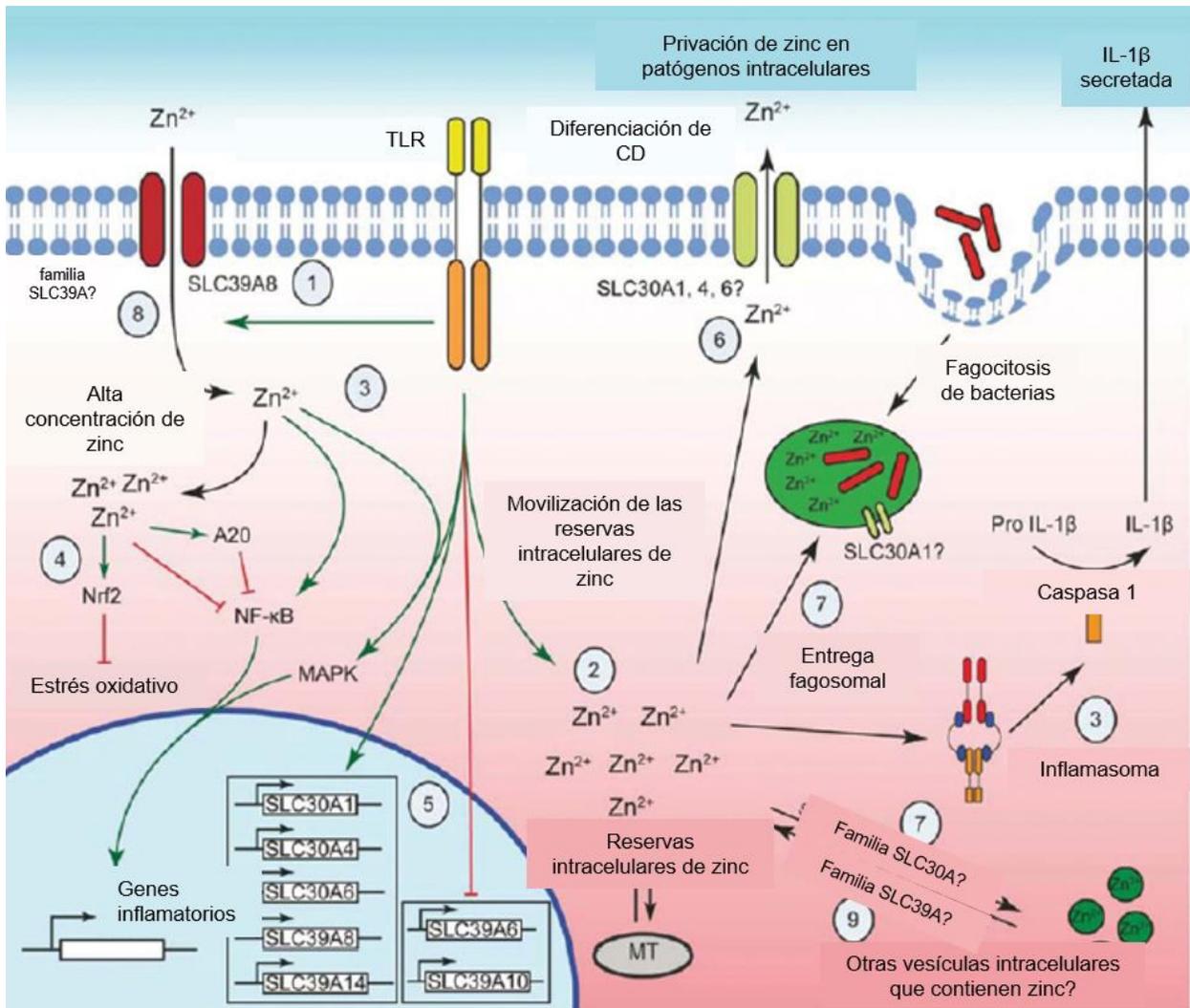
Wang *et al.*, 2020 mencionan que el secuestro de iones  $Zn^{2+}$  en los organelos y su liberación controlada permiten la adaptación a alteraciones fisiológicas y ambientales, lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre la hormesis como respuesta adaptativa a la presencia de ZnO-NPs, esta respuesta podría relacionarse con un aumento en los niveles intracelulares de iones  $Zn^{2+}$  debido a la disolución de las ZnO-NPs en el medio celular o en los lisosomas intracelulares. Aunado a esto, desconocemos si las ZnO-NPs son internalizadas en los macrófagos y cual es su destino final, ya que incluso se ha reportado exocitosis de vesículas cargadas con nanopartículas (Serda *et al.*, 2010).

Si bien la exposición de los macrófagos a las ZnO-NPs permite especular que el aumento en la fluorescencia se relaciona con un incremento de los iones  $Zn^{2+}$ , es importante considerar que el reactivo Phen Green SK no es específico para estos iones y es un ensayo cualitativo.

## 4.5 Alteraciones en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunológica

Debido a las respuestas celulares observadas por la exposición subcrónica a ZnO-NPs, se realizó el análisis de la expresión de genes involucrados en la diferenciación hacia un fenotipo proinflamatorio M1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e iNOS) o antiinflamatorio M2 (IL-10 y TGF $\beta$ ). De manera general, las alternancias a través del tiempo en la expresión de los transcritos de los genes tanto proinflamatorios como antiinflamatorios no indica diferenciación hacia un fenotipo específico, por lo que, la inducción y la represión de ciertos genes podría estar relacionada en mayor medida con rutas de señalización implicadas en la regulación de los efectos negativos de las ZnO-NPs más que con la inflamación o antiinflamación. En este sentido, Strafford *et al.*, 2013 reportan la interacción entre el tráfico intracelular del Zn<sup>2+</sup>, y la señalización inflamatoria y las respuestas antimicrobianas en macrófagos. En la figura 44 se resumen estas interacciones. Para comenzar, la señalización de TLR causa en minutos la acumulación de iones Zn<sup>2+</sup> intracelulares, proceso mediado a través del importador de zinc SLC39A8 (1) y la distribución de las reservas de zinc (2). A su vez, se requiere de zinc para la activación de una gran variedad de señales de TLR, entre ellas, la translocación de NF- $\kappa$ B y MAPK (3); no obstante, los altos niveles de zinc causan inhibición de las vías de señalización inflamatorias en los macrófagos mediante la inhibición de IKK $\beta$  o la inducción de Nrf2 y A20 (4). Como se observa en la figura, la señalización de TLR también modula la expresión de genes que codifican para transportadores de zinc (5); entre ellos los transportadores de la familia SLC30A, que son regulados de manera positiva y podrían actuar promoviendo la salida de zinc con dos distintos objetivos: privar al patógeno de zinc (6) o administrar zinc al fagosoma y otras vesículas para inducir toxicidad por zinc (7), mientras que se regulan de manera negativa miembros de la familia SLC39A para evitar la entrada de zinc y promover su salida en algunas condiciones (8) en conjunto con la exportación de zinc mediante el transporte vesicular (9). Esta regulación dependiente de la concentración intracelular de Zn<sup>2+</sup> de proinflamación y antiinflamación, podría explicar las alteraciones a través del tiempo en la expresión de los genes estudiados; sin embargo, la internalización de las ZnO-NPs en los macrófagos podría interactuar de manera directa o indirecta con estas rutas de señalización.

En contraste con lo mencionado previamente, la salida de zinc por los transportadores y la administración de zinc en otras vesículas podría tener como objetivo volver a la homeostasis de zinc una vez que la respuesta inflamatoria concluya.



**Figura 44.** Interacción entre el tráfico intracelular de  $Zn^{2+}$ , ruta de señalización inflamatoria y respuestas antimicrobianas en macrófagos. Tomado de Stafford *et al.*, 2013.

Por otro lado, Roy *et al.*, 2014 reportaron que la exposición a 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs durante 24 horas causa respuestas inflamatorias en macrófagos a través de la interacción con el receptor tipo Toll 6 (TLR6), probablemente debido a la formación de complejos entre nanopartículas, lipoproteínas y peptidoglicanos. En contraste con nuestros resultados, en este estudio se presentó un considerable incremento en la expresión de IL1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e iNOS. Estudios *in vivo* también sugieren desarrollo de una respuesta inflamatoria y diferenciación hacia el fenotipo M1 (Chang *et al.*, 2013).

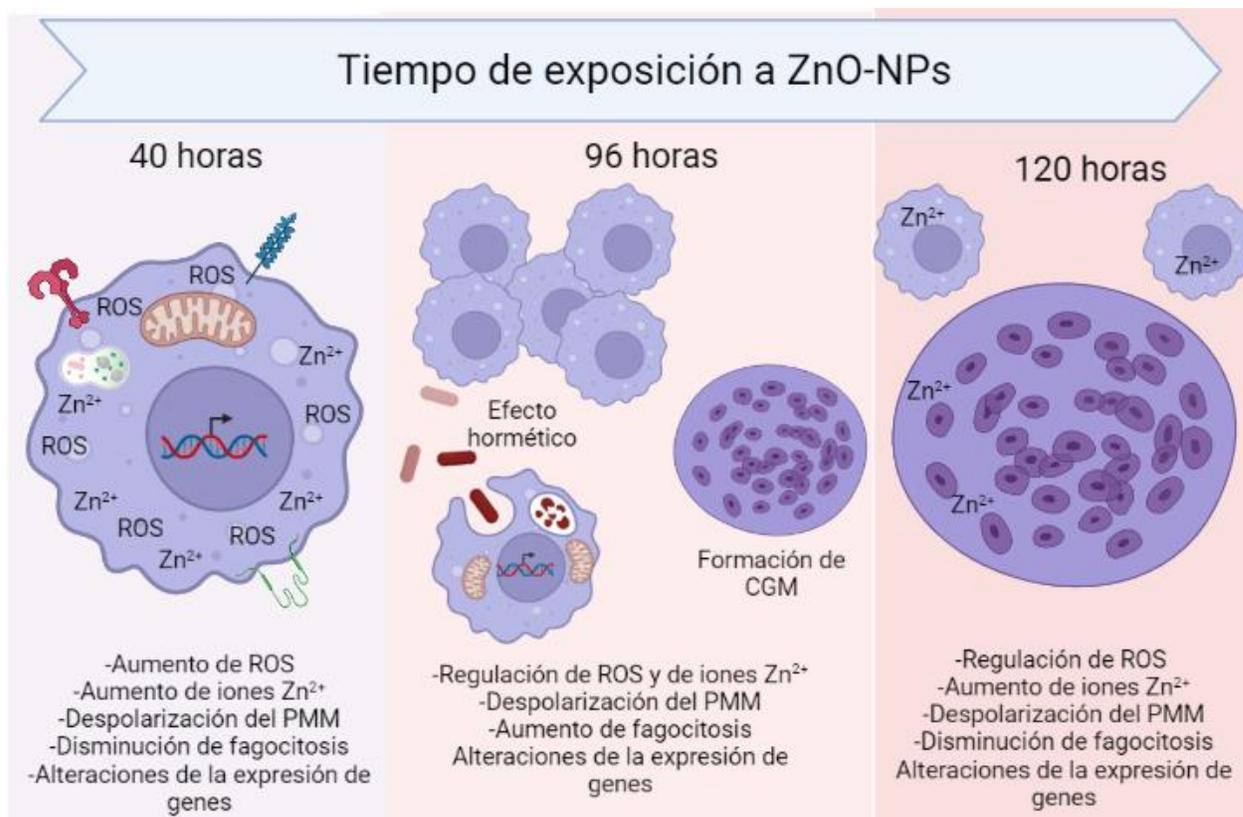
Interesantemente, Li *et al.*, 2021 reportaron un nuevo subconjunto de macrófagos reparadores de tejidos que expresan M-CSF, IL-6 y TGF $\beta$  en lesión cerebral traumática. Macrófagos expuestos durante 96 horas a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs expresaron niveles elevados de IL-6 y TGF $\beta$ , por lo que el tratamiento con las ZnO-NPs podría inducir el fenotipo previamente mencionado y actuar como antiinflamatorios.

La iniciación de la inflamación se encuentra finamente regulada para eliminar agentes infecciosos; a su vez, también debe suprimir activación inmune que podría causar daño. Sin embargo, las poblaciones celulares que responden a las señales proinflamatorias suelen ser heterogéneas, en donde se presentan subpoblaciones con alta y baja activación. Muldoon *et al.*, 2019 demostraron partición fenotípica bimodal de macrófagos que se preparan durante el estado de reposo de manera dependiente de la densidad celular, con un efecto no lineal sobre la producción colectiva del factor de necrosis tumoral (TNF), con la finalidad de amplificar respuestas locales frente a amenazas y prevenir falsas alarmas. Este mecanismo novedoso se denomina *quorum licensing*, y consiste en un sistema de comunicación celular con el objetivo de tomar decisiones conjuntas, que, de manera general se encuentran mediadas por productos secretados al medio, cuya concentración determina la orquestación de una respuesta específica y conjunta.

Debido a los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la formación de células gigantes multinucleadas y los niveles considerablemente incrementados de TNF $\alpha$  en macrófagos expuestos durante 96 horas a las ZnO-NPs sin aparente fenotipo proinflamatorio, la formación de células gigantes multinucleadas podría ser el resultado del *quorum licensing* de manera dependiente de la densidad celular, ya que macrófagos sin tratamiento también presentaron CGM a las 120 horas de cultivo, lo cual, a su vez, explicaría la disminución en la diferencia de expresión de TNF $\alpha$  de macrófagos tratados con ZnO-NPs con respecto al control, ya que macrófagos sin tratamiento también incrementarían sus niveles de TNF $\alpha$ . En este caso, TNF podría fungir como molécula señalizadora; sin embargo, se requieren análisis específicos que permitan proponer un mecanismo a través del cual el *quorum licensing* podría estar involucrado en la señalización que desencadena la formación de CGM.

Los resultados indican que las respuestas celulares de macrófagos debido a la exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs son sumamente variadas a través del tiempo y no se relacionan de manera clara y precisa con algún fenotipo en específico; sin embargo, es evidente que alteran las funciones inmunológicas y la tolerancia a las ZnO-NPs debido probablemente a la inducción del proceso adaptativo conocido como hormesis. Por último, en la tabla 6 se resumen las respuestas celulares observadas en el presente estudio por la exposición a las ZnO-NPs durante 40, 96 y 120 horas y se representan a manera de resumen gráfico en la figura 45.

Tabla 7. Resumen de los efectos y respuestas celulares de macrófagos RAW264.7 expuestos subcrónicamente a ZnO-NPs			
Concentración de ZnO-NPs	Tiempo de exposición		
	40 horas	96 horas	120 horas
2 µg/ml			
Viabilidad	-Viabilidad similar a macrófagos sin tratamiento	↑ Incremento en la viabilidad (hormesis)	-Viabilidad similar a macrófagos sin tratamiento
Morfología	↑ Ligero incremento de tamaño y complejidad relativa celular (48 horas)	↑ Aumento de tamaño -Complejidad interna similar a macrófagos sin tratamiento	-Formación de células gigantes multinucleadas Disminución de tamaño y complejidad relativa celular ↓
Función	↑ Incremento en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento (48 horas) Disminución de capacidad fagocítica (48 horas) Despolarización de la membrana mitocondrial ↓	-Regulación en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento ↑ Aumento de la capacidad fagocítica (alrededor de 7 veces más) Despolarización de la membrana mitocondrial ↓	-Regulación en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento Disminución de la capacidad fagocítica ↓ Despolarización de la membrana mitocondrial ↓ ↑ Aumento en los niveles de iones metálicos
Efecto de iones	-Viabilidad similar a macrófagos sin tratamiento ↑ Ligero incremento en los niveles de ROS ↑ Aumento en los niveles de iones metálicos	Disminución de la viabilidad (efecto tóxico) ↓ -Niveles de ROS similares a macrófagos sin tratamientos Ligera disminución en los niveles de iones metálicos ↓	
Expresión de genes	Disminución de la expresión relativa de TNFα y TGFβ ↓	↑ Aumento de la expresión relativa de TNFα y TGFβ Disminución de IL-10	↑ Aumento de la expresión relativa de TNFα e IL-10
3 µg/ml			
Viabilidad	-Viabilidad similar a macrófagos sin tratamiento	↑ Incremento en la viabilidad (hormesis)	Disminución en la viabilidad ↓
Morfología	↑ Ligero incremento de tamaño y complejidad relativa celular (48 horas)	-Formación de células gigantes multinucleadas ↑ Aumento de tamaño -Complejidad interna similar a macrófagos sin tratamiento	-Formación de células gigantes multinucleadas Disminución de tamaño y complejidad relativa celular ↓
Función	↑ Incremento en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento Disminución de capacidad fagocítica (48 horas) Despolarización de la membrana mitocondrial ↓	↑ Incremento en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento ↑ Aumento de la capacidad fagocítica (alrededor de 7 veces más) -Potencial de membrana mitocondrial normal	-Regulación en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento -Capacidad fagocítica similar a macrófagos sin tratamiento Despolarización de la membrana mitocondrial ↓ ↑ Aumento considerable en los niveles intracelulares de iones metálicos
Efecto de iones	-Viabilidad similar a macrófagos sin tratamiento -Niveles de ROS similares a macrófagos sin tratamiento ↑ Aumento en los niveles de iones metálicos	Disminución de la viabilidad (efecto tóxico) ↓ -Incremento en los niveles de ROS -Niveles de iones metálicos similares a macrófagos sin tratamiento	
Expresión de genes	↑ Aumento de la expresión relativa de TNFα, TGFβ e IL-10	↑ Aumento de la expresión relativa de IL-6, TNFα y TGFβ -Disminución en la expresión relativa de IL-10 ↓	↑ Aumento de la expresión relativa de iNOS
4 µg/ml			
Viabilidad	-Viabilidad similar a macrófagos sin tratamiento	↑ Incremento en la viabilidad (hormesis)	-Viabilidad similar a macrófagos sin tratamiento
Morfología	-Aparente formación de granulocitos ↑ Ligero incremento de tamaño y complejidad relativa celular (48 horas)	-Formación de células gigantes multinucleadas ↑ Aumento de tamaño -Complejidad interna similar a macrófagos sin tratamiento	-Formación de células gigantes multinucleadas Disminución de tamaño y complejidad relativa celular ↓
Función	↑ Incremento en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento -Capacidad fagocítica similar a macrófagos sin tratamiento Despolarización de la membrana mitocondrial ↓	↑ Incremento en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento -Capacidad fagocítica similar a macrófagos sin tratamiento Despolarización de la membrana mitocondrial ↓	-Regulación en los niveles de ROS -Niveles de NOS similares a macrófagos sin tratamiento Ligera disminución de la capacidad fagocítica ↓ -Potencial de membrana mitocondrial normal ↑ Aumento en los niveles intracelulares de iones metálicos
Efecto de iones	Ligera disminución en la viabilidad ↓ -Niveles de ROS similares a macrófagos sin tratamiento ↑ Aumento en los niveles de iones metálicos	Disminución de la viabilidad (efecto tóxico) ↓ ↑ Incremento en los niveles de ROS -Niveles de iones metálicos similares a macrófagos sin tratamiento	↑ Aumento en los niveles de iones metálicos
Expresión de genes	Disminución de la expresión relativa de TNFα y TGFβ ↓	↑ Aumento de la expresión relativa de TNFα, iNOS y TGFβ	No hay diferencias significativas



**Figura 45.** Respuestas celulares de macrófagos RAW264.7 expuestos subcrónicamente a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs. PMM=Potencial de membrana mitocondrial; CGM=Células gigantes multinucleadas. Figura elaborada por Gutiérrez-Araujo en Biorender.com

## Capítulo 5. Conclusión

---

- El método de dispersión influye en las características fisicoquímicas como tamaño, banda de absorción y potencial zeta de ZnO-NPs y CuO-NPs.
- La exposición aguda a ZnO-NPs y CuO-NPs a concentraciones subtóxicas induce un efecto hormético relacionado con los niveles de ROS en macrófagos RAW264.7 que es dependiente de las características fisicoquímicas de las nanopartículas, la concentración de las mismas y el tiempo.
- La exposición subcrónica a bajas concentraciones de CuO-NPs en macrófagos es citotóxica y potencialmente inmunotóxica y dependiente del tiempo y la concentración.
- La exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs causa cambios morfológicos en los macrófagos, y da lugar a la formación de células gigantes multinucleadas de manera dependiente de la concentración de ZnO-NPs y el tiempo.
- La exposición subcrónica a ZnO-NPs causa alteraciones en el tamaño, la complejidad interna celular, capacidad fagocítica y potencial de membrana mitocondrial en macrófagos RAW264.7 y las respuestas celulares suscitadas por macrófagos expuestos son dependientes tanto de las nanopartículas de ZnO como de los iones  $Zn^{2+}$  liberados.
- Los niveles de iones metálicos intracelulares  $Zn^{2+}$  se alteran por la exposición subcrónica a ZnO-NPs.
- La exposición subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs causa cambios en la expresión relativa de los genes proinflamatorios IL-6,  $TNF\alpha$  e iNOS, y los genes antiinflamatorios IL-10 y  $TGF\beta$ ; sin embargo, no se presenta relación alguna con la polarización de macrófagos hacia un fenotipo específico.

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

- Identificar el tipo de muerte celular implicado en el efecto inmunotóxico de las CuO-NPs.
- Cuantificar los iones  $Zn^{2+}$  en macrófagos expuestos durante 40, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs para determinar si las respuestas celulares se deben a un aumento en los niveles de iones  $Zn^{2+}$  en el medio intracelular o extracelular, y si son capaces de volver a la homeostasis de  $Zn^{2+}$ .
- Evaluar cambios en el tamaño y complejidad relativa celular en macrófagos expuestos durante 96 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs en presencia de distintos inhibidores de rutas de endocitosis para identificar la ruta de internalización de ZnO-NPs.
- Analizar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) macrófagos expuestos durante 40, 96 y 120 horas a 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs para observar si hay internalización de ZnO-NPs, y, en caso de ser así, proponer un mecanismo.
- Realizar un análisis transcriptómico y proteómico exhaustivo que permita elucidar de manera más precisa las respuestas celulares observadas en macrófagos expuestos subcrónicamente a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs.
- Realizar un análisis metabolómico del medio de cultivo de macrófagos que presenten formación de células gigantes multinucleadas con la finalidad de identificar una molécula señal que podría ser la responsable del "*quorum licensing*".
- Llevar a cabo un análisis multi-ómico que permita proponer mecanismos y rutas de señalización de las respuestas celulares observadas en macrófagos expuestos subcrónicamente a concentraciones subtóxicas a ZnO-NPs.
- Agregar un agente antioxidante en los ensayos de exposición a ZnO-NPs para medir niveles de ROS y viabilidad, así como para afirmar si la hormesis depende del aumento de ROS.
- Evaluar si las células gigantes multinucleadas poseen funciones inflamatorias.

- Exponer macrófagos durante 120 horas a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs (2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnO-NPs) seguido de concentraciones tóxicas y viceversa, para corroborar el aumento en la tolerancia debido a la hormesis.
- Exponer macrófagos de manera subcrónica a concentraciones subtóxicas de ZnO-NPs previamente activados con LPS e IL-4 para observar si hay un incremento en las capacidades inflamatorias y antiinflamatorias de macrófagos o polarización de fenotipo.
- Evaluar las respuestas celulares de macrófagos en un modelo *in vivo* de ratón expuesto mediante vía inhalatoria a ZnO-NPs.

## Literatura citada

---

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. (Eds). 2015. Cellular and Molecular Immunology. Octava edición, Elsevier Inc, España.
- Aggarwal, P., Hall, J., McLeland, C., Dobrovolskaia, M., McNeil, S. 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61(6):428-437.
- Aquino-Granados, P. 2016. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de zinc obtenidas por el método de precipitación para su aplicación en pintura esmalte comercial. Tesis de Maestría. pp.93.
- Arancibia, S., Barrientos, A., Torrejón, J., Escobar, A., Beltrán, C. 2015. Copper oxide nanoparticles recruit macrophages and modulate nitric oxide, proinflammatory cytokines and PGE2 production through arginase activation. *Nanomedicine (Lond)*, 11(10):1237-51.
- ATCC, 2020. <https://www.atcc.org/Products/All/TIB-71.aspx#generalinformation>.
- Aude-Garcia, C., Dalzon, B., Ravanat, J., Collin-Faure, V., Diemer, H., Strub, J., Cianferani, S., Dorsselaer A., Carrière, M., Rabilloud, T. 2015. A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages. *Journal of Proteomics*.134: 174-185.
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M., Alkawareek, M., Dreaden, E., Brown, D., Aiklany, A., Farokhzad, O., Mahmoudi, M. 2017. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*. 46(14):4113-4376.
- Berra, D., Salah, L., Boubaker, B., Mohammed, O., Berrani, D., Achour, R. 2018. Green synthesis of copper oxide nanoparticles by Phoenix dactylifera leaves extract. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 13(4):1231-1238.
- Berridge, M. V., Tan, A. S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 303(2):474-478.
- Booner, J. C., Brown, J. M. (Eds). 2020. Interaction of Nanomaterials with the Immune System. Springer Nature, Switzerland.
- Bucchianico, S., Fabbri, M., Misra, S., Valsami-Jones, E., Berhanu, D., Bergamaschi, E., Migliore, L. 2013. Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. *Mutagenesis*. 28(3):287-299.
- Buzea, C., Pacheco, I., Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2(4):MR17-MR71.

- Calabrese, E. 2016. Preconditioning is hormesis part II: How the conditioning dose mediates protection: Dose optimization within temporal and mechanistic frameworks. *Pharmacological Research*. 110, 265-275.
- Calabrese, E., Mattson, M. 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *Aging and Mechanisms of Disease*. 3(13):1-8.
- Canton, J., Neculai, D., Grinstein, S. 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(9):621-34.
- Chang, H., Ho, C., Yang, C., Chang, W., Tsai, M., Tsai, H., Lin, P. 2013. Involvement of MyD88 in zinc oxide nanoparticle-induced lung inflammation. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65(6):887-896.
- Chia-Der, L., Yu Yi, K., Chin-Yu, L., Ching-Hao, L., Shiao-Ping, H., Yu-Wen, C., Wei-Chih L., Hao-Xiang, C., Pei-Ling W., Jaw-Jou, K., Chen-Chen, L., Chih-Ho, L. 2014. Zinc oxide nanoparticles impair bacterial clearance by macrophages. *Nanomedicine*. 9(9):1327-1339.
- Chirinos, J. 2016. Implementación del método por titulación en el análisis de zinc metálico con ferrocianuro de potasio y comparación con el método tradicional con EDTA. Tesis de Maestría. Universidad Mayor de San Andrés, 49 pp.
- Doherty, G., McMahon, H. 2009. Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*. 78:857-902.
- Dolez, P. I. (Ed). 2015. *Nanomaterials definitions, classifications, and applications in Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues*. Elsevier, Amsterdam. pp. 3-40.
- Du, J., Wagner, B. A., Buettner, G. R., Cullen, J. J. 2016. The Role of Labile Iron in the Toxicity of Pharmacological Ascorbate. *Free Radical Biology & Medicine*. 84:289-295.
- EC (European Commission). 2011. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official Journal European Union L*. 275:38e40.
- Farokhzad, O. C., y Langer, R. 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 3: 16-20.
- FDA (Food and Drug Administration). 1999. *Immunotoxicity Testing Guidance*. United States.
- Feltis, B., Okeefe, S., Harford, A., Piva, T., Turney, T., Wright, P. 2012. Independent cytotoxic and inflammatory responses to zinc oxide nanoparticles in human monocytes and macrophages. *Nanotoxicology*. 6(7):757-765.
- Fischer, H. C. y Chan, W. C. N. 2007. Nanotoxicity: The growing need for in vivo study. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(6), 565–571.
- Foladori, G., Arteaga, E., Záyago, E., Appelbaum, R., Robles, E., Villa, L., Parker, R., y Leos, V. 2017. La política pública de nanotecnología en México. *Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad*. 34(12).

- Fujihara, J., Tongu, M., Hashimoto, H., Yamada, K., Kimura-Kataoka, K., Yasuda, T., Fujita, Y., Takeshita, H. 2015. Distribution and toxicity evaluation of ZnO dispersion nanoparticles in single intravenously exposed mice. *The Journal of Medical Investigation*. 62: 45-50.
- Fukada, T., Kambe, T. 2011. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics*. 3:662-674.
- Giannuzzi, L. (Ed). *Toxicología general y aplicada*. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- Gosens, I., Cassee, F., Zanella, M., Manodori, L., Brunelli, A., Costa, A., Bokkers, B., Jong, W., Brown, D., Hristozov, D., Stone V. 2016. Organ burden and pulmonary toxicity of nano-sized copper (II) oxide particles after short-term inhalation exposure. *Nanotoxicology*. 10(8):1084-1095.
- Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*. 3(1):23-35.
- Gordon, S. 2016. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*. 44:463-475.
- Gustafson, H., Holt-Casper, D., Grainger, D., Ghandehari, H. 2015. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today* 10(4):487-510.
- Gutiérrez-Araujo, M., Duhalt, V., Juárez, K. 2021. Respuestas celulares de macrófagos a nanopartículas de óxidos metálicos. *Mundo Nano* 14(27):1e-16e.
- Hamilton, J. 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*. 8(7):533-544.
- Helming, L., Gordon, S. 2009. Molecular mediators of macrophage fusion. *Cell Press* 19(10): 514-522.
- Hensley, K., Shenyun, M., Quentin, N. P. 2003. Nitrite Determination by Colorimetric and Fluorometric Griess Diazotization Assays. *Method in Biological Oxidative Stress*. 185-193.
- Holan, V., Javorkova, E., Vrbova, K., Vecera, Z., Mikuska, P., Coufalik, P., Kulich, P., Skoupy R., Machala, M., Zajicova A., Rossner, P. 2019. A murine model of the effects of inhaled CuO nanoparticles on cells of innate and adaptive immunity – a kinetic study of a continuous three-month exposure. *Nanotoxicology*, 13(7):1-12.
- Hussain, M (Ed). 2018. *Handbook of nanomaterials for industrial applications*, Primera edición, Elsevier Inc, Amsterdam.
- Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., Calabrese, E. 2018. Nanoparticle Exposure and Hormetic Dose-Responses: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 805:1-23.
- INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo). 2015. *Seguridad y Salud en el trabajo con Nanomateriales*. Ministerio de empleo y seguridad social. Madrid, España.

- Ilves, M., Palomaki, J., Vippola, M., Lehto, M., Savolainen, K., Savinko, T., Alenius, H. 2014. Topically applied ZnO nanoparticles suppress allergen induced skin inflammation but induce vigorous IgE production in the atopic dermatitis mouse model. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(38):1-12.
- Inshakova, E., Inshakov, O. 2017. World market for nanomaterials: structure and trends. *International Conference on Modern Trends in Manufacturing Technologies and Equipment*. 129, 02013.
- Itoh, N., Shibayama, H., Kanekiyo, M., Namphung, D., Nakanishi, T., Matsuyama, A., Odani, T., Tanaka, K. 2005. Reduced bactericidal activity and nitric oxide production in metallothionein-deficient macrophages in response to lipopolysaccharide stimulation. *Toxicology*. 216:188-196.
- Karlsson, H., 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*. 21:1726-1732.
- Keshavarzi, M., Khodaei, F., Siavashpour, A, Arastoo, S., Afshin, M. 2019. Hormesis Effects of Nano- and Microsized Copper Oxide. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 18(4):2042-2054.
- Kim, J., Adamcakova-Dodd, A., O'Shaughnessy, P., Grassian, V., Thorne, P. 2011. Effects of copper nanoparticle exposure on host defense in a murine pulmonary infection model. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(29):1-14.
- Kim, M., Jeong, H. 2015. Zinc Oxide Nanoparticles Suppress LPS-Induced NF-Kb Activation by Inducing A20, a Negative Regulator of NFkB, in RAW264.7 Macrophages. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 15(9):6509-6515.
- Kubackova, J., Zbytovska, J., Holas, O. 2019. Nanomaterials for direct and indirect immunomodulation: A review of applications. *European Journal Pharmaceutical Sciences*. 15(142): 105139.
- Kumar, V., Dasgupta, N., Ranjan, S. (Eds). 2018. *Nanotoxicology: toxicity evaluation, risk assessment and management*. CRC Press Taylor y Francis Group.
- Kumar, H., Venkatesh, N., Bhowmik H., Kuila, A. 2018. Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. 4(2): 3765-3775.
- Le, Q., Yang, G., Wu, Y., Jang, H., Shokouhimehr, M., Oh, Y. 2019. Nanomaterials for modulating innate immune cells in cancer immunotherapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 14:16-29.
- Li, Z., Xiao, J., Xu, X., Li, W., Zhong, R., Qi, L., Chen, J., Cui, G., Wang, S., Zheng, Y., Qiu, Y., Li, S., Zhou, X., Lu, Y., Zhou, B., Zhou, J., Jing, N., Wei, B., Hu, J., Wang, H. 2021. M-CSF, IL-6 and TGFβ promote generation of a new subset of tissue repair macrophage for traumatic brain injury recovery. *Science Advances*. 7:eabbb6260.
- Líbalová, H., Costa, P., Olsson, M., Farcál, L., Ortelli, S., Blosi, M., Topinka, J., Costa, A., Fadeel, B. 2018. Toxicity of Surface-modified copper oxide nanoparticles in a mouse macrophages cell line: Interplay of particles, Surface coating and particle dissolution. *Chemosphere*. 196:482-493.

- Lim, J., Gleeson, P. 2011. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalizing large pulps. *Immunology and Cell Biology*. 89(8):836-843.
- Litchen, L., Ryu, M., Guo, L., Embury, J., Cousins, R. 2011. MTF-1 mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction. *Plos One*. 6:e21526.
- López-Diazguerrero, N., González, V., Hernández-Bautista, R., Alarcón-Aguilar, A., Luna-López, A., Konigsberg, M. 2013. Hormesis: lo que no mata, fortalece. *Gaceta Médica de México*. 149:438-447.
- Mayor, S., Pagano, R. 2007. Pathway of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8(8):603-612.
- McMahon, H., Boucrot, E. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 12(8):517-533.
- Milde, R., Ritter, J., Tennent, G., Loesch, A., Martínez, F., Gordon, S., Pepys, M., Verschoor, A., Helming, L. 2015. Multinucleated Giant Cells Are Specialized for Complement-Mediated Phagocytosis and Large Target Destruction. *Cell Reports*.13:1937-1948.
- Mo, J., Xie, Q., Wei, W., Zhao, J. 2018. Revealing the immune perturbation of black phosphorus nanomaterials to macrophages by understanding the protein corona. *Nature communications*. 9(2480): 1-11.
- Modolell, M., Corraliza, I., Link, F., Soler, G., Eichman, K. 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European Journal of Immunology*. 25(4):1101-1104.
- Moilanen, E., Vaapatalo, H. 1995. Nitric oxide in inflammation and Immune Response. *Annals of Medicine*. 27(3):359-367.
- Muldoon, J., Chuang, Y., Bagheri, N., Leonard, J. 2019. Macrophages employ quorum licensing to regulate collective activation. *Nature communications*. 11:878.
- Nagamune, T. 2017. Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. *Nano convergence*. 4(9) 1-56.
- Nascarella, M., Calabrese, E. 2012. A method to evaluate hormesis in nanoparticles dose-responses. *Dose-Response*. 10:344-354.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311:622–627.
- Parton, R., Richards, A. 2003. Lipid Rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanism. *Traffic*. 4:724-738.

- Perisé, B. 2013. Efecto del VIH-1 en la desregulación de los linfocitos B. Papel de dendrímeros carboxilano en la respuesta inflamatoria, como agentes transfectantes y en la polarización de macrófagos de tipo M2. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid, España pp. 177.
- Pickering A. M., Vojtovich, L., Tower, J., Davies, KJ. 2013. Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 55:109-118.
- Sruthi, S., Ashtami, J., Mohanan, P. 2018. Biomedical application and hidden toxicity of zinc oxide nanoparticles. *Materials Today Chemistry*. 10:175-186.
- Ramsden, J. J. (Ed). 2016. *Nanotechnology an Introduction*. Second Edition. Elsevier Inc, Cambridge, pp.358.
- Rajesh P. R., Shailendra P. S., Donat-P H., Rajeshwar, P. S. 2010. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 397(3):603-607.
- Rejman, J., Conese, M., Hoekstra, D. 2006. Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Journal of Liposome Research*. 16(3):237-247.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., Nilse, T. W. 2010. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*. 6:1-3.
- Roduner, E. 2006. Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*. 35:583e92.
- Roy, R., Parashar, V., Chauhan L., Shanker, S., Das, M., Tripathi, A., Dwivedi, P. 2013. Mechanism of uptake of ZnO nanoparticles and inflammatory responses in macrophages require PI3K mediated MAPKs signaling. *Toxicology in Vitro*. 28:457-467.
- Roy, R., Kumar, D., Sharma, A., Gupta, P., Chaudhari, B., Tripathi, A., Das, M., Dwivedi, P. 2014. ZnO nanoparticles induced adjuvant effect via toll-like receptors and Src signaling in Balb/c mice. *Toxicology Letters*. 230:421-433.
- Roy, R., Singh, S., Chauhan, L., Das, M., Tripathi, A., Dwivedi, P. 2014. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition. *Toxicology Letters*. 227(1):29-40.
- Roy, R., Singh, S., Das, M., Tripathi, A., Dwivedi, P. 2014. Toll-like receptor 6 mediated inflammatory and functional responses of zinc oxide nanoparticles primed macrophages. *Immunology*. 142:453-464.
- Safawo, T., Sandeep, BV.,Pola, S., Tadesse, A. 2018. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using tuber extract of anchote (*Coccinia abyssinica* (Lam) Cong.) for antimicrobial and antioxidant activity assessment. *OpenNano*. 3:56-63.
- Segura, J., Jiménez, A., Llamas, R., Jiménez A. 1997. El ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) y su uso en endodoncia. *Endodoncia*. 15(2):90-97.

- Senapati, V., Kumar, A. 2018. ZnO nanoparticles dissolution, penetration and toxicity in human epidermal cells. Influence of pH. *Environmental Chemistry Letters*. 16(3):1129-1135.
- Sengul, A., Asmatulu, E. 2020. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 18, 1659-1683.
- Serda, R., Mack, A., van de Ven, A., Ferrati, S., Dunner, K., Godin, B., Chiappini, C., Landry, M., Brousseau, L., Liu, X., Bean, A., Ferrari, M. 2010. Logic-Embedded Vectors for Intracellular Partitioning, Endosomal Escape, and Exocytosis of Nanoparticles. *Nano Micro Small*. 6:2691-2700.
- Shafagh, M., Rahmani, F., Delirez, N. 2015. CuO nanoparticles induce cytotoxicity and apoptosis in human K562 cancer cell line via mitochondrial pathway, through reactive oxygen species and P53. *Iran Journal Medical Sciences*, 18(10):993-1000.
- Song, M., Liu, T., Shi, C., Zhang, X., Chen, X. 2016. Bioconjugated Manganese Dioxide Nanoparticles Enhance Chemotherapy Response by Priming Tumour-Associated Macrophages toward M1-like Phenotype and Attenuating Tumor Hypoxia. *ACS Nano* 10(3):633-647.
- Sousa, C., Pereira, M., Almeida, R., Loyola, A., Silva, A., Dantas, N. 2013 Synthesis and characterization of zinc oxide nanocrystals and histologic evaluation of their biocompatibility by means of intraosseous implants. *International Endodontic Journal*. 47(5):416-424.
- Stafford, S., Bokil, N., Achard, M., Kapetanovic, R., Schembri, M., McEwan, A., Sweet, M. 2013. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience Reports*. 33:541-554.
- Timblin, G., Tharp, K., Ford, B., Winchenster, J., Wang, J., Zhu, S., Khan, R., Louie, S., Iavarone, A., Hoeve, J., Nomura, D., Stahl, A., Saijo, K. 2021. Mitohormesis reprogrammes macrophage metabolism to enforce tolerance. *Nature Metabolism*. 3:618-635.
- Triboulet, S., Aude-García, C., Armand, L., Gerdil, A., Diemer, H., Proamer, F., Collin-Faure, V., Habert, A., Strub, J., Hanau, D., Herlin, N., Carrière, M., Dorsselaer, A., Rabilloud, T. 2014. Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach. *Nanoscale*. 6:6102-6114.
- Tuomela, S., Autio, R., Thurnherr, T., Arslan, O., Kunzmann, A., Andersson-Willman, B., Wick, P., Mathur, S., Scheynius, A., Krug, H., Fadeel, B., Lahesmaa, R. 2013. Gene Expression Profiling of Immune-Competent Human Cells Exposed to Engineered Zinc Oxide or Titanium Dioxide Nanoparticles. *PLOS ONE*. 8(7): e68415.
- Vandebriel, R., De Jong, W. 2012. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnology, science and applications*. 5:61-71.
- Villanueva-Flores, F., Castro-Luego, A., Ramirez, O., Palomares, L. 2020. Understanding cellular interactions with nanomaterials: towards a rational of medical nanodevices. *Nanotechnology*. 31:132002 19 pp.

- Wang, B., Zhang, Y., Mao, Z., Yu, D., Gao, C. 2014. Toxicity of ZnO Nanoparticles to Macrophages Due to Cell Uptake and Intracellular Release of Zinc Ions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 14:5688-5696.
- Wang, C., Zhang, R., Wei, X., Lv, M., Jiang, Z. 2020. Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity. *Advances in immunology*. 145:187-240.
- Wilhelmi, V., Fischer, U., van Berlo, D., Schulze-osthoff, K., Schins R., Albrecht., C. 2011. Evaluation of apoptosis induced by nanoparticles and fine particles in RAW 264.7 macrophages: Facts and artefacts. *Toxicology in Vitro*. 26:323-334.
- Wolfram, J., Yang, Y., Shen, J., Moten, A., Chen, C., Shen, H., Ferrari, M., Zhao, Y. 2015. The nano-plasma interface: implications of the protein corona. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 0:17-24.
- Yazhiniprabha, M., Vaseeharan, B., Sonawane, A., Behera, A. 2019. *In vitro* and *In vivo* toxicity assessment of phytofabricated ZnO nanoparticles showing bacteriostatic effect and larvicidal effect against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Photochemistry & Photobiology*. 192:158-169.
- Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L., Daldrup-Link, H. 2016. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology*. 11(11):986-994.
- Zhang, J., Song, W., Guo, J., Zhang, J., Sun, Z., Ding, F., Gao, M. 2012. Toxic effect of different ZnO particles on mouse alveolar macrophages. *Journal of Hazardous Materials*. 219-220:148-155.
- Zhang C., Liu, Z., Zhang, Y., Ma, L., Song, E., Song, Y. 2020. "Iron free" zinc oxide nanoparticles with ion-leaking properties disrupt intracellular ROS and iron homeostasis to induce ferroptosis. *Cell Death & Disease* 11:183.

## Anexos

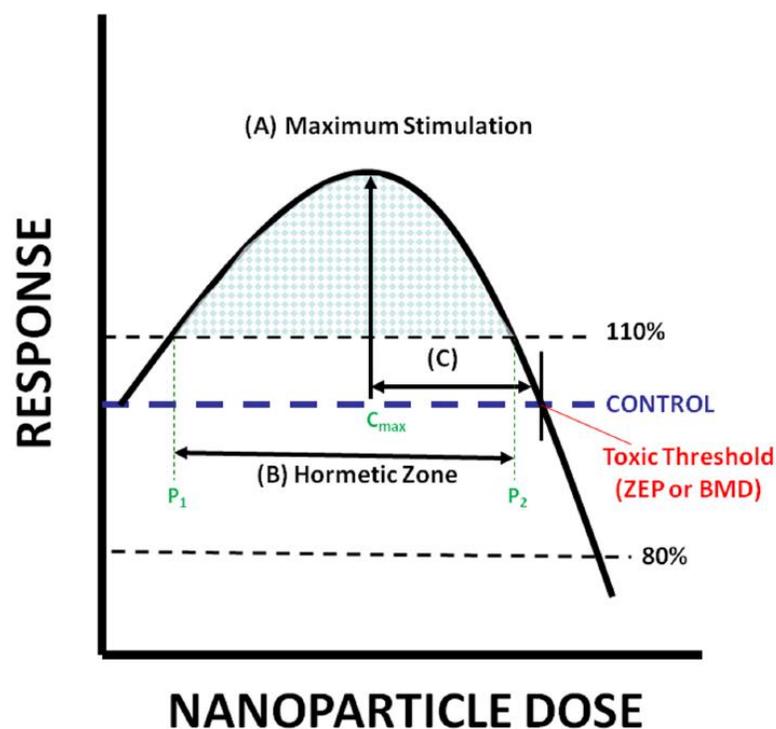


Figura 46. Modelo de hormesis en respuesta a dosis de nanopartículas de Nascarella *et al.*, 2009

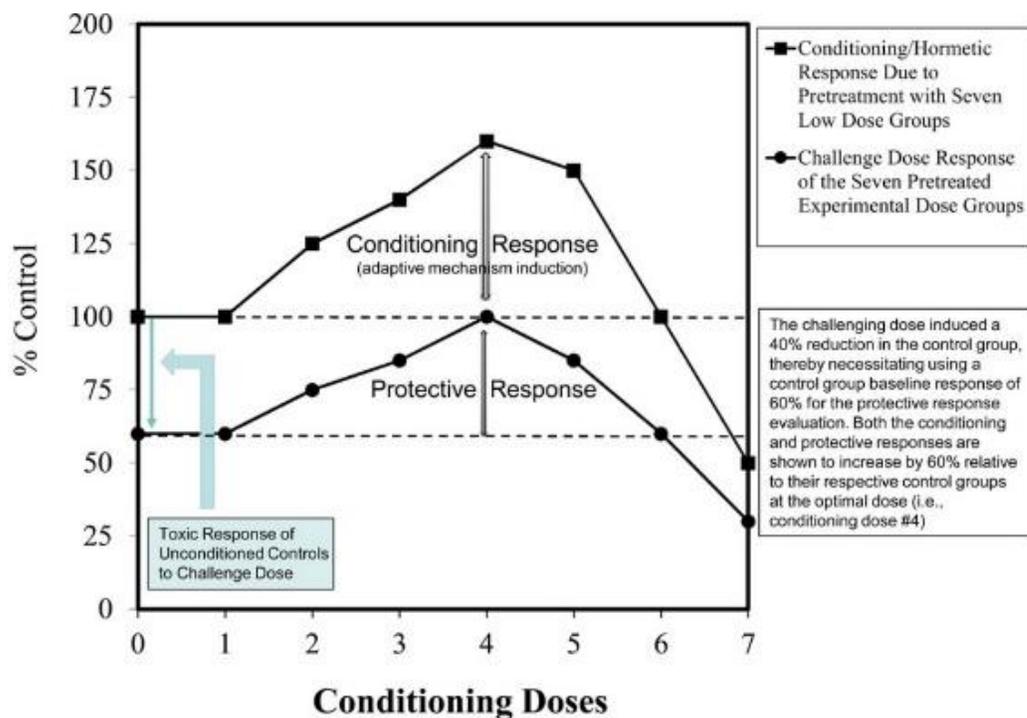


Figura 47. Modelo de preconditionamiento en respuesta a un agente tóxico de Calabrese, 2016.

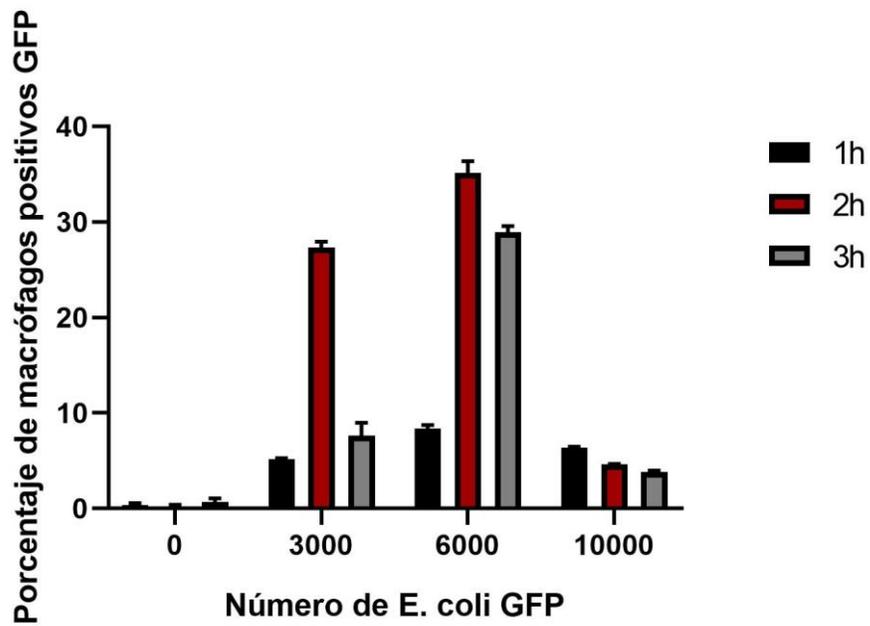
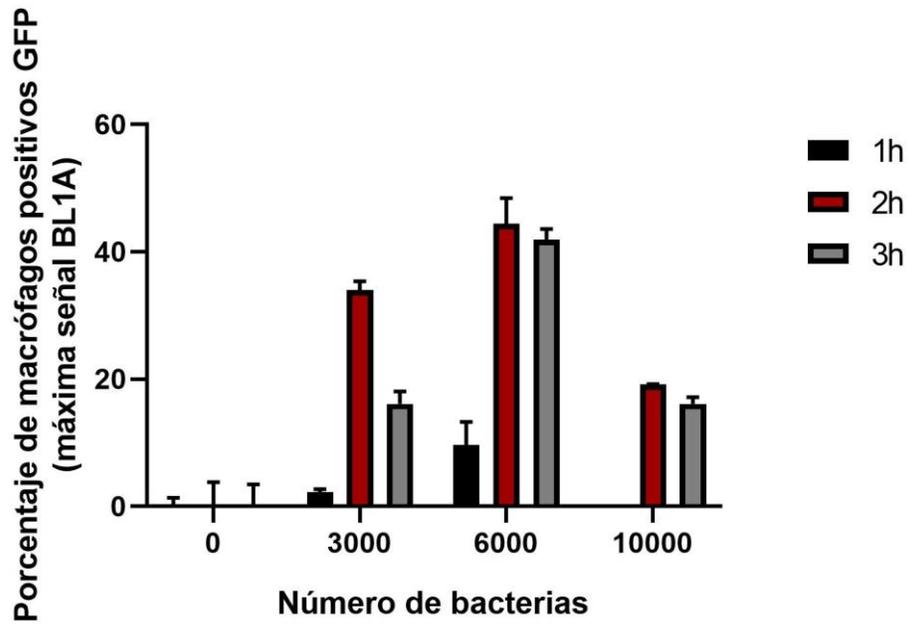


Figura 48. Estandarización del ensayo de fagocitosis.