

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Comparación del efecto citotóxico de nanopartículas de óxido
de zinc y óxido de cobre en células del sistema excretor**

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

Presenta:

Elizabeth Mavil Guerrero

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Elizabeth Mavil Guerrero
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Directora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dr. Marco Antonio de León Nava



Dr. José Manuel Romo Herrera
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen del anteproyecto que presenta **Elizabeth Mavil Guerrero** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Comparación de los efectos citotóxicos de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre sobre células del sistema excretor

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Directora de tesis

En los últimos años los nanomateriales se han empleado con el fin de mejorar productos alimentarios, cosméticos, biomédicos y ambientales. Una de las variantes más utilizadas son las nanopartículas (NPs) de óxidos metálicos como óxido de zinc (ZnO) y el óxido de cobre (CuO). Mediante diferentes vías de exposición las NPs de ZnO y CuO pueden llegar al sistema circulatorio de los mamíferos para ser absorbidas y distribuidas por todo el organismo, para que en un momento dado el riñón y el hígado las eliminen a través de distintos fluidos. Sin embargo, el mecanismo por el cual las NPsZnO y NPsCuO desencadenan la muerte de las células de riñón e hígado no han sido del todo descrito, ya que depende de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas y el origen de las células expuestas. Por tal motivo, en esta investigación se compararon los efectos de diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO por 24 horas, en la viabilidad, morfología, potencial de la membrana mitocondrial y estadios del ciclo celular de líneas celulares epiteliales del sistema excretor por medio de diferentes ensayos in vitro, técnicas de espectroscopia UV-Vis, dispersión dinámica de luz, citometría de flujo, microscopía confocal, microscopía electrónica de transmisión y fluorimetría. Los datos obtenidos de los ensayos in vitro demuestran que las NPsZnO y NPsCuO reducen la viabilidad de las células de riñón MDCK y AML-12 de hígado e inducen cambios en la morfología. El tipo de muerte inducido en las células AML-12 por las NPsZnO y NPsCuO es por apoptosis temprana, sin embargo, las NPsCuO inducen muerte dependiente de autofagia en las células de riñón MDCK. Las NPsZnO y NPsCuO inducen estrés oxidante, despolarización de la membrana mitocondrial y arresto en los estadios del ciclo celular en ambas líneas celulares. Además, los iones Zn^{2+} participan en la reducción de la viabilidad de las células MDCK y AML-12 y los iones Cu^{2+} reducen la viabilidad de las células MDCK, en cambio, las NPsCuO logran internalizar a las células AML-12 y reducir su viabilidad. Estos resultados sugieren que ciertas concentraciones de las NPs metálicas pueden afectar la fisiología de células y tejidos del sistema excretor de varios mamíferos, incluidos los seres humanos. Las NPsCuO resultaron ser más tóxicas en ambas líneas celulares; y las células de hígado AML-12 las más susceptibles con una exposición de 24 horas a los dos tipos de nanopartículas.

Palabras clave: nanopartículas de óxidos metálicos, sistema excretor, nanotoxicología

Abstract of the thesis presented by **Elizabeth Mavil Guerrero** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience

Comparison of the cytotoxic effects of zinc oxide and copper oxide nanoparticles on cells of the excretory system

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Thesis Director

In recent years, nanomaterials have improved food, cosmetic, biomedical, and environmental products. One of the most used variants is the nanoparticles (NPs) of metal oxides such as zinc oxide (ZnO) and copper oxide (CuO). Through different routes of exposure, the ZnO and CuO NPs can reach the circulatory system to be absorbed and distributed throughout the body. The kidney and liver eliminate them at a given moment through different fluids. However, the mechanism by which ZnONPs and CuONPs trigger kidney and liver cell death have not been fully described since it depends on the physicochemical properties of the nanoparticles and the origin of the exposed cells. Thus, in this work the effects of different concentrations of ZnONPs and CuONPs on viability, morphology, mitochondrial membrane potential and cell cycle stages of epithelial cells of the excretory system were compared through various *in vitro* assays and using UV-Vis spectroscopy techniques, dynamic light scattering, flow cytometry, confocal microscopy, transmission electron microscopy, and fluorimetry. Data obtained from *in vitro* assays demonstrate that ZnONPs and CuONPs reduce the viability of MDCK kidney and liver AML-12 cells and induce changes in morphology. The type of death caused in AML-12 cells by ZnONPs and CuONPs is early apoptosis; however, CuONPs induces autophagy-dependent death in MDCK kidney cells. ZnONPs and CuONPs induce oxidative stress, depolarization of the mitochondrial membrane, and arrest in the cell cycle stages in both cell lines. In addition, Zn²⁺ ions reduce the viability of MDCK and AML-12 cells, and Cu²⁺ ions lessen the viability of MDCK cells, while CuONPs manages to internalize AML-12 cells and reduce its viability. These results suggest that specific concentrations of metal NPs can affect the physiology of cells and tissues of the excretory system of various mammals, including humans. CuONPs were more toxic in both cell lines, and AML-12 liver cells were the most susceptible with a 24-hour exposure to the two types of nanoparticles.

Palabras clave: metal oxide nanoparticles, excretory system, nanotoxicology

Dedicatorias

“La ciencia, el saber, la inteligencia y la capacidad en toda clase de trabajo, es un regalo de Dios hagamos de estos un bien común para todos”

Para Él, quién me hace ser, me regala amor, sabiduría y entendimiento; mi Dios.

A mí mami amada, el pilar de mi vida, por haberme forjado como la persona que soy y ser la bella rosa que siempre me acompaña.

A Leonardo por sumar felicidad a mis días e impulsarme alcanzar mis metas.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM) por brindarme sus instalaciones y recursos para poder llevar acabo esta investigación y por abrirme las puertas para poder cursar el posgrado de Ciencias en Nanociencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (CVU. 1057815) de posgrado que me brindó para poder dedicarme de tiempo completo a la realización de la maestría.

Al SINANOTOX y al Departamento de Bionanotecnología del CNyN-UNAM por el financiamiento e infraestructura para poder realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Diego Luis Delgado Álvarez del Laboratorio de Microscopía Avanzada (LNMA- CICESE), por ayudarme con la adquisición de las micrografías de microscopia confocal.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria y a la Dra. Gabriela Guzmán Navarro del LNMA-CICESE por la ayuda para procesar las muestras del TEM de las células. Y al Dr. Josué Mota Morales (CFATA-UNAM) por las micrografías del TEM de las NPs.

Este trabajo debe ser reconocido como una labor conjunta realizada con mi asesora de tesis la Dra. Karla O. Juárez Moreno, quién me guío en el desarrollo de esta investigación, me proporciono las herramientas necesarias para culminar esta investigación y me enseñó el mundo nano. Muchas gracias por la paciencia, tiempo, dedicación, cariño y motivación que me brindó desde antes de ingresar al posgrado y por creer en mí.

A mis sinodales, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su apoyo y las aportaciones que enriquecieron este trabajo de investigación. Y al Dr. Marco de León Nava, por las enseñanzas y recomendaciones para mejorar esta tesis.

A todos y todas quienes conforman NanotoxLab, en especial a Jesús, Salma y Daniela que de una u otra manera aportaron en ideas y motivación para culminar este trabajo. A Sashenka, Angi y Jorge de Bionano por darme su amistad y consejos. Y a Laura Rosales, por el apoyo administrativo que me brindo.

A la familia Navarro-Labastida y a Norma Richarte por regalarme un hogar en Ensenada.

A Jesús, Efraín, Manuel, Daniel, Erisneida, Yusseth y Karina, quienes me acompañaron a la distancia y me alentaron a culminar este trabajo.

A Leonardo y la Pukis, por regalarme compañía, amor y felicidad. Me hicieron la maestría más amena y en los días nublados me acobijaron.

A mí mami Elvia, por cultivar en mí la resiliencia y la superación constante. A mi hermano Víctor y mis hermanas Yaneli y Yareli, por motivarme alcanzar esta meta. A mi papá por preocuparse por mi seguridad y alentarme para alcanzar mis sueños.

A mí abuelita Juana Andrade y mi amigo Víctor Domínguez que al inicio de esta etapa se preocuparon por mí y anhelaban verme culminar este proyecto, sin embargo, ahora lo hacen al lado de Dios.

Tabla de Contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	xi
 Capítulo 1. Introducción	 1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Aplicaciones de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre	3
1.1.2 Mecanismo de excreción de las nanopartículas	5
1.1.3 Efectos nanotoxicológicos de las nanopartículas de óxido zinc y nanopartículas de óxido de cobre en células del sistema excretor	6
1.1.4 La regulación sanitaria de los nanomateriales en México.....	10
1.2 Hipótesis.....	11
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo general	12
1.3.2 Objetivos específicos	12
 Capítulo 2. Metodología.....	 13
2.1 Nanopartículas y caracterización fisicoquímica	13
2.1.1 Dispersión Dinámica de Luz	13
2.1.2 Microscopia electrónica de transmisión	13
2.2 Cultivo celular.....	14
2.2.1 Subcultivo de células	15
2.2.2 Recuento celular	15
2.3 Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT	15
2.3.1 Comparación de la viabilidad de las células del sistema excretor expuestas a NPs de ZnO y CuO con iones quelados y con sales de zinc y cobre	18
2.4 Cuantificación y detección del tipo de muerte celular por citometría de flujo	19
2.5 Internalización de las nanopartículas de ZnO y CuO en las células AML-12 y MDCK con una exposición aguda.....	23

2.5.1 Evaluación de la internalización de nanopartículas de ZnO y CuO en las células del sistema excretor por citometría de flujo.....	23
2.5.2 Identificación de la internalización de nanopartículas CuO en las células AML-12 por microscopia electrónica de transmisión	24
2.6 Medición de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas por fluorescencia	25
2.7 Estimación del potencial de la membrana mitocondrial de las células AML-12 y MDCK a las diferentes concentraciones de nanopartículas ZnO y CuO	27
2.8 Efecto de las diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO y CuO en el ciclo celular de las células AML-12 y MDCK	29
2. 9 Análisis estadístico	31
Capítulo 3. Resultados	32
3.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	32
3.2 Viabilidad de las células expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxidos metálicos.....	35
3.2.1 Viabilidad de las células del sistema excretor expuestas a NPs de ZnO y CuO con iones quelados y con sales de zinc y cobre	37
3.3 Efecto en la morfología de las células expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxidos metálicos.....	39
3.4 Tipo de muerte celular causado por la exposición aguda de células a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxidos metálicos.....	41
3.5 Medición de la generación de las especies reactivas de oxígeno en células de riñón expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido metálicos	47
3.6 Estimación de la internalización de las nanopartículas de óxidos metálicos en las células del sistema excretor	51
3.7 Potencial de la membrana mitocondrial de las células del sistema excretor expuestas a las diferentes concentraciones de nanopartículas ZnO y CuO	53
3.8 Ciclo celular y recultivo de las células MDCK y AML-12 expuestas de forma aguda a las nanopartículas de óxidos metálicos	56
Capítulo 4. Discusión	62
Capítulo 5. Conclusión	72
Literatura citada	73

Lista de figuras

Figura 1. Órganos que participan en la excreción de nanopartículas.....	5
Figura 2. Preparación de la solución de trabajo de nanopartículas y su dispersión para la preparación de las diferentes concentraciones de NPs utilizadas para los ensayos de viabilidad celular	16
Figura 3. Ensayo de viabilidad celular con el reactivo MTT para conocer la actividad metabólica de las células después de haber agregado las diferentes concentraciones de nanopartículas.....	17
Figura 4. Tipo de muerte celular y la interacción del lípido de membrana fosfatidilserina con la anexina V, y el yoduro de propidio con el núcleo de una célula	19
Figura 5. Estrategia de análisis para obtener los datos en el citómetro de flujo	21
Figura 6. Tipo de muerte celular distribuida por cuadrantes en el gráfico de citometría de flujo para la fluorescencia de PI y anexina V-FITC.....	22
Figura 7. Estrategia de análisis para la internalización de NPsZnO y NPsCuO en las células AML-12 y MDCK mediante la complejidad celular interna evaluada a través del parámetro SSC en el citómetro de flujo Attune NxT.	24
Figura 8. Procesamiento del paquete celular para obtener micrografías	25
Figura 9. Estrategia de análisis para la estimación del potencial de la membrana mitocondrial de las células AMI-12 y MDCK después de ser expuestas de forma aguda a las NPsZnO y NPsCuO	28
Figura 10. Estrategia de análisis para evaluar el ciclo celular de las células AMI-12 y MDCK expuestas de forma aguda a las NPsZnO y NPsCuO.....	30
Figura 11. Distribución de tamaño por intensidad % y numero % de NPsZnO en 1 mL agua miliQ, por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	32
Figura 12. Potencial Z para las NPsZnO, por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	32
Figura 13. Frecuencia de resonancia del plasmón de la superficie (A), micrografía e histograma de la distribución del tamaño de las nanopartículas ZnO por TEM (B-C).	33
Figura 14. Distribución de tamaño por intensidad % y numero % de NPsCuO en 1 mL agua miliQ, por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	33
Figura 15. Potencial Z para las NPsCuO, por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).	34
Figura 16. Frecuencia de resonancia del plasmón de la superficie (A), micrografía e histograma de la distribución del tamaño para las nanopartículas CuO por TEM (B-C).....	34
Figura 17. Evaluación por el ensayo de MTT de la viabilidad de las células de riñón (MDCK) expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) y cobre (NPsCuO)	35

Figura 18. Evaluación por el ensayo de MTT de la viabilidad de las células de hígado (AML-12) expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) y cobre (NPsCuO)	36
Figura 19. Efecto de los iones zinc y cobre en la viabilidad de las células MDCK y AML-12 con una exposición aguda.....	38
Figura 20. Alteración en la morfología de las células MDCK y AML-12 al ser tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de NPsZnO	39
Figura 21. Alteración en la morfología de las células MDCK y AML-12 al ser tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de NPsZnO	40
Figura 22. Tipo de muerte para las células de riñón (MDCK) expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de NPsZnO	41
Figura 23. Porcentaje de células en los tipos de muerte celular para las células MDCK a las diferentes concentraciones de NPsZnO.	42
Figura 24. Tipo de muerte para las células MDCK para las concentraciones de NPsCuO.....	43
Figura 25. Porcentaje de células en los tipos de muerte celular para las células MDCK a las diferentes concentraciones de NPsCuO	43
Figura 26. Evaluación de la presencia de autofagosomas por microscopia confocal para conocer si existe muerte de las células MDCK dependiente de autofagia al ser expuestas de forma aguda a NPSCuO	44
Figura 27. Tipo de muerte para las células de hígado (AML-12) expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de NPsZnO.	45
Figura 28. Porcentaje de células en los tipos de muerte celular para las células AML-12 expuestas a las diferentes concentraciones de NPsZnO	46
Figura 29. Porcentaje de células en los tipos de muerte celular para las células AML-12 expuestas a las diferentes concentraciones de NPsCuO.....	46
Figura 30. Tipo de muerte para las células AML-12 expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de NPsCuO.....	47
Figura 31. Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células MDCK de riñón (A) y AML-12 (B) expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de NPs de ZnO y CuO	48
Figura 32. Efecto de las NPsZnO en la producción de especies reactivas de oxígeno de las células del sistema excretor por microscopia confocal	49
Figura 33. Efecto de las NPsCuO en la producción de especies reactivas de oxígeno de las células del sistema excretor por microscopia confocal	50
Figura 34. Evaluación de la internalización de NPsZnO y NPsCuO en las células de riñón MDCK y AML-12 por citometría de flujo.	51

Figura 35. Micrografías de las células AML-12 expuestas a 18 µg/mL de NPsCuO obtenidas por microscopía electrónica de transmisión.....	52
Figura 36. Potencial de membrana mitocondrial medido por microscopia confocal y citometría de flujo de las células MDCK y AML-12 expuestas de forma aguda (24 h) a NPsZnO.....	54
Figura 37. Potencial de membrana mitocondrial medido por microscopia confocal y citometría de flujo de las células MDCK y AML-12 expuestas de forma aguda (24 h) a NPsCuO	55
Figura 38. Ciclo celular de las células de riñón MDCK expuestas a NPsZnO y NPsCuO por 24 horas.....	57
Figura 39. Ciclo celular de las células de hígado AML-12 expuestas a NPsZnO y NPsCuO por 24 horas.....	59
Figura 40. Mecanismo biológico propuesto para la reducción de la viabilidad de las células MDCK y AML-12 expuestas por 24 horas a las NPsZnO y NPsCuO.....	70

Lista de tablas

Tabla 1. Efectos tóxicos de las NPsZnO reportados en diferentes estudios in vitro en células de hígado y riñón.	7
Tabla 2. Efectos tóxicos de las NPsZnO reportados en diferentes estudios in vitro en células de hígado y riñón.	8
Tabla 3. Efectos tóxicos de las NPsCuO reportados en diferentes estudios in vitro en células de mamíferos.	9

Capítulo 1. Introducción

La nanotecnología se encarga del diseño, creación y manipulación a nivel nanométrico de materiales que tienen por lo menos una de sus dimensiones dentro de la escala 1-100 (Chan, 2006). Estos nanomateriales pueden ser partículas, fibras o tubos y su origen puede ser natural, incidental o manufacturado. Se pueden encontrar en forma de partículas individuales, agregados o aglomerados (Boverhof et al., 2015). Los materiales a nanoescala tienen diferentes propiedades fisicoquímicas con base en su tamaño, forma, composición, química superficial y mayor área superficial de contacto, comparadas con la forma en el tamaño micro y macroscópico. Esta propiedad hace que los nanomateriales sean útiles para diferentes aplicaciones industriales y ambientales, pero al mismo tiempo surge la preocupación de la exposición de los organismos a estos nanomateriales con capacidad de reaccionar químicamente en los procesos biológicos (Navya and Daima, 2016). Por otro lado, la bionanotecnología y la nanotoxicología, estudian las aplicaciones y los efectos que los nanomateriales pueden tener en los diferentes organismos ya sea en animales, bacterias, plantas, hongos u otros (Chan, 2006).

En fechas recientes, el estudio y el uso de los nanomateriales ha tomado relevancia en el área de la salud humana y animal, con el objetivo de desarrollar nuevas alternativas como terapéuticos farmacéuticos, de imagen y diagnóstico contra enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer (Arora et al., 2012). Sin embargo, desde hace algunos años, los nanomateriales se han empleado con fines alimentarios, cosméticos y ambientales. Uno de los más utilizados son las nanopartículas (NPs) metálicas, como las de plata (Ag) y oro (Au); también, de óxidos metálicos como el óxido de cobre (CuO), óxido de zinc (ZnO) y dióxido de titanio (TiO₂) (Bondarenko et al., 2013; Shakeel et al., 2016).

La industria alimentaria ha implementado el uso de las nanopartículas de óxidos metálicos y especialmente las de ZnO y CuO en la composición de envases primarios y secundarios para alimentos o bebidas, o bien, como excipientes dentro de la formulación de estos, lo que favorece el contacto con el producto alimenticio que es ingerido por el consumidor. También la industria cosmética emplea diferentes tipos de nanopartículas de óxidos metálicos para la fabricación de cremas, protectores solares, maquillajes, cremas depilatorias, entre otros productos de belleza, que están en contacto directo con el órgano más grande del ser humano, la piel. En cuanto al uso ambiental se resalta la formulación de biocidas y pesticidas con la finalidad de detener el crecimiento de ciertos organismos que causan enfermedades en cultivos, áreas forestales o acuáticas. Esto implica la exposición a estas nanopartículas por bacterias, hongos, crustáceos,

algas, peces, entre otros, que son hospederos naturales y necesarios para el equilibrio de la vida (Bondarenko et al., 2013; Liu et al., 2018).

Las NPsZnO y NPsCuO pueden ingresar de manera natural al organismo por diferentes vías: inhalación, ingestión o través de la piel o bien administradas por vía intravenosa, entre otras, con las que tienen la capacidad de llegar a ser absorbidas por el sistema circulatorio y distribuirse por todo el organismo, para finalmente ser metabolizadas y biotransformadas en el hígado y ser excretadas a través del riñón en forma de fluidos como la orina (Bugata et al., 2019; Chen et al., 2016). Esto implica, que el hígado y el riñón realicen un trabajo arduo para excretar a las nanopartículas y con esto evitar su acumulación.

La exposición de los organismos a las NPs de ZnO y CuO ha provocado efectos no deseados en el hígado y riñón que van desde la acumulación o lesión hasta la muerte de células epiteliales que los componen, con exposiciones cortas de 24 horas evaluadas *in vitro* y de meses estudiadas en modelos animales para la experimentación (Chen et al., 2016; Hassanen et al., 2019). Algunos de los efectos nanotoxicológicos generados en células por evaluación *in vitro* son: reducción en la viabilidad celular, daños en la membrana celular, generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) e inflamación. Por otro lado, en modelos animales se han descrito efectos como la activación del sistema inmunitario por medio de inflamación y de procesos alérgicos. También se ha reportado genotoxicidad por daños cromosómicos y en el ácido desoxirribonucleico (ADN), mutagenotoxicidad, efectos carcinógenos y estrés oxidativo, principalmente. Estas complicaciones pueden ser ocasionadas por la internalización de las nanopartículas, los iones liberados o únicamente por la interacción indirecta de las células con las nanopartículas (Bugata et al., 2019; Chen et al., 2016; El Bialy et al., 2020). Sin embargo, los mecanismos por los cuales las NPsZnO y NPsCuO desencadenan la muerte de las células no han sido del todo descritos, ya que éstos son distintos y dependen de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.

Es importante mencionar, que la legislación sanitaria sobre los nanomateriales en México es escasa. No existe una norma oficial mexicana (NOM) para la fabricación de productos y materias primas de nanomateriales y mucho menos para su uso en la industria farmacéutica, alimentaria, ambiental y cosmética. Únicamente se cuenta con un grupo multidisciplinario de científicos, quienes crearon el Sistema Nacional de Evaluación Nanotoxicológica (SINANOTOX) y con la norma mexicana NMX-R-12901-1-SCFI-2015 nanotecnologías-Gestión de riesgo ocupacional aplicado a nanomateriales manufacturados (Sánchez, 2018) y otras específicas para nanomateriales de carbono. Esta desregulación sanitaria permea el diseño y la fabricación heterogénea de estos nanomateriales, lote a lote, y no garantiza la calidad de los productos en los lotes subsecuentes. Además, estos productos o materias primas no se someten a pruebas

de seguridad y eficacia establecidas en una norma oficial mexicana, como en el caso de productos ambientales, cosméticos, alimentarios y de insumos para la salud que contienen materias primas microscópicas y macroscópicas. Si bien, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) realiza una evaluación por medio del comité de moléculas nuevas cuando un nanomaterial es propuesto con fines farmacéuticos, es fundamental tomar mayores medidas regulatorias mediante normas oficiales mexicanas, que garanticen la calidad, seguridad y eficacia para su uso en humanos y animales en lotes subsecuentes de los nanomateriales en todas las áreas de aplicación.

Por lo anterior, en este proyecto se realizará una investigación sobre los efectos toxicológicos que pueden generar las NPsZnO y NPsCuO en células epiteliales sanas (no neoplásicas) de hígado y riñón al estar expuestas a pequeñas cantidades de estas nanopartículas, mediante diferentes ensayos *in vitro* que permitan caracterizar el mecanismo que determina la muerte o el daño en las células.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Aplicaciones de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre

Las nanopartículas de óxidos metálicos se encuentran en diversos productos farmacéuticos, alimentarios, ambientales, etc., lo que promueve que los seres humanos y otros organismos se encuentren ante una exposición a las NPs indeseada o incidental silenciosa. Estas NPs ingresan al organismo mediante diferentes rutas, ya sea por vía oral, dérmica, inhalatoria o vía intravenosa, lo que da paso a la absorción de las NPs y a su distribución por todo el organismo a través del torrente sanguíneo, ejerciendo un efecto terapéutico deseado o bien efectos tóxicos indeseados, y a que posteriormente sean eliminadas o acumuladas en los órganos (Bugata et al., 2019; Chen et al., 2016).

Uno de los usos de las NPsZnO y NPsCuO es en el área biomédica, debido a que su tamaño nanométrico facilita su internalización en las células. Se utilizan en aplicaciones de administración de fármacos y de bioimagen y se les atribuyen a las NPsZnO efectos anticancerígenos, antidiabéticos, antibacterianos, antioxidantes, antiinflamatorios. En una revisión realizada por Jiang et al. (2018); Mishra et al. (2017) resumen que las NPsZnO tienen efectos anticancerígenos en órganos como el pulmón, ovarios, cérvix, estómago, en cáncer de células humanas epidermales y en la leucemia promielocítica aguda. De acuerdo con Tang (2019) las NPsZnO obtenidas por síntesis verde mostraron una reducción significativa del

colesterol en un modelo de ratas diabéticas administrando a una dosis de 1–10 mg/kg por 56 días. Estos resultados sugieren que las NPsZnO se podrían utilizar como terapia farmacológica en la diabetes *mellitus*. También, Jiang et al. (2018) mencionan el efecto antidiabético de estas nanopartículas con tamaños de 10 a 95 nm, las cuales reducen la cantidad de glucosa en sangre y colesterol. Ambos estudios remarcan la importancia de continuar el estudio de los efectos toxicológicos de las NPsZnO en los diferentes sistemas biológicos para evidenciar la seguridad de uso de estas NPs en diferentes aplicaciones biomédicas.

Por otro lado, las NPsCuO han sido estudiadas por sus posibles propiedades anticancerígenas; por ejemplo, Rodhe et al. (2015) demostraron el efecto tóxico de las NPsCuO con un tamaño de 15 a 100 nm en células de leucemia. Concluyeron que éstas NPs inducen un daño en el ADN de las células, sobreproducción de especies de oxígeno altamente reactivas como los superóxidos, el peróxido de hidrógeno, el hidroxilo y otro tipo de radicales libres oxidantes que pueden dañar moléculas como lípidos, proteínas y alterar el sistema antioxidante que es regulado por el glutatión y las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa; y finalmente ocasionan la muerte de la célula. Otra investigación relevante sobre las aplicaciones biológicas de las NPsCuO es la de Li et al. (2012), quienes proponen un método altamente sensible y selectivo para la detección del virus de la gripe H1N1 que se basa en el marcaje de anticuerpos policlonales utilizando NPsCuO para detectar y unirse a los antígenos del virus H1N1.

Las NPsZnO y NPsCuO también se utilizan en productos de belleza o cosmética. Dykes (2015), realizó un estudio con la finalidad de probar el efecto de NPsCuO sobre la piel de mujeres, quienes utilizaron fundas de almohada y ropa de cama que contenían NPsCuO y el resultado fue un aspecto mejorado en la piel del rostro, además de un aumento de la elasticidad en la piel del pie utilizando calcetines impregnados con NPsCuO. Además, las NPsZnO están presentes en productos de belleza como polvo de maquillaje, corrector de ojeras e imperfecciones faciales, protector solar, bálsamo para imperfecciones, sombra de ojos, crema de protección solar, entre otros, en concentraciones que van de los 0.5-17 g/100 g de producto, por lo que se requiere más investigación sobre los efectos tóxicos de este tipo de NPs en concentraciones superiores a los 17 g/100 g de producto debido a la toxicidad sinérgica que podría resultar con el uso de más de un cosmético a la vez (Kim et al., 2017).

Por otro lado, la industria alimentaria emplea a las NPsZnO y NPsCuO como aditivos en los alimentos, por sus propiedades antimicrobianas reportadas en distintos estudios que demuestran la capacidad de las NPsZnO con tamaño entre 30-100 nm de inducir la muerte por sobreproducción de ROS, principalmente en bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Jiang et al., 2018; Stankic et al., 2016).

Asimismo, Bondarenko et al. (2013) estudiaron los efectos tóxicos de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, determinaron que las NPsZnO y NPsCuO con tamaños de 20-150 nm son las más tóxicas a concentraciones de 2-3 mg/L de agua, en crustáceos, algas, peces, levaduras, y de 100 mg/L para bacterias, nematodos y protozoos. También, concluyeron que las algas son el organismo más afectado, siendo relevante por ser el alimento de diversos peces.

1.1.2 Mecanismo de excreción de las nanopartículas

El proceso farmacocinético al que son sometidas las nanopartículas se divide en liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción, también llamado sistema LADME. Los órganos principales encargados de la excreción de los nanomateriales una vez que son metabolizados y biotransformados en moléculas o subproductos de menor tamaño son el hígado y el riñón (**Figura 1**). El hígado está conformado en un 60-80% por células epiteliales especializadas, llamadas hepatocitos y puede excretar NPs con un radio hidrodinámico entre 50-200 nm por medio de las heces; mientras que el riñón está integrado por un 90% de células epiteliales, las cuales son capaces de excretar NPs con tamaño entre 6-15 nm es mediante la orina (Li et al., 2017).

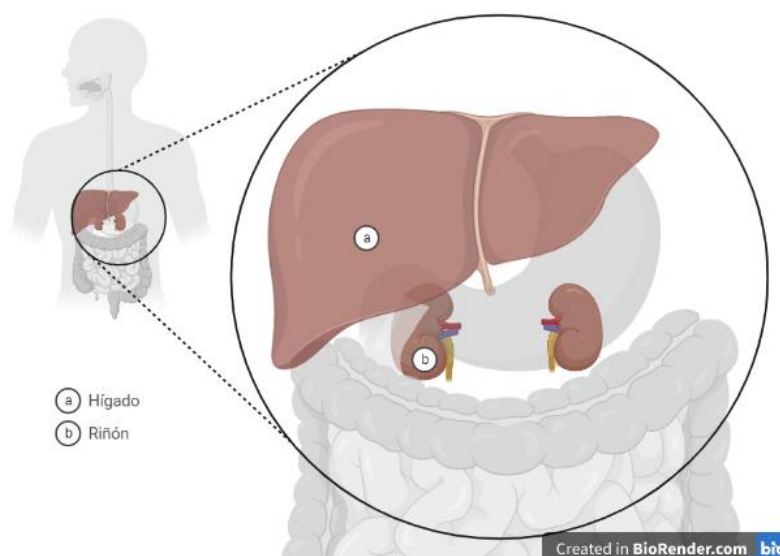


Figura 1. Órganos que participan en la excreción de nanopartículas (Creada por la autora en BioRender.com).

Diferentes estudios han demostrado que la excreción de las NPs por el hígado y el riñón tienen efectos tóxicos que afectan a las células de estos órganos, tales como espacios intersticiales, vacuolas, degradación y necrosis de las células epiteliales, procesos inflamatorios, daño al ADN y mitocondrias, sobreproducción de ROS, entre otras (Chen et al., 2016; Hassanen et al., 2019; Lavicoli et al., 2016).

Además del tamaño, otro aspecto a considerar sobre la excreción de las NPs es su estabilidad para permanecer en fluidos como la sangre, ya que, si tienden a aglomerarse o agregarse, generan cambios en sus propiedades fisicoquímicas que juegan un papel perjudicial en la cinética de excreción, situación que es común cuando las NPs se administran por vía intravenosa. Además, debido a su química superficial, algunas NPs tienen la capacidad de formar una corona proteica, que es una estructura en la superficie de la NP que se construye al interactuar con las proteínas que se encuentran en el medio. Esto puede afectar diversos parámetros fisicoquímicos de las NPs, incrementando su tamaño y, por lo tanto, ocasionando que no puedan ser excretadas por el hígado o el riñón y originando su acumulación (Arami et al., 2015).

1.1.3 Efectos nanotoxicológicos de las nanopartículas de óxido zinc y nanopartículas de óxido de cobre en células del sistema excretor

En los apartados anteriores se mencionó que las NPsZnO y NPsCuO tienen diferentes efectos tóxicos en las células lo que ocasiona una reducción de su viabilidad que culmina con la muerte de la célula. En este apartado, se presentan los efectos nanotoxicológicos descubiertos hasta ahora en células que constituyen el hígado y el riñón, para lo cual se muestran varias tablas que resumen los efectos tóxicos estudiados.

Los mecanismos biológicos que desencadenan las NPsZnO y NPsCuO en los organismos que estuvieron expuestos a este tipo de NPs no están del todo descritos, ya que dependen del tamaño y del tipo de NPs. Los autores mencionados en las **Tablas 1, 2 y 3**, recomiendan continuar con estudios más específicos para determinar los efectos relacionados con el daño al ADN, las mitocondrias y al sistema oxidativo de células que componen a los órganos del sistema excretor o bien en modelos animales que permitan comprender los procesos biológicos y moleculares que se activan o inhiben provocando la muerte de la célula.

Las tablas están ordenadas de acuerdo con el tamaño de la nanopartícula que va de menor a mayor. Esto para facilitar la diferencia de los efectos tóxicos que tienen las NPsZnO y NPsCuO con radio hidrodinámico entre 10-100 nm de radio hidrodinámico en comparación con las que tienen un tamaño superior a los 100 nm.

Tabla 1. Efectos tóxicos de las NPsZnO reportados en diferentes estudios in vitro en células de hígado y riñón.

Línea celular	Tamaño de NPs (nm)	Tiempo de exposición (h)	Concentración	Efecto tóxico	Referencia
Células de hígado HepG2	20	24	5, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$	Reducción de la viabilidad por disminución de las enzimas del sistema antioxidante	(Ahamed et al., 2012)
Células embrionarias de riñón humano (HEK 293)	25–40	3, 24 y 48	5, 25, 50 y 75 $\mu\text{g/mL}$	Muerte apoptótica por incremento de ROS, pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, actividad lisosómica y condensación del núcleo	(V.G. and P.V., 2017)
Células HEK293	36	0- 5	0.1, 1, 10, y 100 $\mu\text{g/mL}$	Daño al ADN por incremento de micronúcleos	(Demir, Creus, y Marcos, 2014)
Células epiteliales de riñón NRK-52E	10-50	24	12.5–50.0 $\mu\text{g/mL}$	Reducción de la viabilidad celular por daño al ADN	(Uzar et al., 2015)
HEK293 e hígado L02	50	4-24	10-100 $\mu\text{g/mL}$	Muerte por estrés oxidativo	(Guan et al., 2012)
Hepatocitos de pez y HepG2	71	24 y 48	25, 50, 100 y 200 mg/L	Daño mitocondrial que conduce a la muerte de las células	(Y. Wang et al., 2011)
Células de riñón MDCK	100	24	12-737 μM	Muerte celular por genotoxicidad y disminución de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante	(Kononenko et al., 2017)

Las investigaciones resumidas en la **Tabla 1 y 2**, demuestran que los diferentes efectos tóxicos ocasionados por las NPsZnO desencadenan la muerte de las células, pero no proponen un mecanismo biológico/molecular detallado que permita conocer con exactitud mayor lo que las NPs causan en las células. Sin embargo, Zhang et al. (2020) proponen un mecanismo de muerte inducida por alteración en las enzimas del sistema antioxidante generado por disminución de los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) para el péptido glutatión y la enzima glutatión peroxidasa, ambas moléculas importantes del sistema antioxidante celular, además del aumento en el malondialdehído.

Tabla 2. Efectos tóxicos de las NPsZnO reportados en diferentes estudios in vitro en células de hígado y riñón.

Línea celular	Tamaño de NPs (nm)	Tiempo de exposición (h)	Concentración	Efecto tóxico	Referencia
Células de riñón humano HK-2	<100	24	2.5 µg/cm ²	Muerte de las células por sobreproducción de ROS	(Pujalté et al., 2011)
Células HepG2 y HK-2	100	24	256 µg/mL	Reducción de la viabilidad por daño al ciclo celular	(Thongkam et al., 2017)
Línea celular hepatocitos C3A	130	24	0.5–256 mg/mL	Citotoxicidad en las células con aumento claro de la producción de IL-8	(Kermanizadeh et al., 2013)
Células HepG2	267	12 y 24	0.8, 2, 8, 14–20 µg/mL	Induce daño al ADN debido a una producción mayor de ROS	(Sharma, Anderson, y Dhawan, 2012)
Línea celular hepatocitos C3A	332	4, 24 y 48	0.5-256 µg/mL	Decremento del antioxidante glutatión	(Kermanizadeh et al., 2012)

Además, los autores demuestran que existe un daño en el potencial de la mitocondria por acumulación de hierro en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) después de ser expuestas por 24 h a concentraciones de 10 y 15 µg/µL de NPsZnO con un tamaño de 30 ±10 nm.

Finalmente, Zhang et al. (2020) proponen un mecanismo de muerte celular por ferroptosis, que se induce por la acumulación de hierro y es dependiente de la peroxidación de lípidos. Este tipo de muerte celular es potenciada con la expresión del gen p53, el cual participa en la interrupción de la división celular cuando existe daño al ADN y es considerado el guardián del genoma. Aunque el trabajo descrito por Zhang et al. (2020) se llevó a cabo en células HUVEC, es una investigación muy completa, que da pauta para realizar investigaciones similares, pero en células del sistema excretor con tamaños de NPs diferentes.

Tabla 2. Efectos tóxicos de las NPsCuO reportados en diferentes estudios in vitro en células de mamíferos.

Línea celular	Tamaño de NPs (nm)	Tiempo de exposición (h)	Concentración	Efecto tóxico	Referencia
Células embrionarias de riñón HEK-293	<50	48	3 mg/mL y 300 mg/mL	Daño a la membrana celular, decremento de la GSH e incremento en la producción de IL-8	(Reddy y Lonkala, 2019)
Linfocitos	<100	2, 4 y 6	0.1, 0.2, 0.4, 0.5 y 0.8 mM	Muerte celular por peroxidación de lípidos, daño a la mitocondria y a los lisosomas.	(Assadian et al., 2018)
Células de Kupffer (KC) y hepatocitos	114.4 y 362.1	5, 6 y 24	12.5, 25, 50, y 100 µg/mL	Muerte apoptótica mediada por caspasa 3 y sobreproducción de ROS mitocondriales	(X. Wang, Chang, et al., 2020)
Células de glioma C6 y astrocitos	141±13	0.5 y 5 h	10-1000 µM	Reducción de la viabilidad celular y de lactato deshidrogenasa (LDH).	(Joshi et al., 2016)
Células humanas de epitelio alveolar A549	175	24	0.32, 1.6, 3.2, 16.1, y 32.1 µg/cm ²	Promoción de la un inflammasoma NLRP3 por aumento de IL-1α y actividad proinflamatoria por IL-6	(Hufnagel et al., 2021)
Hemocitos y células gliales y alveolares	197 y 210	2, 4 y 24	0.05, 0.5, 2.75 y 5 mg/L	Reducción de la viabilidad celular por sobreproducción de ROS, inhibición de la Na-K-ATPasa y daño al ADN.	(Katsumiti et al., 2018)
HepG2 y Caco-2	221.53	24 h	2.5, 5, 10, 15, 20 y 40 µg/mL	Muerte celular apoptótica por daño al ADN	(Abudayyak, Guzel, and Özhan, 2020)

La **Tabla 3** resume los efectos nanotoxicológicos que se han reportado por las NPsCuO en células de mamíferos. Es importante mencionar que para estos tipos de NPs se han realizado escasos estudios de los efectos tóxicos en células de hígado y riñón, y en general en células de mamíferos. La comunidad científica ha enfocado las investigaciones en bacterias, levaduras, hongos y algas. Por estas razones, en la tabla se presentan los estudios más relevantes en diversas células de mamíferos.

Los autores citados en la **Tabla 3**, coinciden en que las NPsCuO tienden a aglomerarse o agregarse en el medio que se emplea para el cultivo de células animales, lo que ocasiona un aumento del radio hidrodinámico de las NPs en comparación con la caracterización del tamaño en agua desionizada. Además, mencionan que son necesarias más investigaciones sobre el efecto de las NPsCuO en diferentes líneas celulares o en modelos animales.

1.1.4 La regulación sanitaria de los nanomateriales en México

El uso de las NPs para distintas aplicaciones aumenta continuamente, sin embargo, la legislación sanitaria en México esta rezagada; no existen normas oficiales mexicanas (NOMs) que regulen la síntesis, uso y desecho de los nanomateriales, únicamente existen las siguientes normas mexicanas (Foladori et al., 2017; Sánchez, 2018):

- NMX-R-10867-SCFI-2014, para la caracterización de nanotubos de carbono de una capa mediante espectroscopia de fotoluminiscencia en el infrarrojo cercano.
- NMX-R-10929-SCFI-2014, para la caracterización de muestras de nanotubos de carbono de múltiples capas.
- NMX-R-27687-SCFI2014, que plantea una terminología y definiciones para nano-objetos-nanopartícula, nanofibra y nanoplaca.
- NMX-R-80004-1-SCFI-2014 nanotecnologías; el Vocabulario-Parte 1: Conceptos básicos.
- NMX-R-80004-3-SCFI-2014, Nanotecnologías-Vocabulario-Parte 3: nano-objetos de carbono.

- NMX-R-12901-1-SCFI-2015 nanotecnologías-Gestión de riesgo ocupacional aplicado a nanomateriales manufacturados.

Todas estas normas no son obligatorias sino voluntarias, flexibles y no reglamentarias, por lo que esta desregulación sanitaria conlleva a un flujo incontrolado de la producción y síntesis de NPs para diferentes aplicaciones a las que nos encontramos constantemente expuestos. Por lo anterior, es importante implementar Normas Oficiales Mexicanas (NOM), que son de carácter obligatorio y que contienen lineamientos que permiten obtener medidas uniformes y garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los nanomateriales en productos o materias primas. Estas NOMs deben establecerse entre los legisladores, la comunidad académica y la industria privada para señalar pautas por un beneficio común sobre la seguridad de los productos o materias primas (Tanaka, 2019).

La comunidad académica mexicana se ha organizado para impulsar esto, a través de la Red de Nanociencias y Nanotecnología (RNyN, CONACYT), la cual promovió la creación del Sistema Nacional de Evaluación Toxicológica (SINANOTOX), el cual es un grupo de investigadores provenientes de universidades públicas y privadas que conjuntan su experiencia en la nanotoxicología para proponer protocolos estandarizados que permitan realizar pruebas toxicológicas de los nanomateriales y comparar sus efectos en diversos modelos biológicos. Los resultados que se obtienen permiten contribuir con evidencia científica a la regulación sanitaria de los nanomateriales y en la gestión de la implementación de las NOMs para garantizar su seguridad (Sánchez, 2018).

Por lo tanto, en este trabajo de investigación realizaremos una comparación de los efectos tóxicos de las nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre en la mitocondria y el ciclo celular de células epiteliales de hígado (AML-12) y riñón (MDCK) para determinar los efectos toxicológicos de tales NPs y el mecanismo biológico que pudieran reducir su viabilidad celular.

1.2 Hipótesis

La exposición aguda (24 h) de las células epiteliales de hígado (AML-12) y riñón (MDCK) a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre reducen su viabilidad de manera dependiente de la concentración, debido al decremento en el potencial de la membrana mitocondrial y al arresto en los estadios del ciclo celular.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Estudiar los efectos de diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc y de óxido de cobre en la viabilidad, morfología, potencial de la membrana mitocondrial y estadios del ciclo celular de células epiteliales del sistema excretor.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el tamaño, potencial zeta y banda de absorción de las nanopartículas ZnO y CuO.
2. Evaluar la viabilidad de las células de riñón MDCK e hígado AML-12, incubadas con diferentes concentraciones de nanopartículas ZnO y CuO.
3. Visualizar los cambios morfológicos de las células MDCK y AML-12 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO y CuO.
4. Identificar y cuantificar el tipo de muerte celular ocasionado en las células MDCK y AML-12 por la exposición a diferentes concentraciones de nanopartículas ZnO y CuO.
5. Analizar la producción de especies de oxígeno altamente reactivas en las células MDCK y AML-12 incubadas con diferentes concentraciones de nanopartículas ZnO y CuO.
6. Determinar si las nanopartículas de ZnO y CuO se internalizan en las células MDCK y AML-12.
7. Determinar el potencial de la membrana mitocondrial de las células MDCK y AML-12 expuestas a las diferentes concentraciones de nanopartículas.
8. Comparar el efecto de las diferentes concentraciones de las nanopartículas de ZnO y CuO en el ciclo celular de las células MDCK y AML-12.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Nanopartículas y caracterización fisicoquímica

Las nanopartículas (NPs) de ZnO y CuO comerciales se adquirieron de la empresa Sigma-Aldrich. Las NPsZnO (Cat. 721077), se encuentran dispersadas en 20 wt. % en agua, mientras que las NPsCuO II (Cat. 544868), se presentan en forma de nanopolvo.

2.1.1 Dispersión Dinámica de Luz

Para obtener la distribución de tamaño, diámetro hidrodinámico y el potencial Z de las nanopartículas, se empleó la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés) y se utilizó el equipo ZetaSizer NanoZS (Malvern, UK). Primero, se dispersaron las NPs contenidas en agua desionizada en un tubo cónico de 15 mL a una concentración de 1 mg/mL por ultrasonificación durante 10 min, con un intervalo de paro a los 9.9 segundos, manteniendo una temperatura máxima de 40°C, con 35% de intensidad al utilizar la punta #2 del equipo. Luego se tomó de esa muestra 100 µL de NPs y se mezclaron con 1 mL de agua desionizada, se traspasaron a una celda (Malvern, DTS1070) para su lectura en el DLS. Se establecieron las condiciones de procesamiento de muestra, las nanopartículas como analito, el modelo de la celda, el tipo medio de dispersión (agua) y la temperatura a 25°C.

2.1.2 Microscopia electrónica de transmisión

Por otro lado, se obtuvieron micrografías de las NPsZnO y NPsCuO para conocer con mayor precisión el tamaño y la distribución en agua miliQ. Para esto, se tomó una alícuota de 10 µL de la solución madre que se encuentra a una concentración de 1 mg/mL de NPs de ZnO ó CuO. Luego, la alícuota se colocó en una rejilla de cobre recubiertas de formvar/carbón (malla 75, Ted Pella Inc.) para su observación en el microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Las muestras montadas en la rejilla se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se observaron en el TEM. De las imágenes obtenidas se realizó la medición del diámetro de 100 NPs en el software ImageJ y la distribución de tamaños de las NPs de ZnO y CuO se graficaron en histogramas.

2.2 Cultivo celular

Las células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney NBL-2, ATCC® CCL-34™) son células no neoplásicas derivadas de riñón, tienen una morfología epitelial de tipo adherente, el organismo del cual provienen es del perro (*Canis familiaris*). Por otro lado, las células AML-12 (Alpha mouse liver 12, ATCC® CRL-2254™), provienen del ratón (*Mus musculus*), son células no neoplásicas de tipo adherente y de morfología epitelial. Las dos líneas celulares son consideradas como modelos celulares *in vitro* adecuados para estudiar el metabolismo y excreción de sustancias extrañas externas o internas, como las nanopartículas. Estas líneas celulares son de origen epitelial, lo que les atribuye una característica ventajosa para el estudio de la absorción y toxicidad de nanopartículas, además, de que los resultados que se obtienen en estos modelos celulares son extrapolables a organismos vivos (Hassoun and Mettling, 2015). Además, las células AML-12 son utilizadas ampliamente para estudiar el estrés oxidante y por su parte, las células MDCK al ser de origen canino tienen una alta tasa de duplicación por lo que la confluencia celular se alcanza en periodos más cortos en comparación con las células AML-12 (Barnett and Cummings, 2018). También, las células MDCK, se emplean para estudiar la nefrotoxicidad, la organización estructural de las células epiteliales por su capacidad de polarización y la internalización y transcitosis de nanopartículas (Simons, 2006).

Las líneas celulares MDCK y AML-12 fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC), se utilizaron pases jóvenes proporcionados por el Departamento de Bionanotecnología del CNYN-UNAM. Las células MDCK se cultivaron en medio EMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB), 1% de antimicótico/antibiótico (penicilina y estreptomycin), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) y bicarbonato de sodio (2 g/L). Y las células AML-12 se cultivaron en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% de SFB, 10 µg/mL de insulina, 5.5 µg/mL de transferrina, 5 ng/mL de selenio, 40 ng/mL de dexametasona y 1% de antimicótico/antibiótico (penicilina y estreptomycin). Los medios de cultivo fueron esterilizados mediante filtración con un filtro que tiene un tamaño de poro de 0.22 µm.

Ambas líneas celulares se mantuvieron en cultivo en cajas Petri de 5 y 10 cm en incubación a 37°C en una atmosfera humidificada al 5% de CO₂, para las células MDCK se empleó una densidad inicial de cultivo de 5x10⁴ células en 5 mL y 1 x10⁵ de células AML-12 en un volumen final de 10 mL.

2.2.1 Subcultivo de células

El subcultivo de las células se realizó cuando los cultivos celulares tuvieron una confluencia entre el 70 al 80%, para despegar las células de la superficie de la placa se utilizó 1 mL de tripsina/EDTA 1X (Sigma-Aldrich), dejando actuar a temperatura de 37°C y 5% de CO₂, entre 5-10 min para el caso de las células MDCK y 3-5 min para las células AML-12. Las células que se desprenden de la placa de cultivo se colectaron en tubos de 1.5 mL y se realizaron dos lavados con 200 µL de medio de cultivo completo, las células se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min, para eliminar el exceso de tripsina y evitar el daño a la membrana celular. Posteriormente, el pellet de las células se resuspendió en 1 mL de medio completo y se procedió a obtener viales para criopreservar células y se continuo con la expansión del cultivo. Los pases subsecuentes fueron criopreservados para su posterior uso a -70°C en criotubos de 1.5 mL.

2.2.3 Recuento celular

El conteo de las células se efectuó por la técnica de exclusión de azul tripano, dependiendo de la confluencia celular se usaron diluciones 1:5 ó 1:10 y se visualizaron por medio de un microscopio óptico empleando una cámara de Neubauer para conteo celular. Los cuadros que se emplearon para contar este tipo de células son los cuadros grandes ubicados en las equinas de la cámara de 1 mm². Para el cálculo de concentración celular se realizará de acuerdo con la siguiente formula:

$$C = (N) (10^4) (FD)$$

En donde:

C= células/mL

N= promedio de células presentes en 1 mm² (0.1 µL)

FD= Factor de dilución

2.3 Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT

Para conocer la actividad metabólica y por tanto la viabilidad de las células al someterse a las distintas concentraciones de nanopartículas de óxidos metálicos, se empleó el ensayo de reducción del compuesto

bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La reducción del MTT es realizada por acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales, principalmente, por la succinato deshidrogenasa y algunas enzimas citosólicas. Por lo tanto, la cantidad de MTT reducido es un indicador indirecto de la actividad mitocondrial y, por ende, de la viabilidad celular.

El ensayo de viabilidad por reducción del MTT, se efectuó en una placa de 96 pozos en fondo plano con 10,000 células por pozo llevándolos a un volumen final de 100 μ L con medio de cultivo completo. Posteriormente, las células se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Después, a cada pozo, se le agregó por triplicado diferentes concentraciones de las NPs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35 y 40 μ g/mL, en un volumen final de 100 μ L por pozo (**Figura 2**). Para el control negativo se adicionó únicamente medio de cultivo completo y para el control positivo se usó Tritón-X100 al 0.5% que induce la muerte celular. La placa con las células en tratamiento se incubó por 24h a 37°C y 5% CO₂. Una vez terminado este tiempo, y para cumplir con el objetivo de identificar los cambios morfológicos inducidos en las células AML-12 y MDCK por la exposición a las diferentes concentraciones de nanopartículas de óxidos metálicos, se tomarán fotografías con el microscopio invertido para facilitar su comparación.

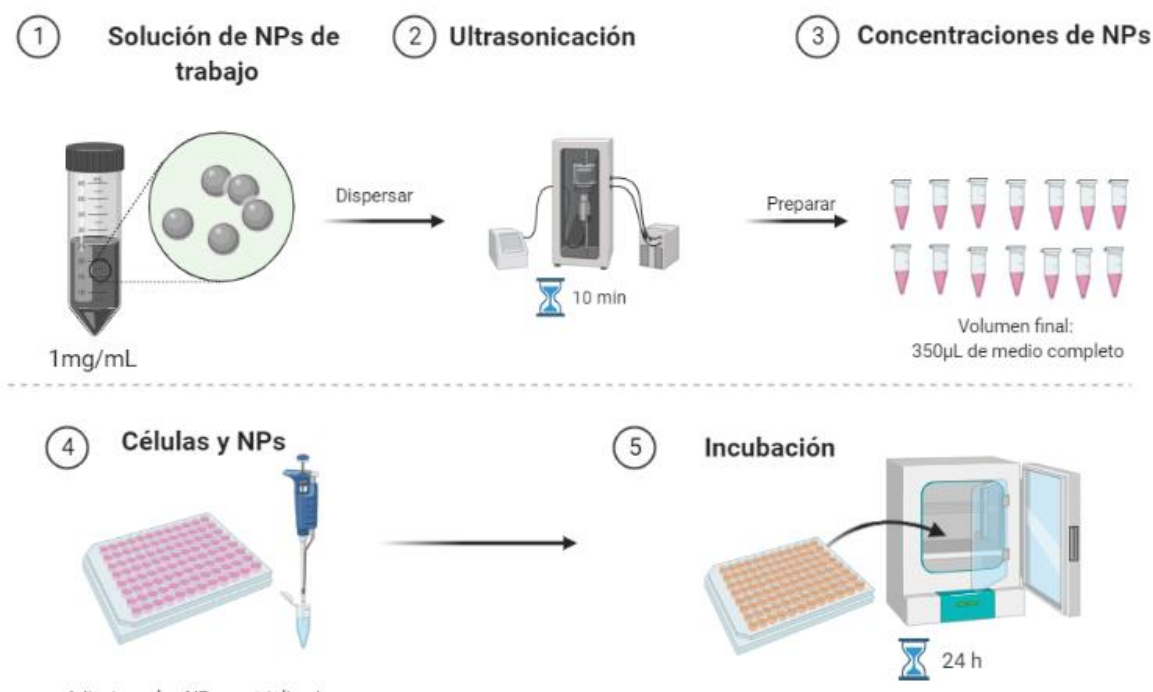


Figura 2. Preparación de la solución de trabajo de nanopartículas y su dispersión para la preparación de las diferentes concentraciones de NPs utilizadas para los ensayos de viabilidad celular (Creada por la autora en BioRender.com).

Posteriormente se decantó el medio, se realizaron tres lavados con 200 μL de buffer de fosfatos (PBS 1X) para retirar las nanopartículas y se agregó 10 μL del compuesto de MTT (3 mg/mL) y 90 μL de medio de cultivo completo a cada pozo. Se dejó incubar la placa durante 4h a 37°C y 5% CO_2 . Terminado el tiempo de incubación, se adicionó 100 μL de isopropanol puro a cada uno de los pozos y se resuspendió consecutivamente por lo menos 10 veces, para ayudar a disolver los cristales de formazanos que se forman, la placa se incubó nuevamente por 30 min a 37°C y 5% CO_2 . Para terminar, se midió la absorbancia del color violeta insoluble de los compuestos de formazanos a dos longitudes de onda 570 y 690 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO) (**Figura 3**).

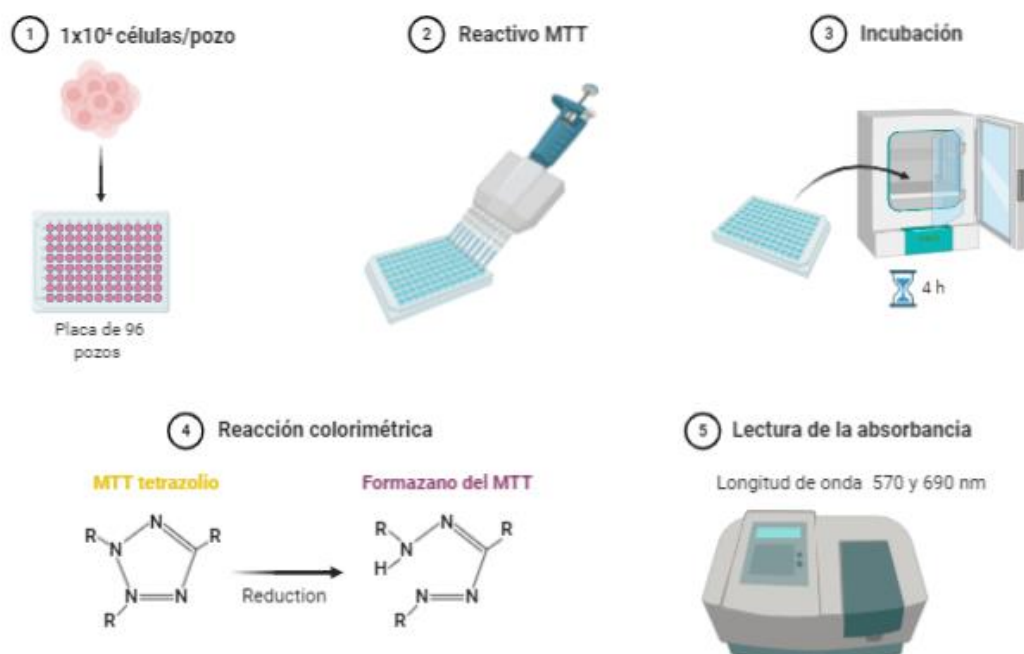


Figura 3. Ensayo de viabilidad celular con el reactivo MTT para conocer la actividad metabólica de las células después de haber agregado las diferentes concentraciones de nanopartículas (Creada por la autora en BioRender.com).

Para calcular la viabilidad celular se utilizó una relación matemática, primero, se obtendrá la absorbancia (Abs) real medida de la siguiente forma;

$$Abs \text{ real muestra} = Abs \lambda 570nm - Abs \lambda 690nm$$

Una vez que se obtuvieron las absorbancias de todas las muestras, se restó el valor promedio de la absorbancia de las células muertas (tratadas con Tritón-X100 al 0.5%), para normalizar los valores. Luego se calculó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular\ \% = \frac{Abs\ real\ de\ la\ muestra}{Abs\ real\ control\ positivo} (100)$$

2.3.1 Comparación de la viabilidad de las células del sistema excretor expuestas a NPs de ZnO y CuO con iones quelados y con sales de zinc y cobre

Con la finalidad de identificar si la reducción de la viabilidad de las células del sistema excretor se debe a los iones liberados de las nanopartículas o bien a la nanopartícula como tal, se evaluó la viabilidad de las células AML-12 y MDCK expuestas de forma aguda a las NPs de ZnO y CuO en presencia de un agente quelante, así como se estudió con la exposición al cloruro de zinc ($ZnCl_2$) y cloruro de cobre ($CuCl_2$).

Para esto se procedió primero con la quelación de los iones de las NPs de ZnO y CuO, incubado las concentraciones de las NPs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35 y 40 $\mu g/mL$, en un volumen final de 350 μL por 1 hora a 37°C con 1 mM de EDTA. Posteriormente, se agregaron 100 μL de cada concentración por cada pozo de las células AML-12 ó MDCK. Se incluyeron controles que contenían medio de cultivo con 1mM de EDTA. El resto del procedimiento para evaluar la viabilidad con el reactivo MTT, se realizó como se describió anteriormente para la viabilidad con NPs sin la quelación de los iones.

Por otro lado, para conocer la viabilidad de las células del sistema excretor al ser expuestas a concentraciones de $ZnCl_2$ y $CuCl_2$ se realizaron los cálculos pertinentes para obtener concentraciones de los iones Zn y Cu en las sales similares a los que se encuentran en las concentraciones de NPs estudiadas. Se incluyó un control sin tratamiento. Y el ensayo por MTT se realizó con las mismas características de los experimentos de viabilidad celular con NPs ZnO y CuO y las NPs con quelación de iones.

2.4 Cuantificación y detección del tipo de muerte celular por citometría de flujo

Apoptosis y Necrosis

La membrana de la célula es asimétrica y se compone de diferentes tipos de lípidos, entre ellos se encuentra la fosfatidilserina, que normalmente se encuentra en la cara citosólica de la membrana plasmática. Una de las señales moleculares de inducción de una muerte celular programada o apoptosis, es la translocación de la fosfatidilserina a la cara extracelular de la membrana plasmática, lo que permite cuantificar y detectar el tipo de muerte celular. El método para poder diferenciar las células apoptóticas de las necróticas es mediante la tinción conjunta con yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) y anexina V acoplada a FITC (Isotiocianato de fluoresceína). Durante la apoptosis, la asimetría en la que se distribuye la fosfatidilserina se ausenta y queda expuesta al exterior de la membrana plasmática permitiendo la unión de la anexina V a la fosfatidilserina (**figura 4**).

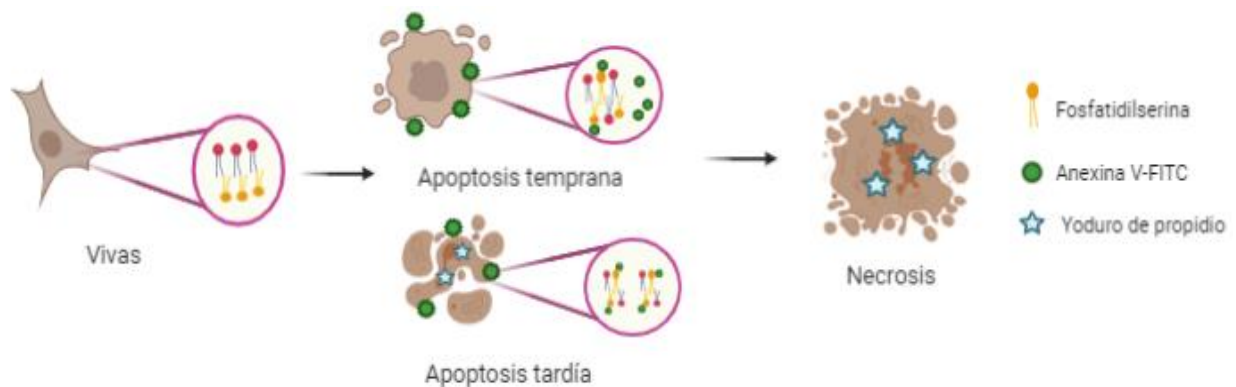


Figura 4. Tipo de muerte celular y la interacción del lípido de membrana fosfatidilserina con la anexina V, y el yoduro de propidio con el núcleo de una célula (Creada por la autora en BioRender.com).

Mediante la técnica de citometría de flujo es posible hacer una diferencia entre las células que exhiben diferentes mecanismos de muerte celular como necrosis, apoptosis temprana y tardía. Ya que, para el caso de las células necróticas, la membrana celular está dañada y en algunos casos, ha perdido su integridad, por lo tanto, el PI es el único agente que se intercala entre el ADN a causa de la inestabilidad de la membrana y es posible detectar su fluorescencia. Mientras que las células en apoptosis temprana exhiben

al lípido fosfatidilserina en su membrana externa, por lo que anexina V conjugada con el fluorocromo FITC (Anexina V-FITC), se une de forma específica a este fosfolípido. Mientras que, en las células con apoptosis tardía, pueden ser detectadas por la fluorescencia conjunta del PI y de la Anexina V-FITC, ya que además de que la fosfatidilserina está expuesta en la cara externa de la membrana plasmática, la estructura de esta ha sido dañada parcialmente, por lo que el yoduro de propidio junto con la Anexina V-FITC, están presentes en las células en apoptosis tardía.

Para la medición de la muerte celular a través de la detección de la localización de fosfatidilserina y la permeabilidad de las membranas, se utilizó el kit de células muertas con anexina V-FITC y yoduro de propidio (Thermofisher Cat. V13241). El cultivo celular para esta medición se realizó con las mismas características y condiciones que se usarán para los ensayos de viabilidad celular, con la exposición de las células a las diferentes concentraciones de nanopartículas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35 y 40 $\mu\text{g/mL}$. Por lo que, terminando las 24 h de incubación se procedió a decantar el medio y se realizaron tres lavados con 200 μL de PBS 1X. Se procedió a separar las células de la caja de cultivo mediante tripsinización agregando 100 μL de tripsina por pozo y se recuperó el sobrenadante. Después de agregar la tripsina se esperó durante 3 min en condiciones de cultivo celular y se traspasaron a tubos de 1.5 mL, posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min y se lavaron dos veces con medio de cultivo completo para eliminar la tripsina. Luego, las muestras se incubaron por 30 min a 37°C y 5% de CO_2 en medio completo para permitir la estabilización de la membrana. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se volvieron a centrifugar por 5 min a 1200 rpm y se decantó el medio de cultivo. Inmediatamente se resuspendieron las células en 250 μL de una solución de buffer de unión 1X de 4mL que contenía 40 μL de FITC-Anexina V y 16 μL de una solución de trabajo de PI con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (2.5 μL en 22.5 μL de buffer de unión a anexina 1X); el buffer de unión a anexina 1X se preparó con 1mL de buffer 5X y 4 mL de PBS 1X.

Después, se incubaron las células en los tubos durante 30 min a 37°C y 5% de CO_2 . En seguida, se procedió a medir la fluorescencia de la unión de la anexina V-FITC y la de PI, usando el láser azul a 488 nm en el citómetro de flujo (Attune NxT) y los canales BL1-FITC y BL3-PI, se adquirieron al menos 10,000 eventos por muestra.

El análisis de los resultados se realizó en el software FlowJo, la estrategia de análisis se hizo a partir del control sin tinción y el control de muerte inducida, siendo para todas las muestras la misma estrategia, como se indica en la **figura 5**. Se incluyeron controles sin tinción, con tinción positiva para muerte y control de muerte basal.

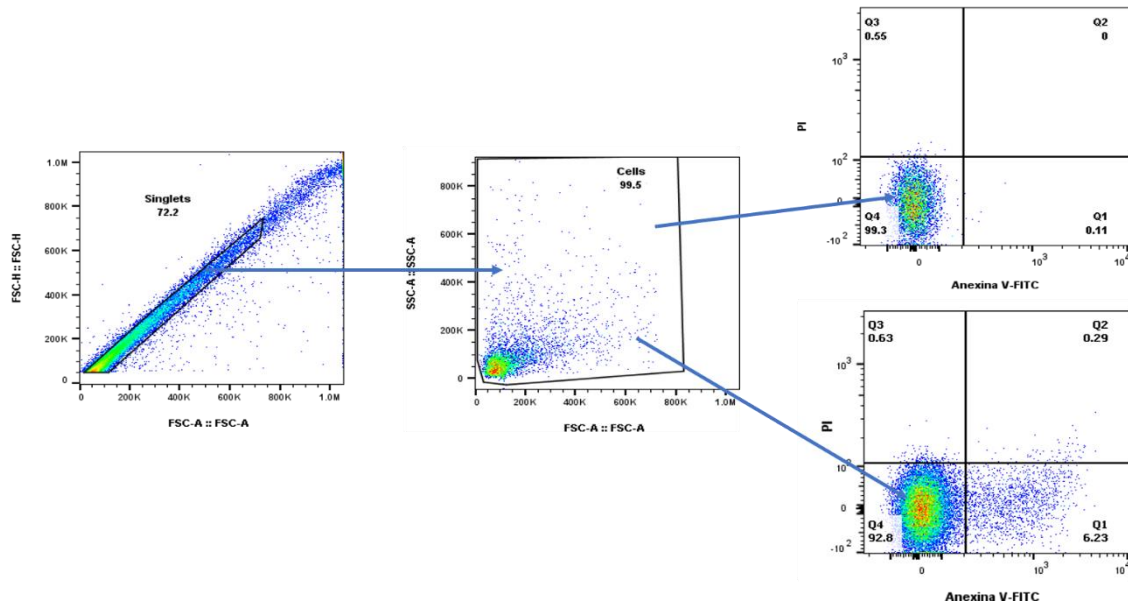


Figura 5. Estrategia de análisis para obtener los datos en el citómetro de flujo. En el primer gráfico se selecciona los eventos únicos (singlets), después se grafica complejidad (SSC-A) vs el tamaño relativo (FSC-A), y, por último, se obtiene otro gráfico de la intensidad de la fluorescencia del PI vs Anexina V-FITC en los cuatro cuadrantes (Creada por la autora en Flow Jo).

Cabe señalar, que las diferentes poblaciones celulares quedan divididas en cuatro cuadrantes para identificar aquellas que son negativas (-) o positivas (+) a la fluorescencia de PI y FITC. El cuadrante inferior izquierdo (Q4) agrupa a las células que son negativas a la fluorescencia para PI y FITC, también se les conoce como dobles negativas y se representan como PI-FITC-, éstas son consideradas como el porcentaje de células vivas y/o células con otro tipo de muerte distinto a apoptosis/necrosis. En el caso del cuadrante inferior derecho (Q1), las células son FITC+PI-, lo que indica la muerte por apoptosis temprana, luego las PI+FITC+ indican la apoptosis tardía (Q2) y por último la población PI+FITC- se usa para identificar a las células necróticas (Q3). A partir de esto, se obtendrán porcentajes para cada grupo de población celular, ya sean células vivas, en necrosis, apoptosis temprana y tardía (**Figura 6**).

Muerte celular dependiente de autofagia

La autofagia es otro tipo de muerte celular, que se conoce como un proceso de degradación que se dirige a proteínas de larga vida, organelos y otros componentes citoplasmáticos a través de la vía lisosomal. La muerte celular dependiente de autofagia se puede identificar en las células que presentan acumulación de autofagosomas y autolisosomas en el citoplasma. Se decidió estudiar este tipo de muerte en las células

MDCK expuestas a NPsCuO. Debido a que, no se presentaron porcentajes significativos en los ensayos de apoptosis/necrosis.

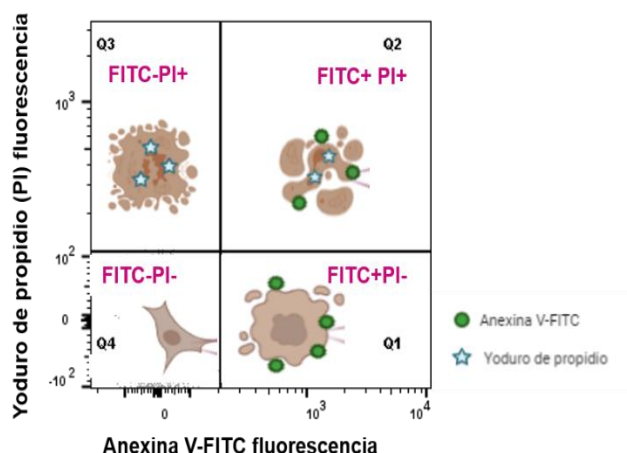


Figura 6. Tipo de muerte celular distribuida por cuadrantes en el gráfico de citometría de flujo para la fluorescencia de PI y anexina V-FITC (Creada por la autora en BioRender.com).

El ensayo se llevó acabo de acuerdo con las instrucciones del Kit de Autofagia (MAK 138-IKT) de Sigma Aldrich. Las células se cultivaron en placas Petri de 3 cm con fondo de vidrio a una densidad celular de 30,000 células. Después, se removió el medio de cultivo y se agregaron las distintas concentraciones de NPsCuO en medio de cultivo que van de 4, 8, 12, 16, 20 a 30 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, se incubaron las placas de cultivo por 24 horas a 37°C , 5% de CO_2 . Después, se retiró el tratamiento y se lavaron las células con 1mL de PBS 1X por dos veces. Seguido, se procedió a la tinción agregando 250 μL del buffer de tinción del KIT y el fluorocromo que se dirige a los autofagosomas a una concentración de 10x en las células, se incubó por 1 hora a 37°C y 5% de CO_2 .

Pasado el tiempo, se retiró el exceso de fluorocromo, lavando dos veces con 1 mL de buffer de lavado. Y se agregó 1 mL de medio de cultivo suplementado al 10% con SFB. Se observaron las muestras en el microscopio confocal invertido Olympus Fluoview FV1000, usando el objetivo 60X y para el flurorocromo de color azul que marca a los autofagosomas se utilizó un filtro de excitación/emisión de 360/520 nm. Las micrografías se procesaron utilizando el software FV-10 ASW y se analizaron con el software Visor FV-10ASW y ImageJ.

2.5 Internalización de las nanopartículas de ZnO y CuO en las células AML-12 y MDCK con una exposición aguda

La internalización de las NPs en las células es proceso que puede llevarse a cabo por endocitosis para NPs de mayor tamaño > 5 nm o por difusión pasiva para tamaños de NPs < 5nm o iones, esto puede generar cambios en las funciones de las células y un impacto negativo en su viabilidad. Evaluar si existe internalización de las NPs permite establecer un componente crucial en el mecanismo biológico que reduce la viabilidad de las células que han sido expuestas a las NPs. Por lo tanto, con este ensayo se pudo correlacionar la internalización o no de las NPs con la muerte de las células.

2.5.1 Evaluación de la internalización de nanopartículas de ZnO y CuO en las células del sistema excretor por citometría de flujo

La identificación de la internalización de NPsZnO y NPsCuO en las células AML-12 y MDCK se efectuó mediante citometría de flujo, utilizando el parámetro de complejidad celular (SSC, Side Scatter en inglés). El SSC, permite obtener información de la complejidad interna de las células, ya que, al impactar el láser con la célula, la luz se dispersa hacia los lados obteniendo información sobre la complejidad celular interna. El cultivo celular para esta medición se llevó a cabo con las mismas características y condiciones que se usó en el ensayo de detección de tipo de muerte celular al igual que la tinción con PI y anexina V-FITC para diferenciar la complejidad de las células vivas con las muertas. Se emplearon las mismas concentraciones de nanopartículas que van de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35 y 40 µg/mL.

Se adquirieron 10,000 eventos por muestra y los resultados se presentaron en porcentajes y fueron analizados mediante el software FlowJo. La estrategia de análisis se realizó seleccionando únicamente las células vivas (PI- y Anexina V-FITC) en todas las concentraciones evaluadas para descartar el cambio en la complejidad celular ocasionado por la muerte (**Figura 7**). También, se incluyó un control sin tinción y sin tratamiento para poder ajustar las muestras teñidas, otro control fue teñido, pero sin tratamiento con el que se hizo la comparación con el resto de las muestras tratadas e identificar si hubo cambio en la complejidad celular interna.

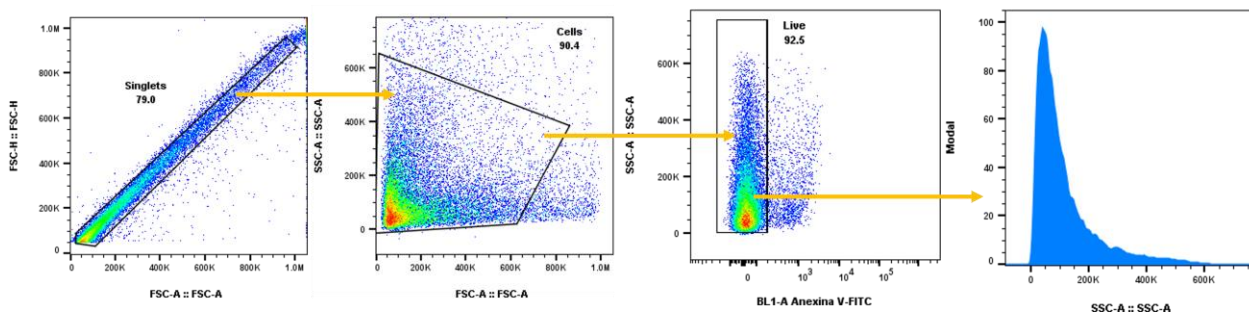


Figura 7. Estrategia de análisis para la internalización de NPsZnO y NPsCuO en las células AML-12 y MDCK mediante la complejidad celular interna evaluada a través del parámetro SSC en el citómetro de flujo Attune NxT.

2.5.2 Identificación de la internalización de nanopartículas CuO en las células AML-12 por microscopia electrónica de trasmisión

Una vez, que se obtuvieron los datos de la internalización de nanopartículas en las células del sistema excretor, se realizó un procesamiento de la muestra para obtener micrografías por TEM, para respaldar los resultados obtenidos en citometría de flujo.

Primero, se seleccionó la concentración de 18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO en las células AML-12, ya que a partir de esta concentración se registró aumento en la complejidad celular interna de estas células mediante citometría de flujo. Las células AML-12 se cultivaron en placas de cultivo de 3 cm en una densidad celular de 30,000 células. Después se adicionó 18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO y se incubó a 37°C, 5% de CO_2 por 24 horas para una exposición aguda. Terminando el tiempo de exposición se removió el medio de cultivo y se despejaron las células con la ayuda de una espátula celular para evitar la ruptura de la monocapa y se recolectó con una pipeta de 1 mL con punta de un diámetro de aproximadamente 5 mm. Se centrifugó por 5 min a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante. Y se lavó sin resuspender con PBS 1X para eliminar el resto de medio de cultivo.

Posteriormente, se añadieron 500 μL de solución de glutaraldehído al 2.5% para fijar las células por 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se lavó dos veces con PBS 1X sin resuspender a las células. Después, se agregó tetraóxido de osmio al 1% por 2 horas. Se retiró el tetraóxido de osmio y se lavó la muestra con 500 μL de PBS 1X, sin resuspender el paquete celular. Seguido, se procedió a la deshidratación de la muestra mediante series con 500 μL de etanol al 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% tres veces cada uno por 10 min. Por último, se mezcló resina con etanol anhidrido, en proporciones de

25%, 50%, 75% y 100%. Cada una de las proporciones se dejó incubar por 2 horas; y en la de 100% se incubó dos veces por 24 horas.

Una vez que se terminaron las 48 horas, se procedió a montar la muestra en portaobjetos bañados ligeramente en teflón. Se extrajo el paquete celular del tubo cónico y se colocaron en los portaobjetos, se les agregó una gota de resina y se cubrió con otros portaobjetos previamente tratados con teflón, en las orillas del primer portaobjetos se colocaron dos cubreobjetos para poder formar un tipo sándwich. Se dejó polimerizar la muestra por 48 horas en un horno a 60°C. Al final, la muestra fue montada en la punta de un tipo prisma de resina, para realizar los cortes por microtomo y su posterior observación en el microscopio electrónico de transmisión (**Figura 8**).

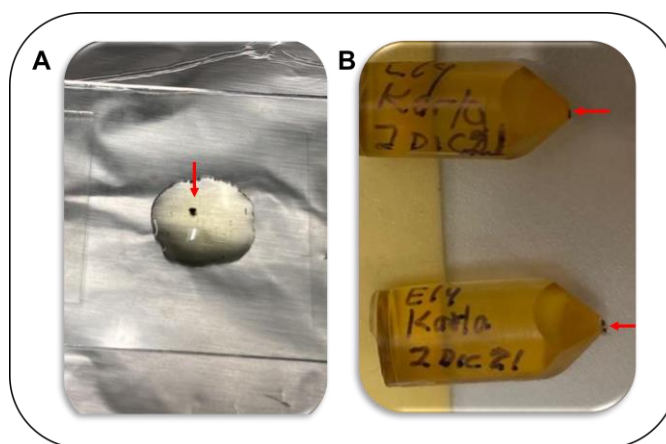


Figura 8. Procesamiento del paquete celular para obtener micrografías. En la imagen A, se ejemplifica el paquete celular sobre un portaobjeto bañado con teflón, la gota de resina y al lado dos cubreobjetos para formar un tipo sándwich con otro portaobjeto para polimerizar la muestra en el horno a 60°C. La imagen B, representa el montaje de la muestra para ser segmentada por microtomo sobre unos prismas de resina.

2.6 Medición de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas por fluorescencia

La generación de especies de oxígeno altamente reactivas en las células es constante en condiciones normales por consecuencia de la respiración aerobia, sin embargo, esta producción puede alterarse por la exposición a las nanopartículas de óxidos metálicos en las células. Una forma de medir el estrés oxidativo en las células es mediante la fluorescencia del 2',7 -diclorofluoresceína (DCF), que es producido por la

oxidación intracelular del compuesto no fluorescente diacetato de 2',7 -diclorofluoresceína (DCFDA) (Figura 8).

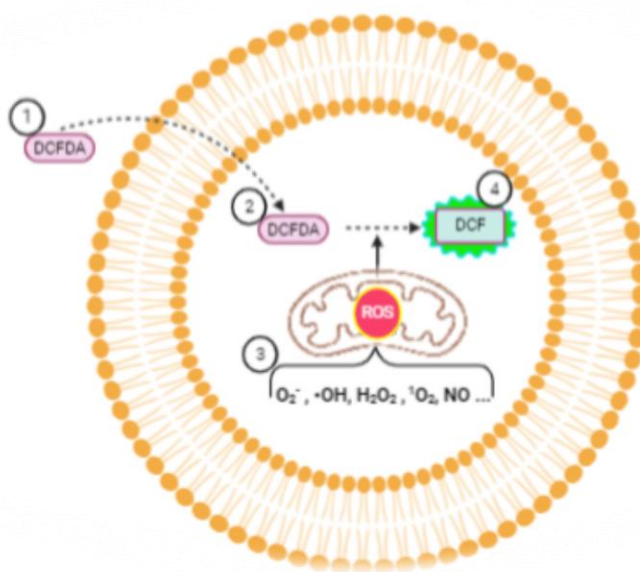


Figura 8. Mecanismo general de la formación intracelular del DCF fluorescente en las células por la acción de las especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) (Creada por la autora en BioRender.com).

Primero, se procedió a cultivar 10,000 células por pozo y triplicado en una placa de 96 pozos en fondo plano, una vez incubadas por 24h a 37°C y 5% de CO₂, se agregó las siguientes concentraciones de nanopartículas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35 y 40 µg/mL en un volumen final de 100 µL de medio completo, y se incubarán por 24h a 37°C y 5% de CO₂. Al término de la incubación se decantó el medio y se agregó 100 µL por pozo de una solución de 5 mL de reactivo DCFDA a una concentración final de 25 µM en medio sin suero fetal bovino. Nuevamente se incluyó por triplicado, un control negativo que incluye únicamente medio de cultivo. Se dejó incubar el experimento por 1 h a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó tres veces el exceso de reactivo con 200 µL de PBS 1X. Para finalizar, se agregó 100 µL de PBS 1X y la placa se incubará 15 min a 37°C y 5% de CO₂ hasta su lectura. Pasado el tiempo, se midió la fluorescencia en el espectrofluorímetro (Agilent, Cary Eclipse) utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Los datos se graficaron en porcentajes respecto a la fluorescencia del control negativo.

También, se realizó la toma de fotografías en el microscopio confocal. Para el cultivo de las células MDCK se emplearon cajas Petri de 3 cm con fondo de vidrio y la densidad celular utilizada fue de 30,000 células. En cambio, para el cultivo de las células AML-12 se utilizaron placas de cultivo de 96 pozos, fondo plano y color negro para obtener fotografías de las células AML-12 en el microscopio confocal. La tinción se efectuó con las mismas condiciones descritas anteriormente para el espectrofluorímetro. Las muestras se observaron en el microscopio confocal invertido Olympus Fluoview FV1000, usando el objetivo 20X y un zoom de apertura 3.0 para las células AML-12, y para las células MDCK se empleó un objetivo 60X. Para el fluorocromo Hoechst azul se utilizó un filtro de excitación/emisión 346/460 nm y para el fluorocromo DCFDA de 504/524 nm. Las micrografías se procesaron utilizando el software FV-10 ASW y se analizaron con el software Visor FV-10ASW.

2.7 Estimación del potencial de la membrana mitocondrial de las células AML-12 y MDCK a las diferentes concentraciones de nanopartículas ZnO y CuO

El potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) es necesario para que las funciones fisiológicas de la cadena respiratoria y la generación de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés) puedan realizarse adecuadamente. Si el potencial de la membrana mitocondrial decrementa, la energía requerida para el funcionamiento correcto de las células se agota y posteriormente se presenta la muerte de esta. Es crucial evaluar el potencial de la membrana mitocondrial para conocer si hay disfunción mitocondrial y si el estrés oxidante influye en ello, esto proporciona pistas sobre el desbalance del estado fisiológico de la célula y la función mitocondrial que impactan en la viabilidad celular.

Para estimar el $\Delta\Psi$ se utilizó el fluorocromo JC1 (Yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolo-carbocianina), el cual es un fluorocromo catiónico lipófilo de carbocianina catiónica que emite fluorescencia roja y verde. Este fluorocromo es capaz de permeabilizar a las mitocondrias y cambiar de fluorescencia roja a verde con relación al aumento del $\Delta\Psi$. Cuando las células están viables, tienen un $\Delta\Psi$ alto y la fluorescencia es de color rojo, en cambio, si las células están dañadas o apoptóticas, tienen un $\Delta\Psi$ bajo y la fluorescencia es verde. Aunque no es específico de la membrana mitocondrial, ya que también marca el $\Delta\Psi$ de la membrana plásmica, se ha utilizado para tener una aproximación del estado de la membrana mitocondrial por su optimización en las longitudes de onda de emisión y excitación (Perelman et al., 2012).

El potencial de la membrana mitocondrial fue estudiado por citometría de flujo y el cultivo de las células AML-12 y MDCK se realizó de la misma forma que en los ensayos anteriores de viabilidad celular y medición de ROS, se evaluaron las concentraciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, y 40 $\mu\text{g/mL}$ de NPs ZnO y CuO. Después, de la exposición aguda a las NPs ZnO y CuO se tripsinizaron las células y se transfirieron a tubos cónicos de 1.5 mL, se lavaron dos veces con 500 μL de PBS 1X y se procedió a la tinción de las muestras a una concentración de 10 μM de JC1 en medio de cultivo sin suero fetal bovino durante 30 min en una atmosfera de 5% CO_2 y 37°C. Transcurrido el tiempo, se retiró el exceso de fluorocromo lavando dos veces con 500 μL de PBS 1X. Las células se resuspendieron en 150 μL de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo Attune Nxt. Se procesaron duplicados para cada concentración de NPS de ZnO y CuO.

Para los ensayos por citometría se empleó un control sin tinción y un control teñido sin tratamiento para hacer la comparación con las muestras tratadas. Se utilizaron los canales BL-1 para la fluorescencia verde y BL-3 para la fluorescencia roja. Se adquirieron 150 μL de muestra por tratamiento (**Figura 9**).

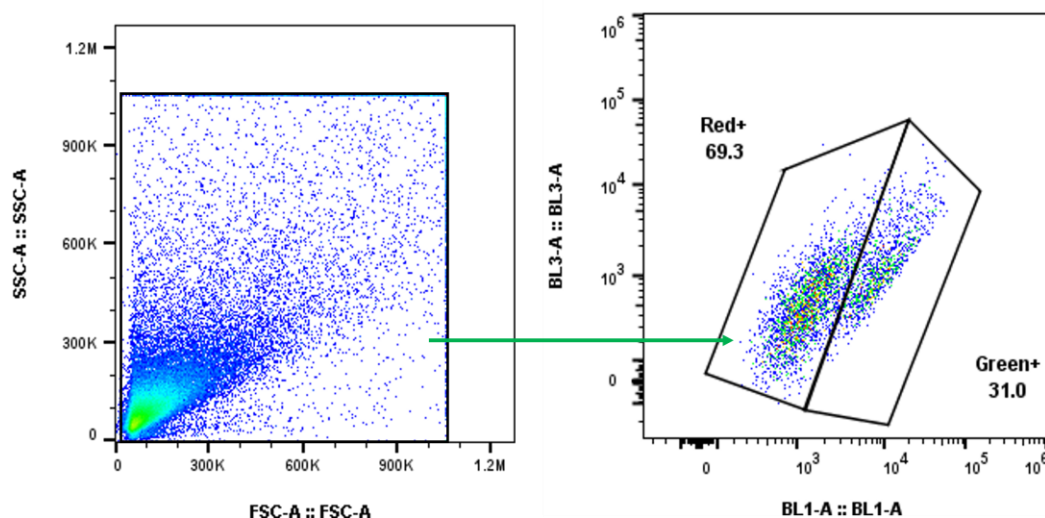


Figura 9. Estrategia de análisis para la estimación del potencial de la membrana mitocondrial de las células AML-12 y MDCK después de ser expuestas de forma aguda a las NPsZnO y NPsCuO. El primer grafico de puntos indica la población celular de interés y en el segundo gráfico se clasifica la población en dos grupos las células que son positivas para la fluorescencia roja (BL3-A: Red+) y las que son positivas para fluorescencia verde (BL1-A: Green+). Los porcentajes obtenidos a través de estos gráficos se presentaron en graficas de barras.

Además, se tomaron fotografías por microscopia confocal, siendo la única variante el proceso de cultivo, ya que para el cultivo de las células MDCK se emplearon cajas Petri de 3 cm y la densidad celular utilizada fue de 30,000 células. También, que la placa de cultivo de 96 pozos fondo plano fue de color negro para

obtener fotografías de las células AML-12 en el microscopio confocal. Después de cultivar a las células por 24 h, se lavaron con 500 μ L de PBS 1X por pozo dos veces y se adicionarán 100 μ L del fluorocromo JC1 por pozo y 300 μ L para las placas Petri de 3 cm a una concentración de 10 μ M. Finalmente, se incubaron por 30 min a 37°C y 5% de CO₂.

La placa de 96 pozos con las células AML-12 y las cajas Petri con las células MDCK teñidas con JC-1 se examinaron en el microscopio confocal invertido Olympus Fluoview FV1000, usando el objetivo 20X para células AML-12 y 60X para las MDCK y se utilizó un filtro de detección a 540/570 nm para las células sanas y 485/535 nm para las células apoptóticas o dañadas. Las fotografías se procesaron utilizando el software FV-10 ASW y se analizaron con el software Visor FV-10ASW. Las micrografías obtenidas se compararon de acuerdo con el color y la intensidad de fluorescencia de las muestras tratadas con NPS contra el control de células sin tratamiento.

2.8 Efecto de las diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO y CuO en el ciclo celular de las células AML-12 y MDCK

El ciclo celular es el proceso por el cual las células se duplican y está conformado por cuatro estadios que reciben el nombre de G0/G1, S, G2 y M. El estadio G1, es donde las células se preparan para dividirse o bien pueden permanecer sin dividirse por periodos largos hasta que reciben una señal específica (G0). El estadio S, es cuando la célula sintetiza una copia de todo su ADN y después entra en el estadio G2, en el que se condensan los cromosomas y se organiza el material genético para dividirse. Y, por último, la fase M, donde tiene lugar la mitosis en la que se reparte la información genética en dos células hijas. Estudiar el impacto de las NPs de ZnO y CuO en los estadios del ciclo celular a diferentes concentraciones, permite conocer si las NPs son capaces de generar cambios en la proporción de células que se encuentran en los diferentes estadios con respecto a las células no tratadas con NPs. Por lo tanto, este ensayo es fundamental para conocer los efectos que pueden ocasionar las NPs y su relación en la reducción de la viabilidad celular.

Para evaluar si existen alteraciones en los estadios del ciclo celular de las células AML-12 y MDCK con una exposición aguda (24 h) a NPsZnO y NPsCuO, se realizó una tinción con PI, el cual es un reactivo que se intercala en el ADN. El cultivo celular nuevamente se realizó de la misma forma que en los ensayos anteriores y se emplearon las mismas concentraciones de NPsZnO y NPsCuO. Una vez que las células

fueron recuperadas del cultivo y lavadas con PBS 1X se realizó una permeabilización de las células con etanol al 70% con grado de biología molecular durante 1 h a 4°C. Terminado el tiempo se lavaron las células dos veces con 1mL de PBS 1X. Se preparó una solución de 6 mL que contenía 100 µg/mL de RNasa y 50 µg/mL de PI y de esta solución se agregaron 200 µL a cada muestra. Las muestras se mantuvieron en incubación por 30 min a 37°C y 5% de CO₂. La RNasa, es una ribonucleasa que se usó para hidrolizar al ARN y evitar que la señal tuviera influencia en los resultados, ya que, el PI también se intercala en el ARN.

Después, se procedió a medir la fluorescencia del PI, usando el láser azul a 488nm en el citómetro de flujo (Attune NxT) y el canal BL-3, la adquisición fue por un volumen de 200 µL para todas las muestras (**Figura 10**). Los datos recabados fueron analizados en FlowJo y se presentarán en histogramas y graficas de barra con porcentajes.

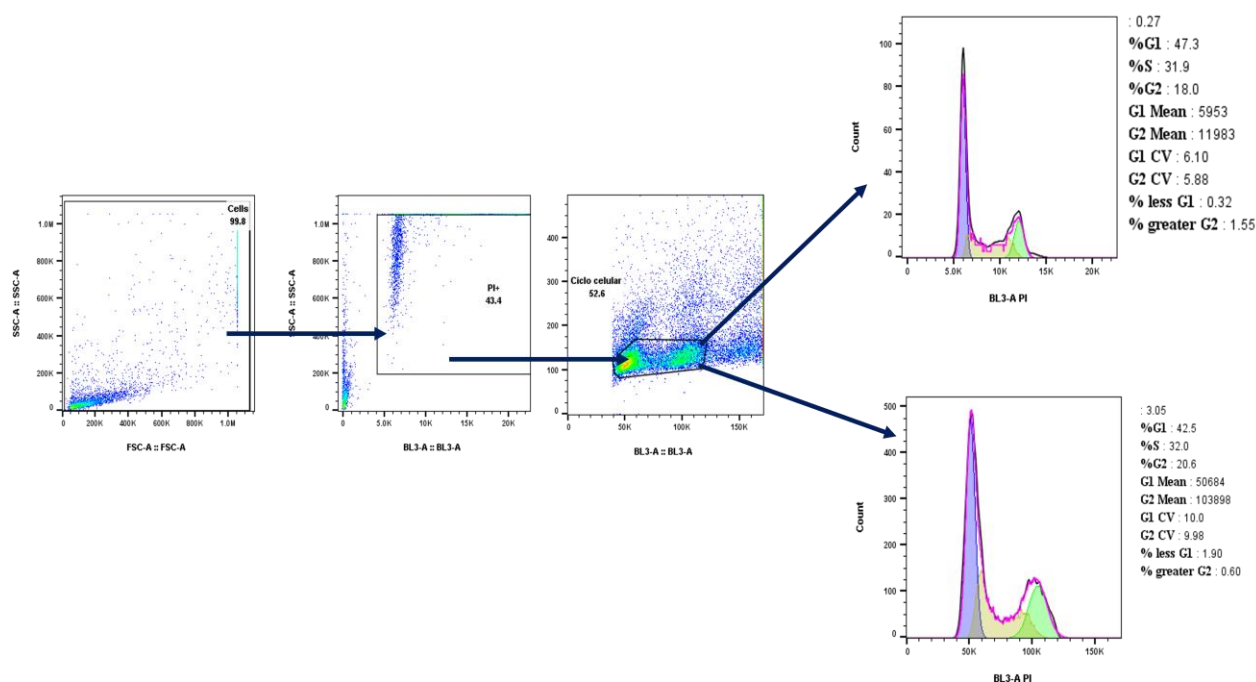


Figura 10. Estrategia de análisis para evaluar el ciclo celular de las células AML-12 y MDCK expuestas de forma aguda a las NPsZnO y NPsCuO. En el primer gráfico se seleccionan los eventos únicos (singlets), después se grafica complejidad interna (SSC-A) vs yoduro de propidio (BL3-A) para obtener la población celular positiva a este fluorocromo. Finalmente, se obtiene un histograma para representar el ciclo celular, ubicando en el eje de las x al yoduro de propidio (BL3-A) y en el eje y el conteo celular normalizado (Creada por la autora en Flow Jo).

2. 9 Análisis estadístico

Para la interpretación de los resultados de citometría de flujo, se empleó el software FlowJo. Para el análisis de variancia multifactorial, la variable de respuesta viabilidad celular fue analizada mediante un Modelo Lineal Generalizado-no lineal con un diseño de ANOVA de factores donde el primer factor correspondió a los catorce niveles de concentración asignada de las nanopartículas, el segundo factor fue la línea celular con dos niveles (MDCK y AML-12), el tercer factor fue el tratamiento con dos niveles (NPsZnO y NPsCuO), y su respectiva triple interacción de los factores, al cual se le realizó un ajuste de distribución de error normal con una transformación Box-Cox debido a que no cumplía con los supuestos de la distribución y de la homogeneidad de varianzas (Crawley,1993; Bolker *et al.*, 2009. Los análisis estadísticos se realizaron en el paquete Prism-GraphPad.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas es requerimiento indispensable para poder entender su comportamiento al exponer las células a diferentes concentraciones de éstas, además, permite conocer la estabilidad de las nanopartículas en medio acuoso y, por tanto, inferir la estabilidad que tendrán en el medio de cultivo y la interacción de su superficie química con las proteínas u otras moléculas presentes en el medio de cultivo. Primero, se procedió a determinar el tamaño promedio y el potencial Z de las NPsZnO y CuO mediante la técnica de DLS y por TEM.

La distribución del tamaño para las NPsZnO es heterogénea, por lo que se presentaron dos picos de intensidad (%) a 112.1 nm y 430.9 nm de diámetro y en la gráfica de número (%) un pico de 112.1 nm que hace relevancia a un ajuste acumulativo (**Figura 11**), el segundo pico de 430.9 nm ya no aparece porque la contribución al ser tan pequeña (<0,001%) ya no se muestra. El potencial Z para estas mismas NPs es de -24.1mV respecto a los recuentos totales (**Figura 12**).

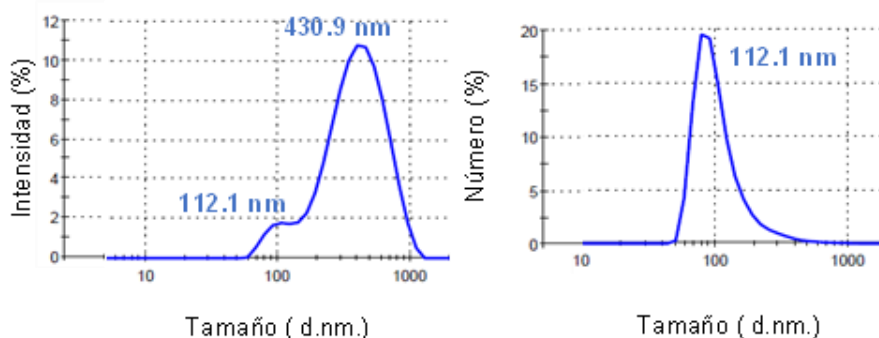


Figura 11. Distribución de tamaño por intensidad % y numero % de NPsZnO en 1 mL agua miliQ, por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

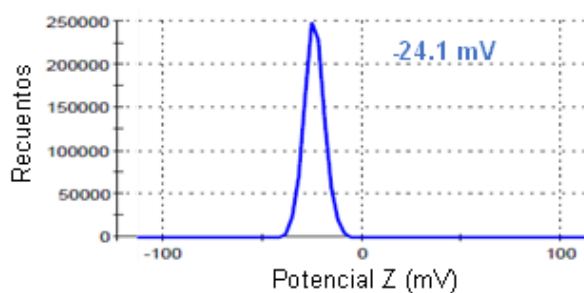


Figura 12. Potencial Z para las NPsZnO, por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

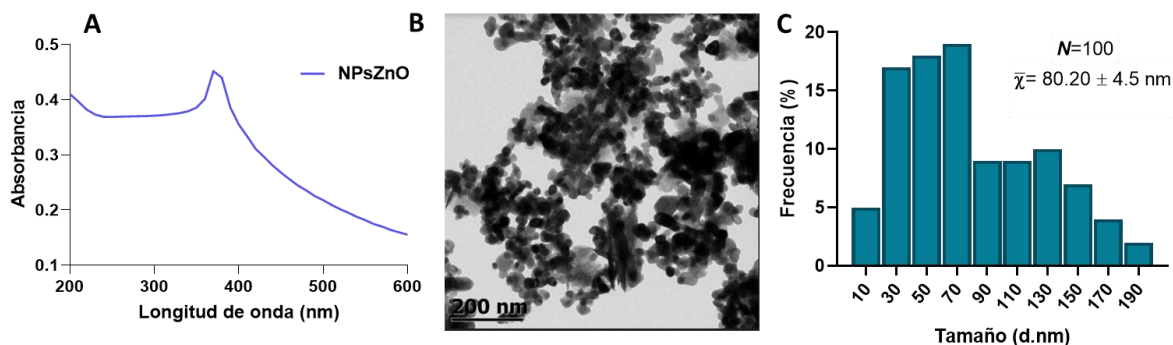


Figura 13. Frecuencia de resonancia del plasmón de la superficie (A), micrografía e histograma de la distribución del tamaño de las nanopartículas ZnO por TEM (B-C).

Por otro lado, en la **Figura 13-A**, se registró el pico de absorbancia para la frecuencia de resonancia del plasmón de la superficie de las nanopartículas ZnO a los 360 nm. Además, la distribución del tamaño de NPsZnO obtenido por TEM fue heterogénea y se observan formación de aglomerados (**Figura 13-B**). El tamaño promedio obtenido por TEM fue de 80 ± 4.5 nm, con un mínimo de 7.2 y un máximo de 188.5 nm (**Figura 13-C**).

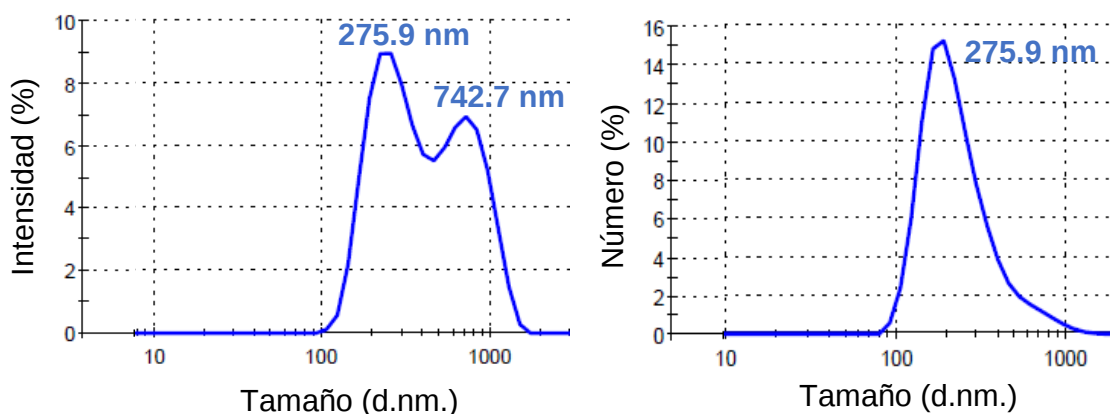


Figura 14. Distribución de tamaño por intensidad % y numero % de NPsCuO en 1 mL agua miliQ, por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

La distribución de tamaño para las NPsCuO no es homogénea, al graficar los resultados como el porcentaje de la intensidad, se observan dos picos, uno a 275.9 nm y uno a 742.7 nm, si se mide el tamaño de las NPs

de acuerdo con el número (%) se observa la presencia de un pico a 275.9 nm (**Figura 14**); además de ello, como se observa en la **Figura 15**, el valor del potencial Z que se registró es de -20.0 mV.

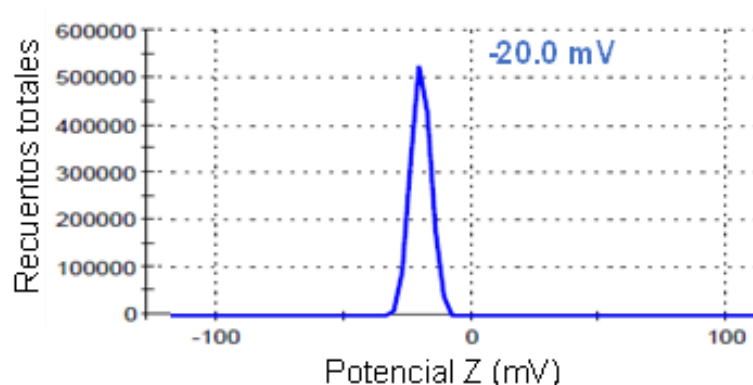


Figura 15. Potencial Z para las NPsCuO, por la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

También, se realizó la medición de la banda de absorbancia de las NPsCuO, con un pico registrado entre los 350 a los 400 nm teniendo el valor mediano a los 375 nm (**Figura 16**). La **Figura 16-B** ejemplifica una de las micrografías obtenidas por TEM y muestra una distribución no homogénea para las NPsCuO con la formación de aglomerados de gran tamaño. Por otra parte, el tamaño promedio arrojado por la distribución de los diámetros de las NPsCuO fue de 84.6 ± 6.4 nm, con un tamaño mínimo de 17.15 y un máximo de 237.2 nm (**Figura 16-C**).

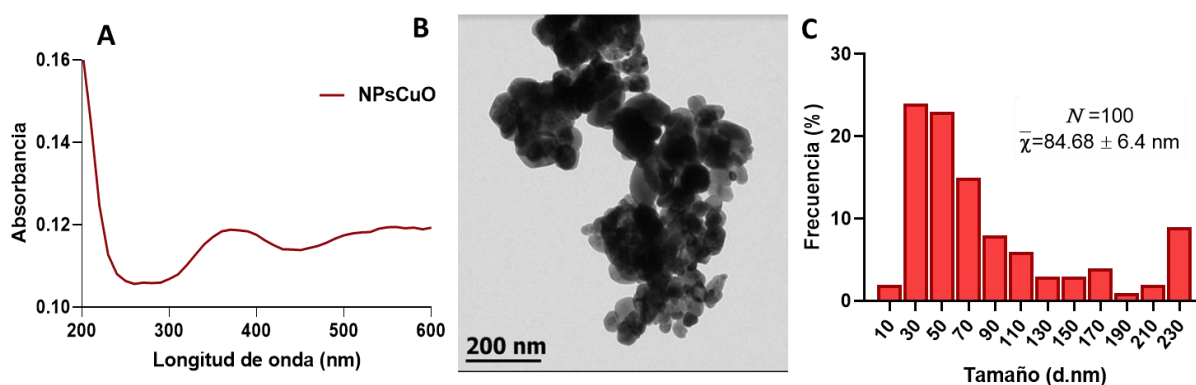


Figura 16. Frecuencia de resonancia del plasmón de la superficie (A), micrografía e histograma de la distribución del tamaño para las nanopartículas CuO por TEM (B-C).

3.2 Viabilidad de las células expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxidos metálicos

Debido a la exposición aguda (24 h) de las células a nanopartículas de óxidos metálicos, es necesario evaluar la viabilidad de las células, para conocer si las diferentes concentraciones de nanopartículas inducen daño irreversible en ellas, o bien, provocan un daño relevante que influya en su metabolismo normal y, por lo tanto, ocasione alteraciones en sus procesos biológicos normales.

Por lo anterior, se graficó el porcentaje de la viabilidad de las células de riñón MDCK expuestas por 24h a diferentes concentraciones de NPs de ZnO y CuO. En la **Figura 17**, la línea azul, indica la viabilidad de las células MDCK expuestas a las NPsZnO; es posible observar que a concentraciones de entre 8 a 14 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO, la viabilidad de las células es superior al 100%, siendo el valor más alto de 126% en la concentración de 14 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO. Sin embargo, el efecto citotóxico de las NPsZnO es evidente a partir de las concentraciones de 16 a 40 $\mu\text{g/mL}$, en las que se observa un efecto tóxico dependiente de la concentración. En cambio, la viabilidad de las células MDCK expuestas durante 24 h a las NPsCuO está representada por la línea roja de la misma figura, y se observa que la viabilidad de las células MDCK se mantiene entre el 95 y 100% para las concentraciones de 2-8 $\mu\text{g/mL}$ y a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ el efecto citotóxico es perceptible, aunque a los 20 $\mu\text{g/mL}$ hay un ligero aumento a 68%, enseguida, se presentan nuevamente porcentajes de viabilidad por abajo del 50% que se mantienen similares.

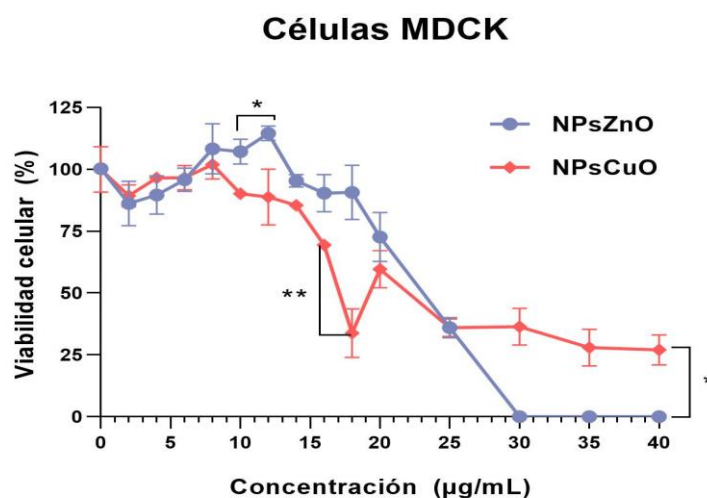


Figura 17. Evaluación por el ensayo de MTT de la viabilidad de las células de riñón (MDCK) expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) y cobre (NPsCuO). Los puntos indican los valores promedio $\pm$ la desviación estándar (SD). Los puntos graficados indican los valores promedio $\pm$ SD de 10, 000 células en triplicado para tres experimentos independientes.

De acuerdo con lo anterior, en la **Figura 18** se observa que la viabilidad de las células AML-12 depende de la concentración de las NPsZnO y NPsCuO, a las que fueron expuestas durante 24 h. Para este caso la viabilidad celular comienza a disminuir a los 12 $\mu\text{g/mL}$ para los dos tipos de nanopartículas con porcentajes inferiores al 75%. La citotoxicidad de las NPsZnO, representada por la línea color azul, muestra una viabilidad celular dependiente de la concentración con una meseta entre las concentraciones 16-20 $\mu\text{g/mL}$, posterior a estas, hay un decaimiento claro de la viabilidad celular. Sin embargo, para las NPsCuO (línea roja) la tendencia es dependiente de la concentración sin la presencia de meseta y con viabilidad celular superior al 25% entre las concentraciones 18- 30 $\mu\text{g/mL}$.

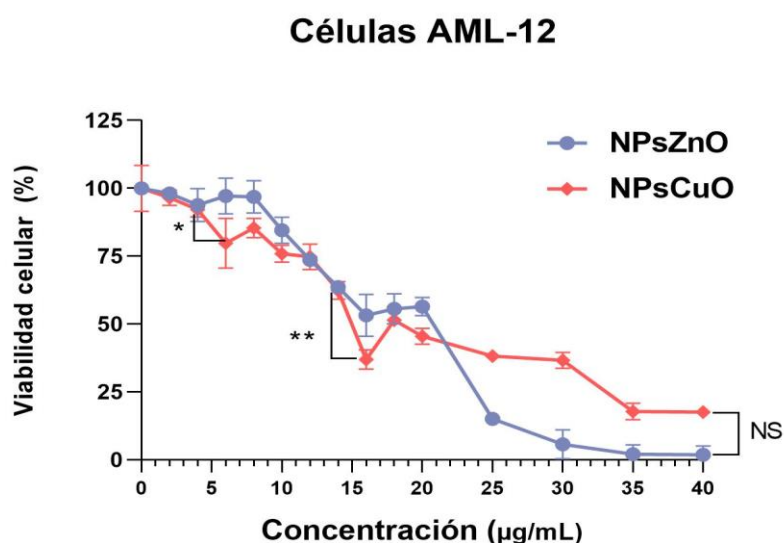


Figura 18. Evaluación por el ensayo de MTT de la viabilidad de las células de hígado (AML-12) expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc (NPsZnO) y cobre (NPsCuO). Los puntos graficados indican los valores promedio $\pm$ SD de 10, 000 células en triplicado para tres experimentos independientes.

Las concentraciones inhibitorias de NPs para el 50% de la población celular (IC_{50}), es de 20 y 23 $\mu\text{g/mL}$ de NPs ZnO, siendo el valor menor en las células AML-12 y el mayor para las células MDCK. Para las NPs de CuO la IC_{50} es de 16 $\mu\text{g/mL}$ para las células MDCK y 18 $\mu\text{g/mL}$ en las AML-12 (**Tabla 3**).

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias de NPs para el 50% de la población celular (IC_{50}).

Línea celular	NPs	IC_{50}	R^2	Regresión no lineal
MDCK	ZnO	23.14	0.95	Curva concentración-respuesta de cuatro parámetros (4PL)
	CuO	16.29	0.90	
AML-12	ZnO	20.10	0.96	
	CuO	18.65	0.93	

El análisis de variancia multifactorial, con una $R^2 = 0.99$, indicó que los valores promedio de la viabilidad de las células AML-12 y MDCK no son diferentes al comparar entre los dos tratamientos de NPs ($P = 0.0420$). Pero al comparar la respuesta de las células en cada una de las concentraciones se obtuvo que hay diferencias significativas ($P < 0.00001$). Además, la interacción de los tres factores (concentración-línea celular-tratamiento) del ANOVA aportó contraste entre los valores promedio de registro de viabilidad celular ($P < 0.0001$).

3.2.1 Viabilidad de las células del sistema excretor expuestas a NPs de ZnO y CuO con iones quelados y con sales de zinc y cobre

Para conocer el efecto sobre la viabilidad celular ocasionado tanto por las nanopartículas como por los iones zinc o cobre, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad celular al exponer de forma aguda las células MDCK y AML-12 a las distintas concentraciones de NPs de ZnO y CuO con iones quelados mediante EDTA y se compararon con los porcentajes de viabilidad celular al tratar las células con $ZnCl_2$ y $CuCl_2$.

En la **Figura 19-A**, se aprecia que las células MDCK expuestas a las NPsZnO con iones quelados mantienen su viabilidad por arriba del 90% en todas las concentraciones estudiadas, siendo distinta a la que se presenta con las NPsZnO sin quelación de iones ($P < 0.0001$), en cambio, la viabilidad de las células MDCK se reduce por debajo del 75% a partir de los 8 $\mu g/mL$ cuando son tratadas con $ZnCl_2$. Por otro lado, en la **Figura 19-B**, las células AML-12 reducen su viabilidad de manera similar al ser tratadas de forma aguda con NPsZnO sin quelación de iones y el $ZnCl_2$, con excepción en las concentraciones de 18 y 20 $\mu g/mL$ del $ZnCl_2$, ya que los porcentajes de viabilidad son menores al compararlos con los porcentajes de las mismas concentraciones de NPsZnO sin quelación de iones ($P < 0.0001$). En cuanto a la viabilidad de las células AML-

12 expuestas a las NPsZnO +EDTA 1 mM no presentaron reducción en los porcentajes de viabilidad y se mantuvieron por arriba del 90%.

También, en la **Figura 19-C**, se muestra que los porcentajes de viabilidad de las células MDCK al ser tratadas con NPsCuO+ EDTA 1 mM se mantienen por arriba del 75% y al ser tratadas con CuCl₂ se reduce la viabilidad conforme aumenta la concentración. Se asume que no hay diferencias claras entre el tratamiento de NPsCuO sin quelar, los iones y CuCl₂, ya que el valor de $P < 0.2$ se atribuye a las concentraciones de 18 y 20 $\mu\text{g/mL}$ que presentan diferencias claras ($P < 0.0001$). Por el contrario, en la **Figura 19-D**, se observa que las células AML-12 expuestas por 24 horas a las NPsCuO y NPsCuO+EDTA 1mM, son semejantes en la reducción de la viabilidad celular dependiente de la concentración ($P = 0.1$) y, el CuCl₂ no redujo la viabilidad de las células por abajo del 75%.

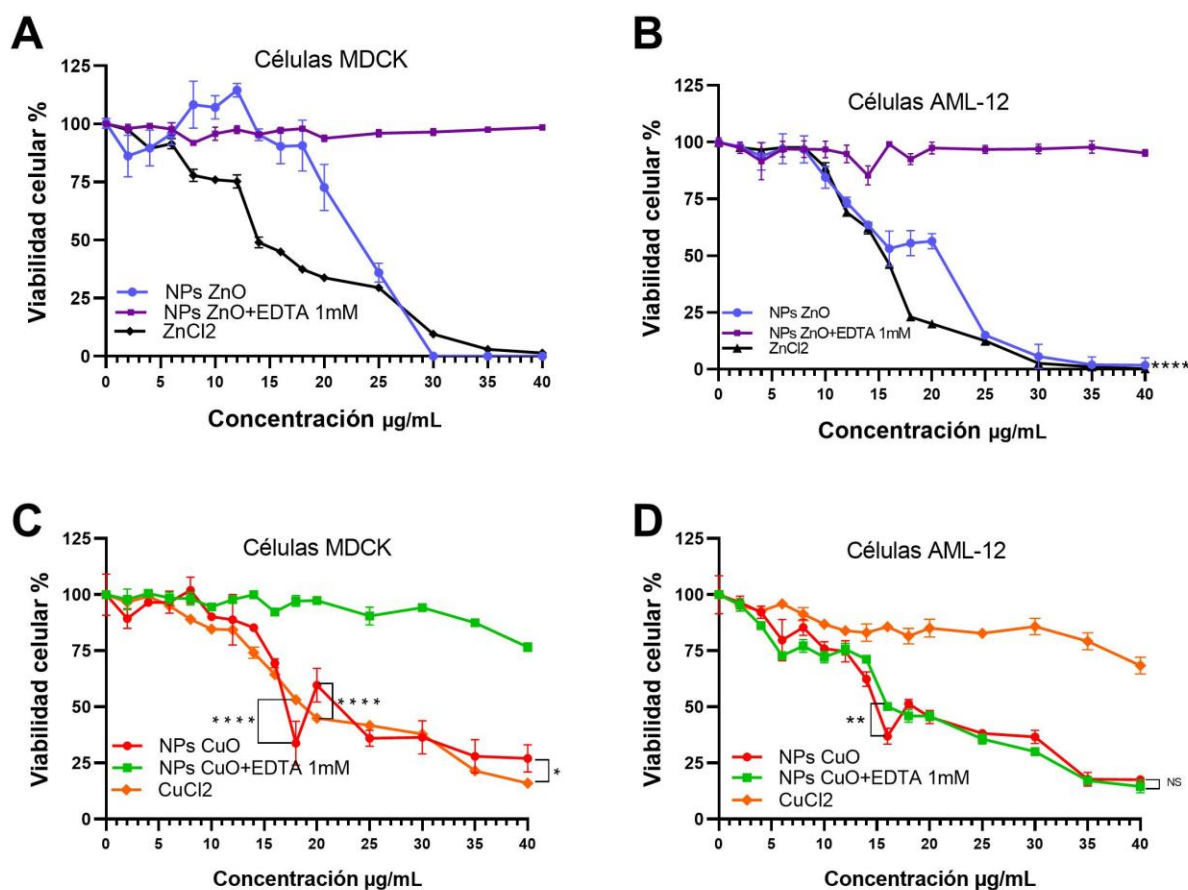


Figura 19. Efecto de los iones zinc y cobre en la viabilidad de las células MDCK y AML-12 con una exposición aguda. A-B, células MDCK y AML-12 expuestas por 24 horas a NPsZnO, NPsZnO+EDTA 1 mM y ZnCl₂. C-D, células MDCK y AML-12 expuestas por 24 horas a NPsCuO, NPsCuO+EDTA 1 mM y CuCl₂. Los resultados son expresados con las medias $\pm$ SD de 10, 000 células en triplicado para tres experimentos independientes. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), **** ($P < 0.0001$) indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

3.3 Efecto en la morfología de las células expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxidos metálicos

La morfología de las células es una variable observable necesaria para comparar los cambios morfológicos que presentan las células que han sido expuestas de forma aguda a diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO y relacionar tales cambios con el efecto citotóxico.

Como se puede apreciar en la **Figura 20**, a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO, la morfología de las células MDCK comienza a modificarse, es posible observar que las células son más pequeñas y han perdido su morfología típica poligonal, siendo ahora más redondas. En comparación con el control, la densidad de la confluencia celular es menor a partir del tratamiento con 18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO, y en algunas secciones es posible observar células con filopodios más largos, aunque en general el tamaño de las células disminuye y tienen una morfología redondeada. Además, las células de riñón que han sido expuestas a concentraciones de 25 y 35 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO, tienen una densidad celular y un tamaño menor, la morfología de las células es redonda, y es posible observar que las células tienden a aglomerarse en forma de racimos opacos en comparación con las células del control.

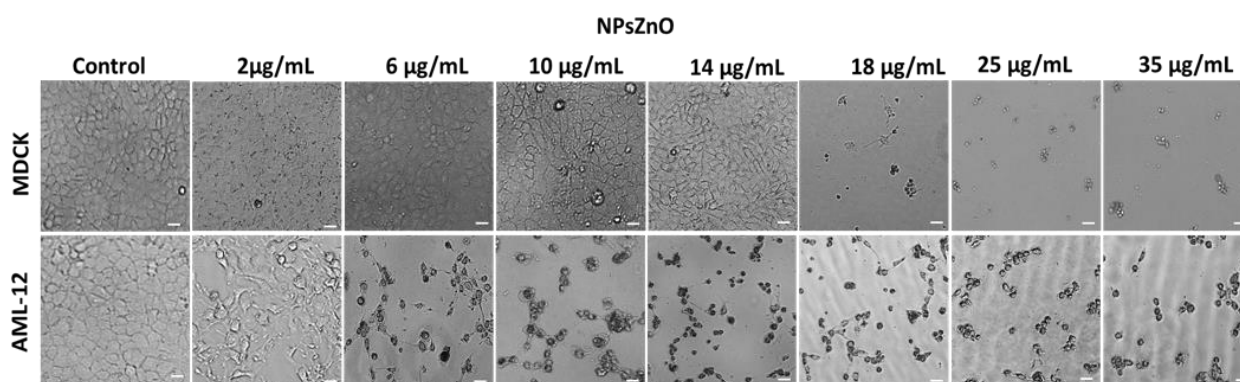


Figura 20. Alteración en la morfología de las células MDCK y AML-12 al ser tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de NPsZnO. La barra blanca indica la escala de medición de 50 μm .

La alteración en la morfología de las células AML-12 que han sido expuestas a NPsZnO se registró en la **Figura 20**, donde se observa que a partir de la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ las células se encuentran más separadas una de otras por la ruptura de las uniones estrechas que existen entre ellas al compararlas con el control (C-), la forma de las células cambio siendo ahora más alargadas. La densidad celular comienza a disminuir a partir de los 6 $\mu\text{g/mL}$, también se observan en algunas células proyecciones citoplasmáticas

largas y delgadas. Y desde la concentración de 10-35 $\mu\text{g/mL}$, las células son ovaladas y pequeñas a diferencia de las células control. Es posible observar que aún en las concentraciones altas ($>14 \mu\text{g/mL}$), hay grupos de células con uniones mediante filipodios.

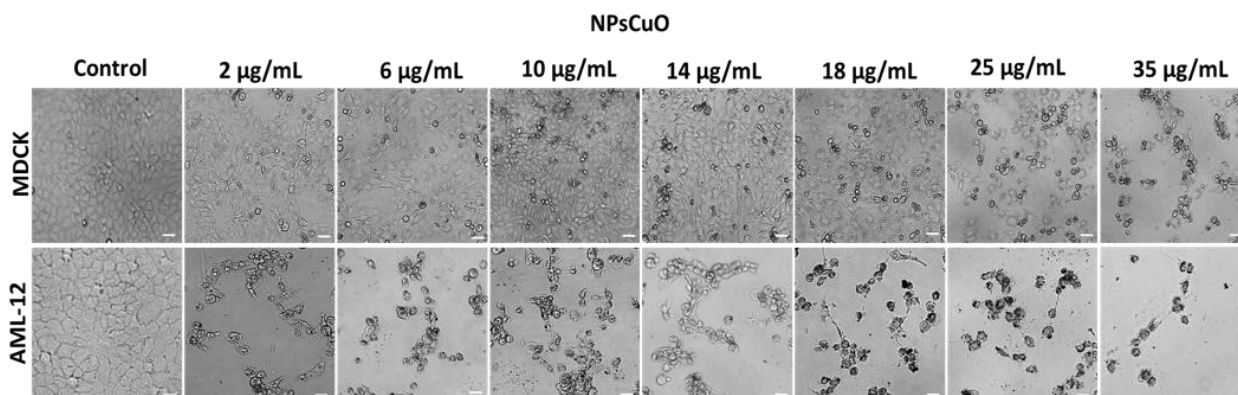


Figura 21. Alteración en la morfología de las células MDCK y AML-12 al ser tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de NPsZnO. La barra blanca indica la escala de medición de 50 μm .

Para la exposición aguda de las células MDCK a las NPsCuO, se percibe que causaron daño a la estructura de la membrana, en la **Figura 21** se muestra que a partir de la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ el cambio en la morfología de las células es evidente, perdiendo la forma poligonal y adquiriendo una ovalada, también se observa la formación de vacuolas, aumento del tamaño de las células y la densidad celular comienza a disminuir a partir de la concentración de 18 $\mu\text{g/mL}$. Es importante agregar que se observan cúmulos o puntos grisáceos sobre las células desde los 6 $\mu\text{g/mL}$ a 35 $\mu\text{g/mL}$ y las células MDCK tendieron a rodear estos cúmulos y a tener mayor formación de vacuolas en el citoplasma.

Por otro lado, las células AML-12 al ser expuestas a las diferentes concentraciones de NPsCuO por 24 h, sufrieron cambios en su forma y densidad celular. Estos hallazgos se pueden observar en la **Figura 21**, la densidad celular es menor a partir de la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con el control. Además, la forma de las células es redonda y con menor tamaño a los 6 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO. Otra característica es la presencia de puntos grisáceos o cúmulos, también, las células son de forma irregular y de color negro grisáceo a diferencia de las células control a partir de los 6-35 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO. Es posible observar que aún en las concentraciones altas ($>14 \mu\text{g/mL}$), hay grupos de células con uniones mediante filopodios.

3.4 Tipo de muerte celular causado por la exposición aguda de células a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxidos metálicos

La muerte celular es un proceso por el cual la célula detiene sus funciones vitales, que puede ser debida a múltiples factores como cambios morfológicos, estrés oxidativo, daño a la membrana o por sustancias químicas externas. La importancia de evaluar la muerte celular ayuda a conocer qué tipo de muerte se está generando a partir de la exposición durante 24 horas de nanopartículas de óxidos metálicos, ya sea una muerte por apoptosis o necrosis. Y con esto inferir si las nanopartículas son las responsables directas de la muerte de las células, o bien, los daños que estas ocasionan en su morfología, membrana o estado metabólico la llevan a desencadenar una cascada de señalización bioquímica que programan su muerte. El tipo de muerte celular inducido por la exposición de las células de riñón e hígado a las diferentes concentraciones de NPs, fue medido por citometría de flujo.

En cuanto a las células de riñón MDCK expuestas a las concentraciones de 2-40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO , presentan una tendencia que indica que a mayor concentración de NPs, mayor muerte celular por apoptosis temprana como se observa en la **Figura 22**, en ese sentido, la cantidad de células viables al incrementar la concentración de NPs es menor. Por lo que existe un claro efecto de muerte celular por apoptosis temprana que es directamente proporcional a la concentración de NPsZnO .

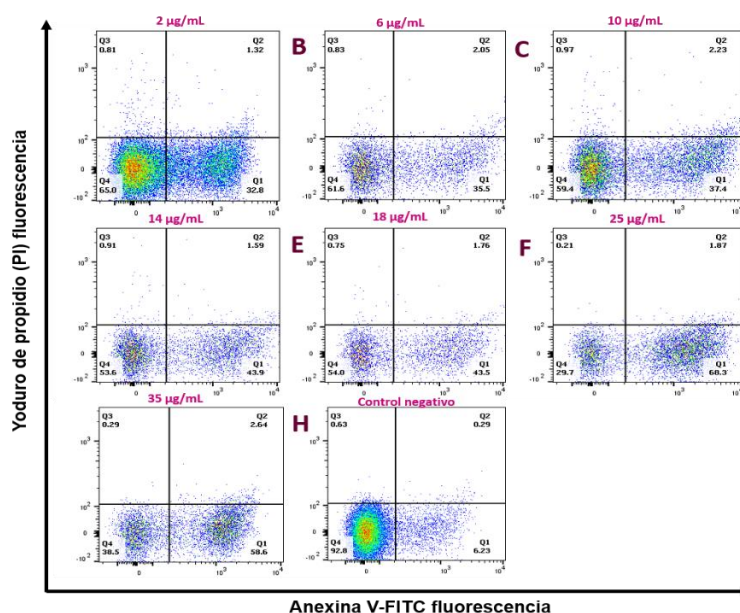


Figura 22. Tipo de muerte para las células de riñón (MDCK) expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de NPsZnO . Tinción con yoduro de propidio (PI) y anexina V-FITC mediante cuantificación de fluorescencia por citometría de flujo. Los cuadrantes indican poblaciones celulares en; Q1: apoptosis temprana, Q2: apoptosis tardía, Q3: necrosis y Q4: viables y/o células con otro tipo de muerte.

También, las células MDCK presentan de un 32.8 a 68.3% de células en apoptosis temprana. Es importante señalar, que el porcentaje de apoptosis tardía parece ser independiente de la concentración de NPsZnO utilizadas, ya que en casi todas las concentraciones de NPs el porcentaje de células en apoptosis tardía es menor al 3%, y lo mismo sucede para el caso de la necrosis en la que se registran porcentajes inferiores a 1% (**Figura 23**).

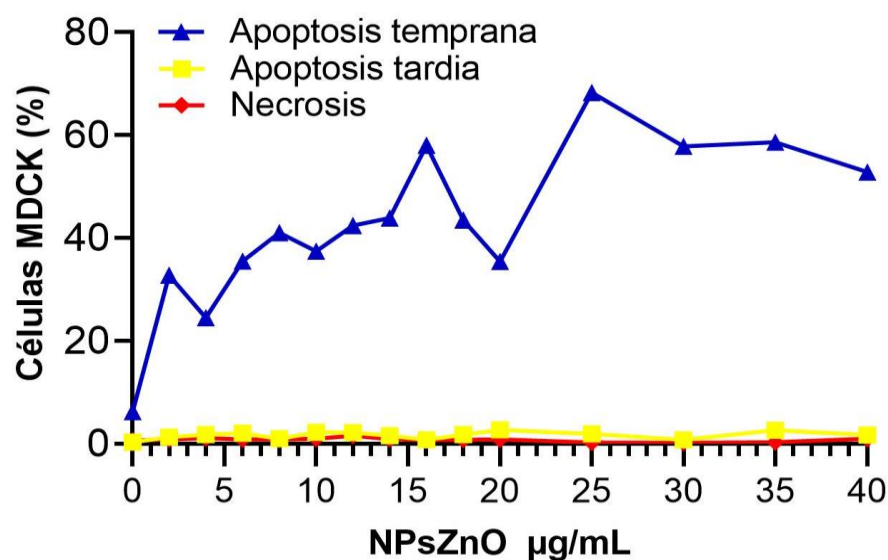


Figura 23. Porcentaje de células en los tipos de muerte celular para las células MDCK a las diferentes concentraciones de NPsZnO. Los porcentajes graficados fueron obtenidos de los gráficos de citometría de flujo.

En cambio, para la exposición de NPsCuO la tendencia de las células agruparse en la población de apoptosis temprana es menor en cuanto a porcentajes, del mismo modo, que no obtiene mayoría para el tipo de muerte por apoptosis tardía o necrosis. La obtención de los datos de citometría se efectuó de la misma forma que para las NPsZnO. En la **Figura 24**, pueden visualizarse los porcentajes de las poblaciones celulares para cada tipo de muerte celular y el de las células viables.

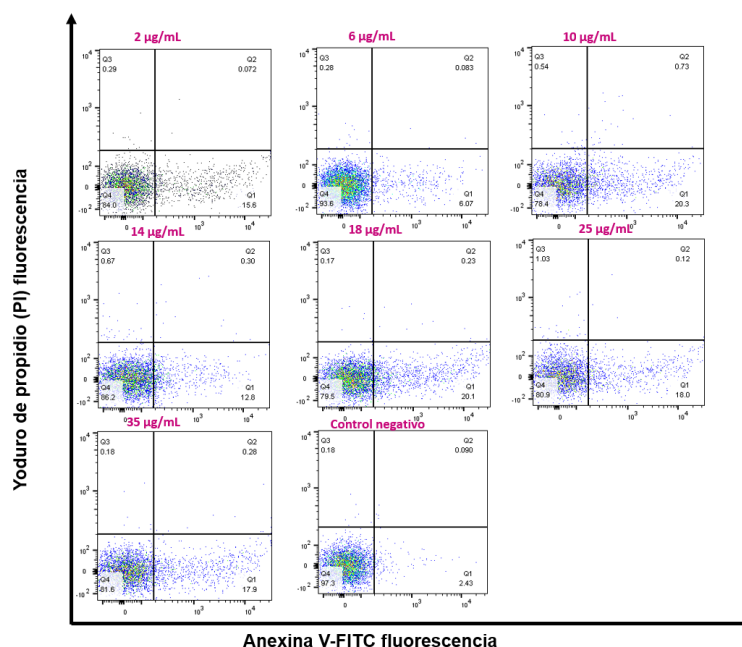


Figura 24. Tipo de muerte para las células MDCK para las concentraciones de NPsCuO. Tinción con yoduro de propidio y anexina V-FITC mediante cuantificación de fluorescencia por citometría de flujo.

Por lo que, el tipo de muerte para las células MDCK expuestas a las diferentes concentraciones de NPsCuO, es la apoptosis temprana con valores entre 15-20.3% al compararlas con el control sin tratar hay diferencias claras ($P < 0.0001$). La respuesta en apoptosis temprana se agrupa en tres grupos de intervalos de concentraciones 2-14, 16-20 y 25-40 µg/mL, sin diferencias claras entre ellas. La apoptosis tardía y la necrosis alcanzaron porcentajes menores a 1% (**Figura 25**).

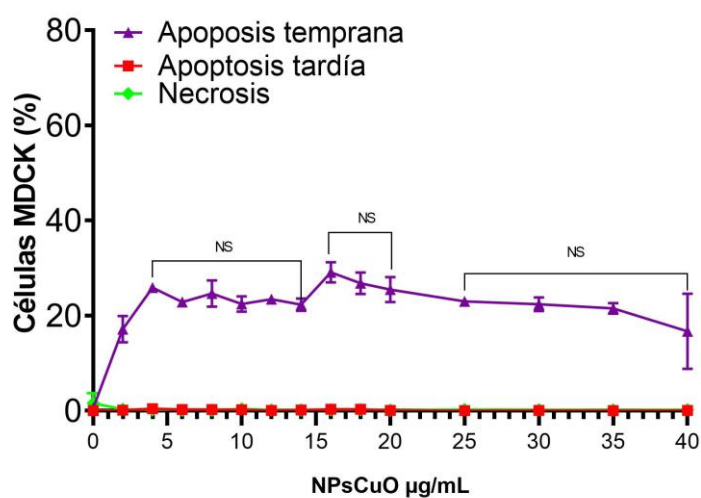


Figura 25. Porcentaje de células en los tipos de muerte celular para las células MDCK a las diferentes concentraciones de NPsCuO. Los porcentajes graficados fueron obtenidos de los gráficos de citometría de flujo. Los resultados son expresados con las medias $\pm$ SD de 60,000 células en duplicado para dos experimentos independientes. ^{NS}($P > 0.05$) hace referencia a que no existen diferencias significativas.

Dado que los porcentajes de muerte por apoptosis/necrosis obtenidos en el ensayo anterior para las células de riñón MDCK tratadas de forma aguda con NPsCuO son menores al 25%, se decidió estudiar el tipo de muerte celular dependiente de autofagia.

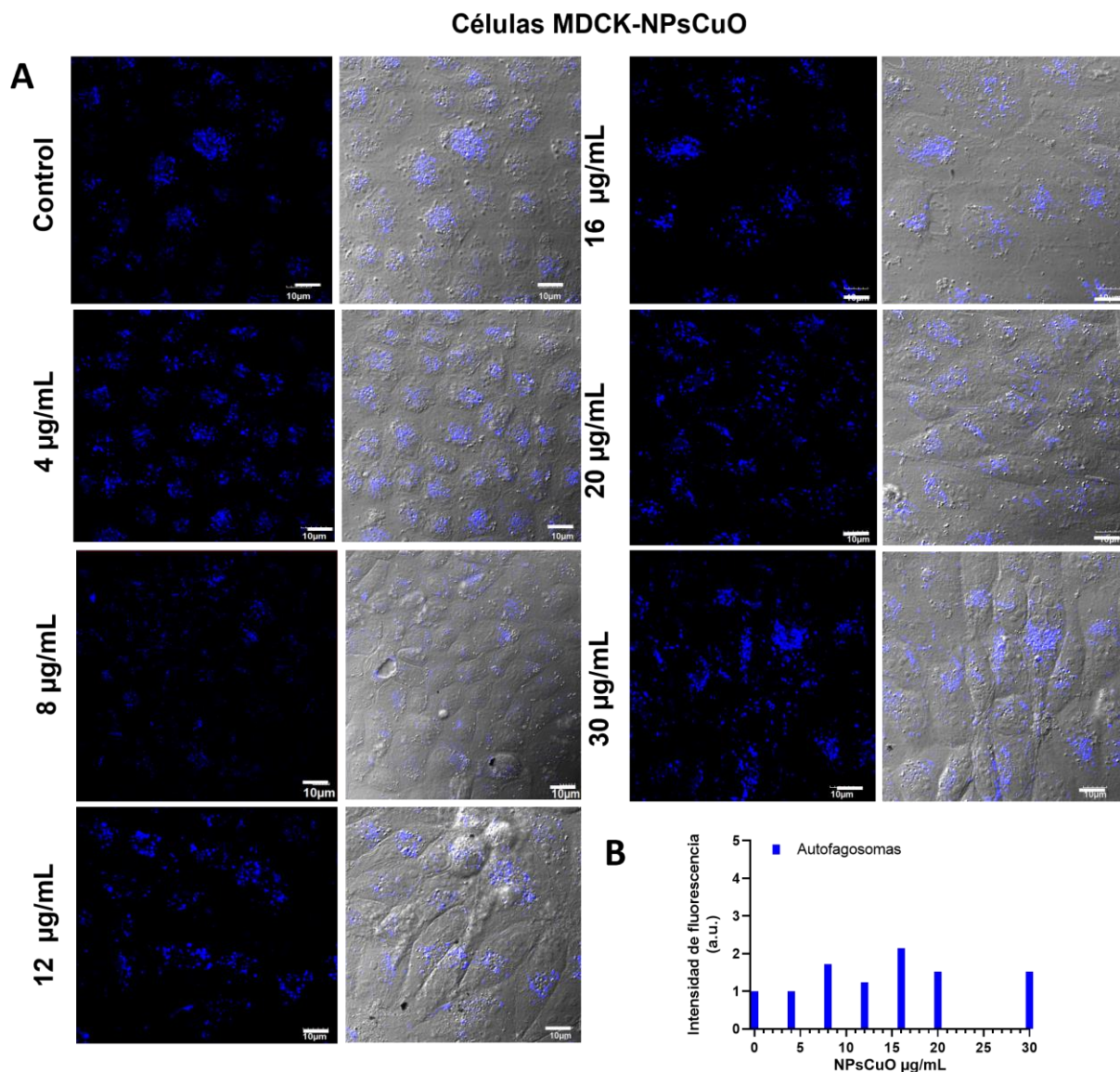


Figura 26. Evaluación de la presencia de autofagosomas por microscopia confocal para conocer si existe muerte de las células MDCK dependiente de autofagia al ser expuestas de forma aguda a NPsCuO. En la imagen A, se ordenan las fotografías de las células de riñón MDCK cuyos autofagosomas están teñidos en color azul, iniciando por las células sin tratar (control) y las expuestas a 4, 8, 12, 16, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO. La barra blanca indica la escala de medición de 10 μm . En la imagen B, se presenta la intensidad de fluorescencia obtenida a través de un análisis en ImageJ de las células que expresaron fluorescencia en puntos de color azul para cada una de las concentraciones de NPsCuO evaluadas y el control. Los resultados son expresados con la intensidad de fluorescencia de un área de 11,015 mm^2 de tres micrografías de microscopia confocal.

En la **Figura 26-A**, se observan en las células MDCK puntos de color azul que indican la presencia de autofagosomas tanto en el control como en las muestras tratadas con 4, 8, 12, 16, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO, además, la presencia de puntos de color azul es mayor conforme aumenta la concentración de NPsCuO. Sin embargo, la presencia de autofagosomas no esta generalizada en todo el citoplasma de célula, sino que, solo esta localizada en ciertas áreas. Tambien, es posible observar cambios en la morfología de las células MDCK al ser tratadas por 24 horas con las diferentes concentraciones de NPsCuO, ya que, a partir de los 8 $\mu\text{g/mL}$ hasta 30 $\mu\text{g/mL}$ las células MDCK aumentan su tamaño y son más alargadas en comparación con el control.

Asimismo, en la **Figura 26-B**, se graficó la intensidad de fluorescencia para cada una de las imágenes de la **Figura 26-A** incluyendo al control y de acuerdo con los resultados obtenidos, se infiere que la presencia de autofagosomas (puntos de color azul) en las células de riñón MDCK es igual al control en la concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$, pero es mayor a partir de los 8 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO.

Con respecto al tipo de muerte que se origina en las células de hígado (AML-12), expuestas a las diferentes concentraciones de NPs de ZnO y CuO, podemos observar en la **Figura 27**, que la apoptosis temprana es el mecanismo preferencial siendo superior al 60%. Y las poblaciones celulares que corresponden a apoptosis tardía y necrosis tienen porcentajes iguales o inferiores al 1%, por lo que no se observan puntos en los cuadrantes del gráfico. Para el control sin tratar, se obtuvo una población uniforme con un porcentaje de 97% de células viables.

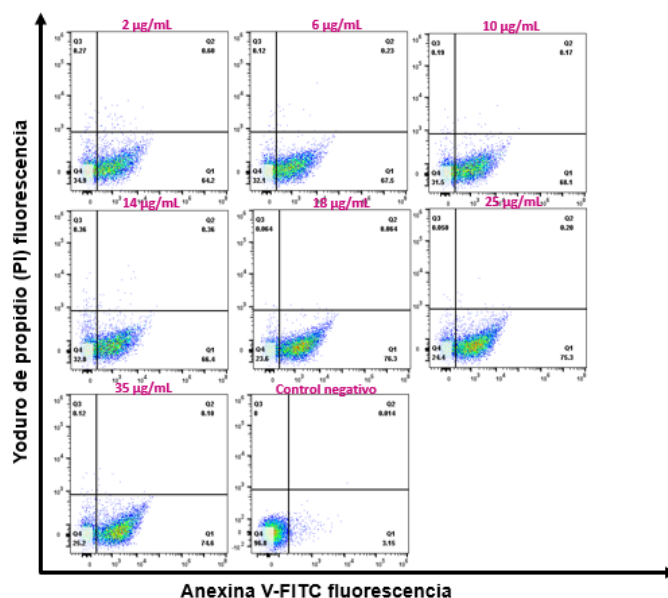


Figura 27. Tipo de muerte para las células de hígado (AML-12) expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de NPsZnO.

La apoptosis tardía está presente exclusivamente en cuatro concentraciones de nanopartículas (2-6 y 20 $\mu\text{g/mL}$), pero con porcentajes inferiores al 1%; y en cuanto a la necrosis, no se registraron porcentajes superiores al 0.5%. De la misma forma que para los casos anteriores, la exposición de las células AML-12 a NPsZnO induce muerte por apoptosis temprana comparativamente con el control sin tratar (**Figura 28**).

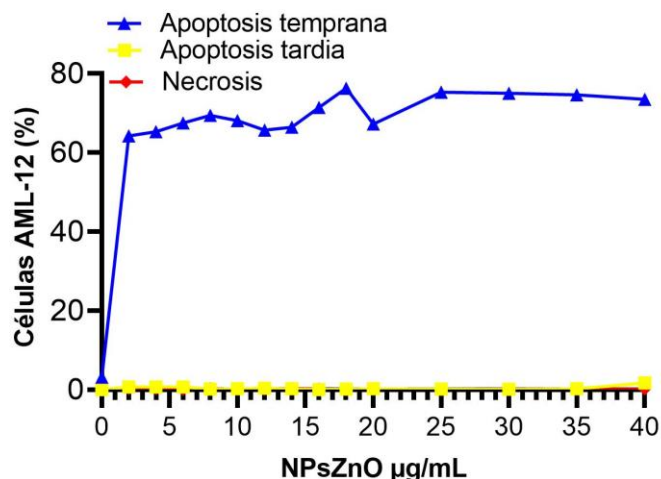


Figura 28. Porcentaje de células en los tipos de muerte celular para las células AML-12 expuestas a las diferentes concentraciones de NPsZnO. Los porcentajes graficados fueron obtenidos de los gráficos de citometría de flujo.

En lo que respecta a la muerte que inducen las NPsCuO en las células AML-12 se registraron porcentajes por arriba del 50% para el tipo de muerte por apoptosis temprana en todas las concentraciones de NPsCuO evaluadas. La tendencia para la muerte por apoptosis temprana que se registró en las células AML-12 es independiente de la concentración de NPsCuO (**Figura 29**).

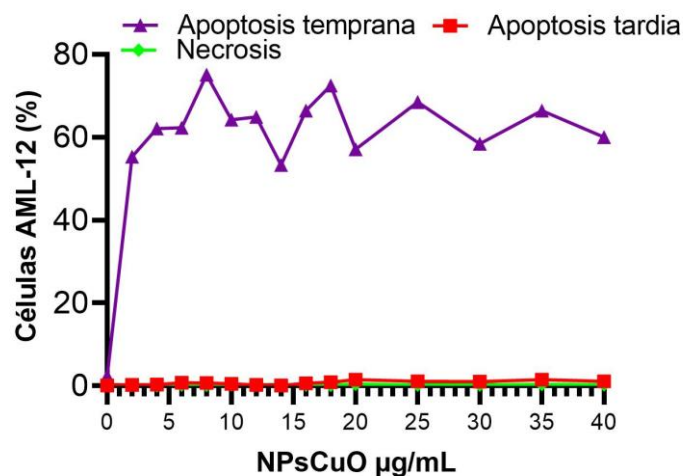


Figura 29. Porcentaje de células en los tipos de muerte celular para las células AML-12 expuestas a las diferentes concentraciones de NPsCuO. Los porcentajes graficados fueron obtenidos de los gráficos de citometría de flujo.

Para ilustrar lo anterior, en la **Figura 30**, se presentan los gráficos de puntos de citometria de flujo para ejemplificar los porcentajes de las poblaciones celulares, y se aprecia que las células están divididas mayoritariamente entre las células viables y las células en apoptosis temprana, de igual forma que en los resultados anteriores.

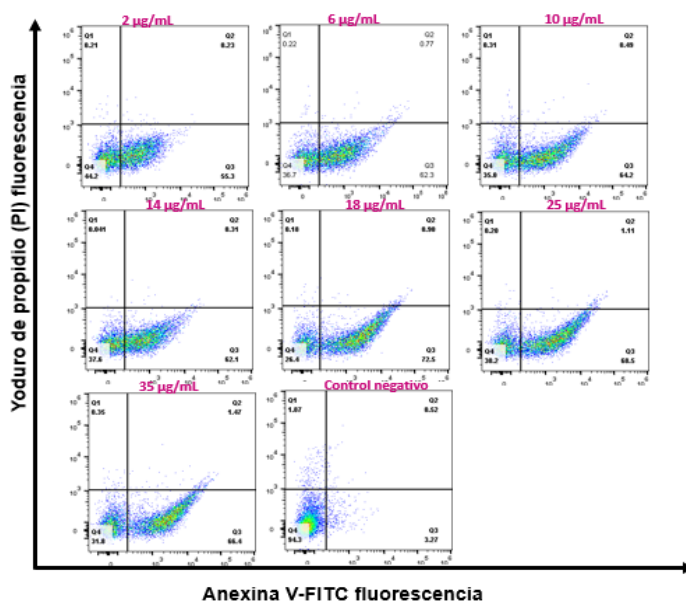


Figura 30. Tipo de muerte para las células AML-12 expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de NPsCuO.

3.5 Medición de la generación de las especies reactivas de oxígeno en células de riñón expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido metálicos

Las células de forma normal producen especies reactivas de oxígeno (ROS) por la respiración aerobia, sin embargo, al someter las células de riñón e hígado a una exposición aguda de NPs de ZnO y CuO, es posible que la capacidad del sistema antioxidante no sea suficiente para eliminar los radicales libres generados y este nivel excesivo provoque niveles por arriba de lo normal, induciendo estrés oxidativo. Para conocer si las nanopartículas de óxidos metálicos generan especies reactivas de oxígeno se midió la generación de ROS en las células expuestas a las nanopartículas.

Por medio de un análisis por espectrofluorimetría, fue posible determinar que la generación de ROS en las células de riñón MDCK expuestas por 24h a las diferentes concentraciones de NPsZnO y CuO es diferente

($P < 0.0001$). En la **Figura 31-A**, la línea de color azul indica una producción de ROS independiente de la concentración de nanopartículas y en las concentraciones de 4 y 16 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO ocasionan un incremento significativo en la producción de ROS por arriba del control ($P < 0.05$), aunque en la concentración de 18 a 40 $\mu\text{g/mL}$ la producción de ROS decrece conforme la viabilidad celular. Por otro lado, en la **figura 31-A**, es posible conocer el efecto de las NPsCuO en la producción de las especies reactivas de oxígeno en las células de riñón, presenta una tendencia similar a partir de los 2 $\mu\text{g/mL}$ hasta los 16 $\mu\text{g/mL}$ NPsCuO y en la concentración de 18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO el porcentaje de ROS registrado es similar al control, por lo que se deduce que las células aumentan su producción de ROS y posteriormente comienza a decaer por la disminución de la viabilidad celular.

Asimismo, en la **Figura 31-B** se graficó el efecto que generan ambas NPs de óxidos metálicos en la línea celular de hígado AML-12. Las NPsZnO en el rango de 2-12 $\mu\text{g/mL}$ no indujeron cambios claros en la producción de ROS en las células AML-12 al compararlas con el control ($P > 0.05$), sin embargo, los 14, 16, 18, 25 y 30 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO muestran un incremento en la producción de ROS diferentes al control ($P < 0.05$). Y a partir de los 30 $\mu\text{g/mL}$ reduce la producción de ROS porque las células mueren. En cambio, las células AML-12 respondieron de forma distinta al ser expuestas a las NPsCuO, desde los 2-14 $\mu\text{g/mL}$ la producción de ROS se mantuvo similar y los 16 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO se registra un aumento en la producción de ROS, seguido de una disminución por la reducción de la viabilidad celular (**Figura 31-B**).

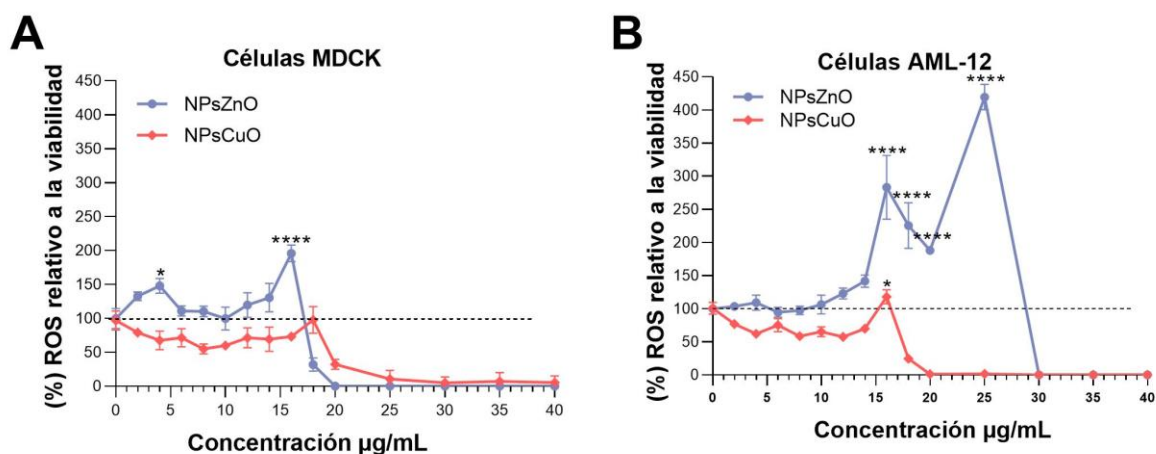


Figura 31. Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células MDCK de riñón (A) y AML-12 (B) expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de NPs de ZnO y CuO. Los resultados son expresados con las medias $\pm$ SD de 10, 000 células en triplicado para tres experimentos independientes. * ($P < 0.05$), **** ($P < 0.0001$) indican diferencias significativas entre las muestras tratadas con NPsZnO y las no tratadas (control).

El efecto que las NPS ZnO inducen sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular de riñón MDCK es diferente al efecto en la línea celular de hígado AML-12 ($P < 0.0001$) y el efecto en la producción de ROS por parte de las NPsCuO es similar en las células MDCK y AML-12 ($P > 0.05$).

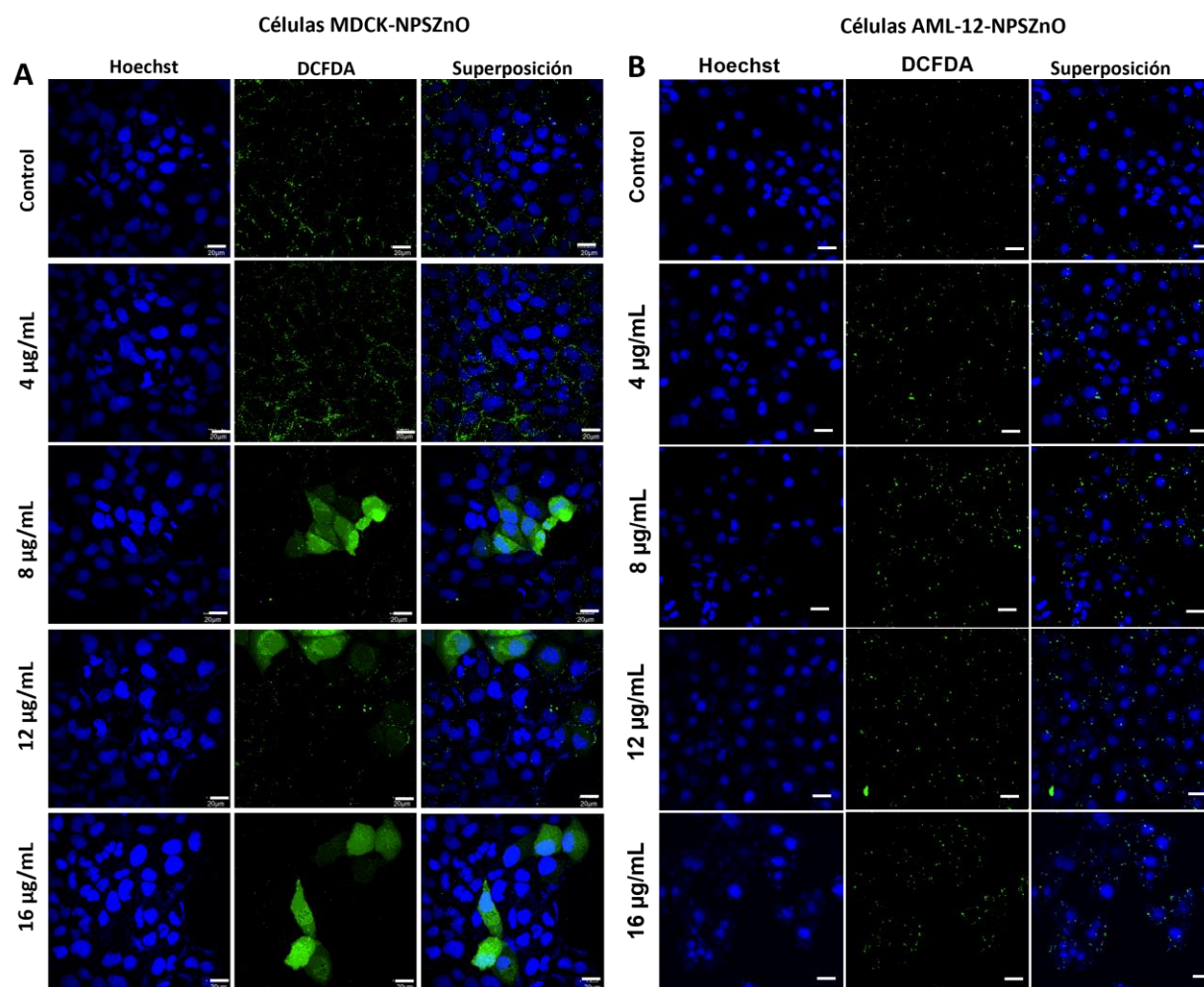


Figura 32. Efecto de las NPS ZnO en la producción de especies reactivas de oxígeno de las células del sistema excretor por microscopia confocal. En la imagen A, se observan las células de riñón MDCK y en la imagen B, se presentan las células de hígado AML-12 expuestas a las NPsCuO con tinción azul en el núcleo (Hoechst) y tinción verde (DCFDA) para marcar las especies de oxígeno producidas por las células y al final de cada concentración de NPsCuO estudiadas la superposición de los dos colores. La barra blanca indica la escala de medición de 20 μm .

Las células MDCK expuestas a las concentraciones de 8, 12 y 14 $\mu\text{g/mL}$ de NPS ZnO por 24 horas presentan una producción de ROS superior al control, esto lo podemos observar ya que algunas de las células MDCK presentan fluorescencia verde en todo el citoplasma, sin embargo, no es un evento generalizado (**Figura**

32-A). Por otro lado, en las células AML-12 a partir de los 4 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO se observa un aumento en la producción de ROS al comparar las imágenes obtenidas con el control (**Figura 32-B**).

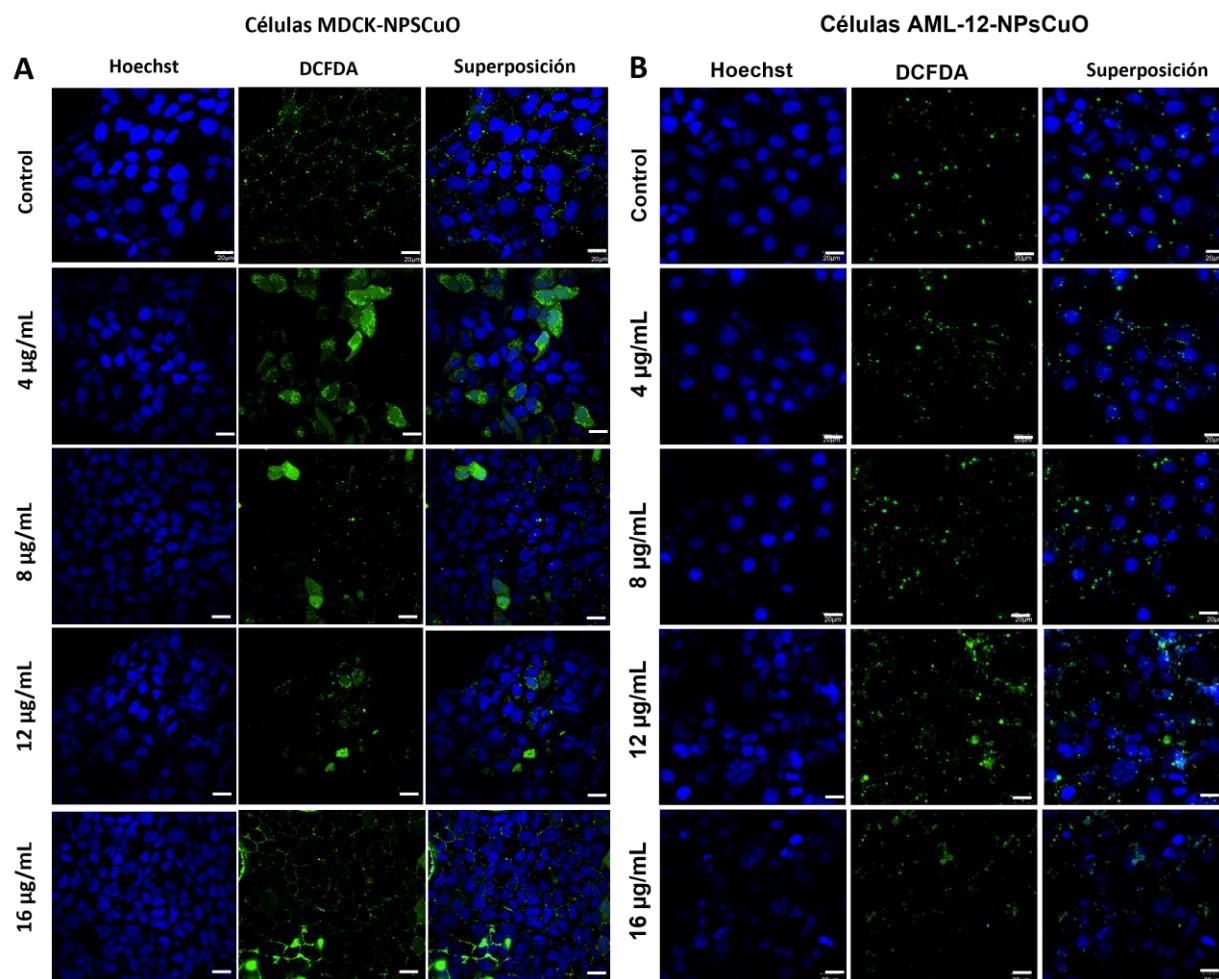


Figura 33. Efecto de las NPsCuO en la producción de especies reactivas de oxígeno de las células del sistema excretor por microscopía confocal. En la imagen A, se observan las células de riñón MDCK y en la imagen B, se presentan las células de hígado AML-12 expuestas a las NPsCuO con tinción azul en el núcleo (Hoechst) y tinción verde (DCFDA) para marcar las especies de oxígeno producidas por las células y al final de cada concentración de NPsCuO estudiadas la superposición de los dos colores. La barra blanca indica la escala de medición de 20 μm .

En la **Figura 33-A**, se observa en color verde la fluorescencia atribuida a la producción de ROS en las células MDCK expuestas a las NPsCuO , podemos mencionar que existen grupos de células con sobreproducción de ROS diferente al control en las concentraciones de 4 y 8 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, no se presentó de forma generalizada y en 12 y 16 $\mu\text{g/mL}$ es similar a control. En cambio, las células AML-12 expuestas a las mismas concentraciones de NPsCuO presentan una producción de ROS similar al control (**Figura 33-B**).

3.6 Estimación de la internalización de las nanopartículas de óxidos metálicos en las células del sistema excretor

La internalización de las NPsZnO y NPsCuO en las células es un factor clave que influye en el mecanismo que conlleva a la muerte de las células. Mediante citometría de flujo se obtienen valores de la complejidad celular interna, la cual es un parámetro que se correlaciona con la internalización de las NPs al inducir un aumento en la complejidad interna de las células. En la **Figura 34**, se presentan los resultados obtenidos por citometría de flujo sobre la complejidad interna de las células al ser expuestas a las NPsZnO y NPsCuO por 24 horas.

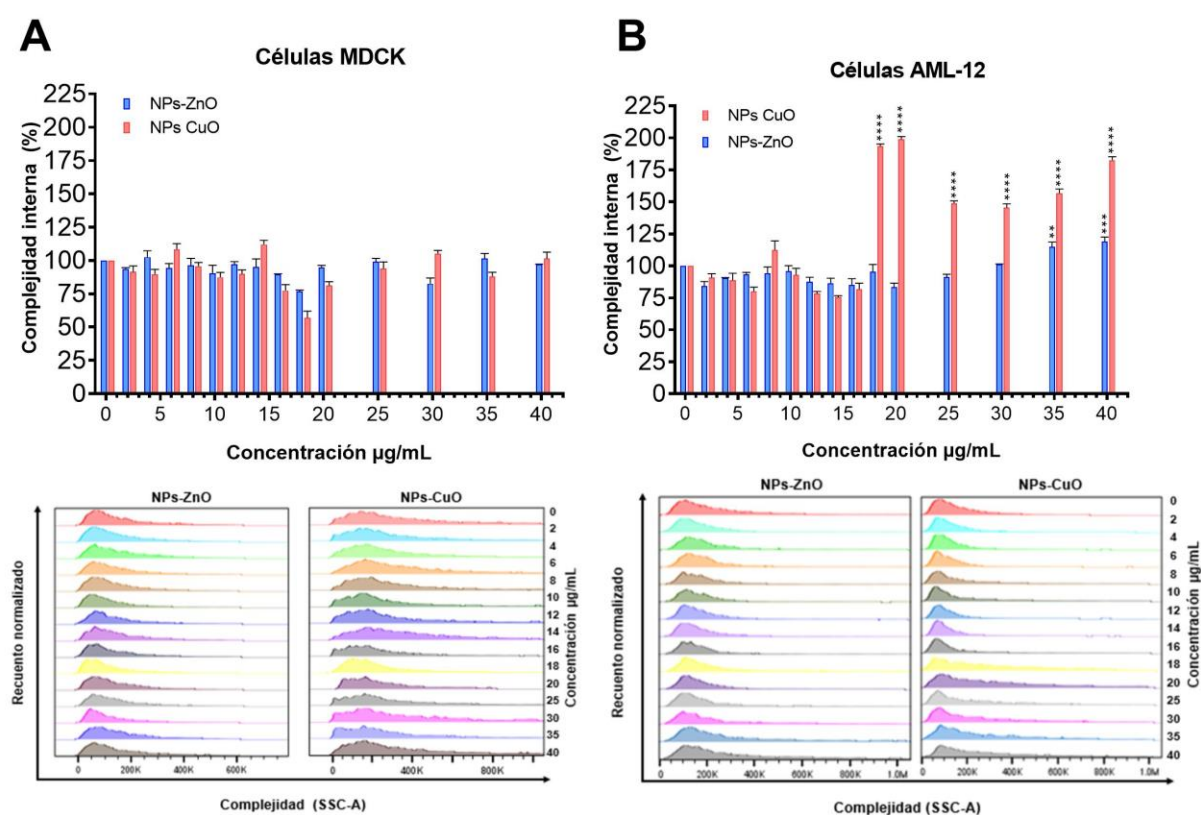


Figura 34. Evaluación de la internalización de NPsZnO y NPsCuO en las células de riñón MDCK y AML-12 por citometría de flujo. En la imagen A, se presenta un gráfico de barras para la complejidad celular interna de las células MDCK expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO y una serie de histogramas de citometría de flujo para evidenciar un cambio en la complejidad celular interna, de la misma forma, en la imagen B, se exponen los resultados de complejidad celular interna para las células AML-12. Los resultados son expresados con las medias $\pm$ SD de 30,000 células en duplicado para dos experimentos independientes.

En la **Figura 34-A**, se observa que la complejidad interna de las células MDCK al ser expuestas a NPs ZnO y CuO no aumenta al compararla con el control ($p>0.05$); por el contrario, en las concentraciones de 18 y 30 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO y en los 16, 18, 20 y 35 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO la complejidad celular interna disminuye de forma clara al compararla con el control ($p<0.05$), asimismo, los histogramas de citometría no presentan aumento en la complejidad celular en comparación con el control, por ello, se resume que no hay internalización de las NPs ZnO y CuO en las células MDCK.

Por otro lado, las células AML-12 al ser expuestas a las concentraciones de NPsZnO menores a 35 $\mu\text{g/mL}$ no inducen un aumento en la complejidad interna de las células ($p>0.05$), por lo que se asume que no hay internalización de estas NPs, en cambio, a partir de los 18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO se percibe un aumento claro en la complejidad interna de las células, lo que sugiere la internalización de las NPsCuO en las células de hígado AML-12 ($p<0.05$), esto se complementa con los datos del aumento en la complejidad celular del histograma obtenidos por citometría de flujo (**Figura 34-B**). También, para corroborar la internalización de las NPsCuO se tomaron micrografías por microscopía electrónica de transmisión, en las cuales se reveló la presencia de NPsCuO de tamaño menor o igual a 5 nm dispersas en el citosol o dentro de vesículas (**Figura 35 A-B**). Así como unas zonas con presencia de cúmulos de NPsCuO.

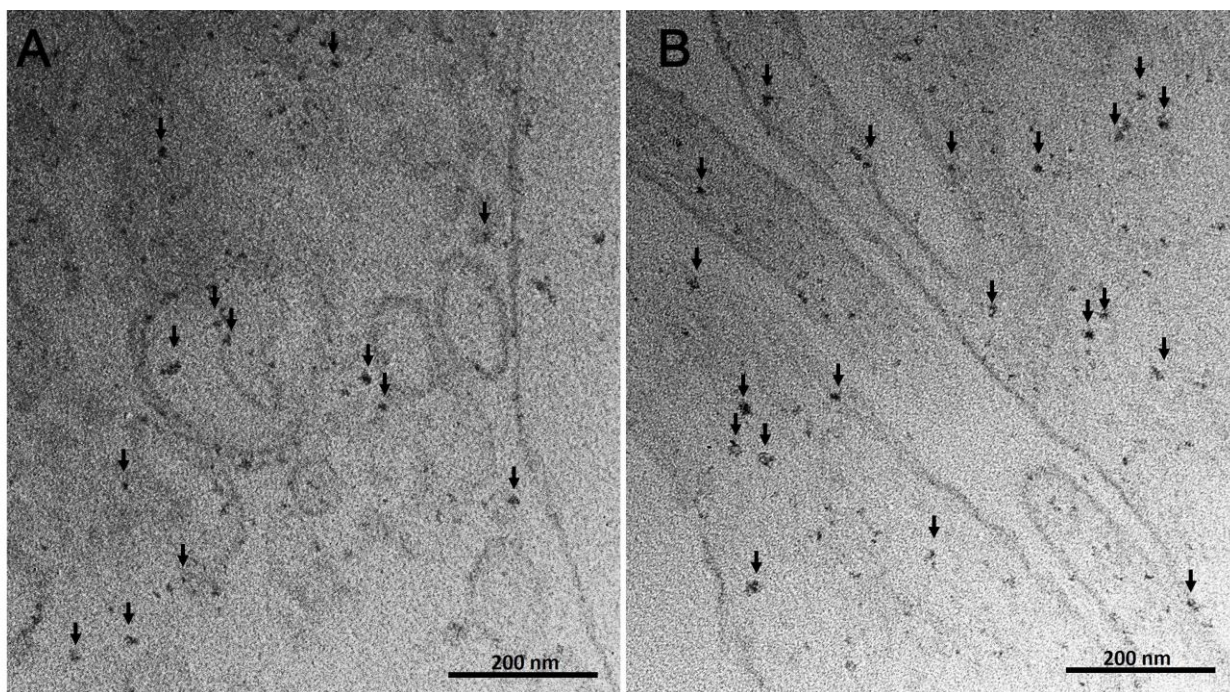


Figura 35. Micrografías de las células AML-12 expuestas a 18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. Las flechas indican zonas con NPsCuO

3.7 Potencial de la membrana mitocondrial de las células del sistema excretor expuestas a las diferentes concentraciones de nanopartículas ZnO y CuO

El potencial de la membrana mitocondrial es un marcador de la función mitocondrial y un parámetro asociado a la muerte de las células, por lo que, dado los resultados de los ensayos de muerte celular, de los cuales resultó predominante la apoptosis para las células MDCK y AML-12 tratadas con NPsZnO, y las células AML-12 tratadas con NPsCuO, por lo que se estudió el estado del potencial de la membrana mitocondrial de ambas líneas celulares MDCK y AML-12 al exponerlas por 24 horas a diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO mediante microscopia confocal; para lo cual se seleccionaron concentraciones representativas de las NPs (4, 8, 12, 16 y 20 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 36 A-B**). El potencial de membrana también fue evaluado por citometría de flujo exponiendo a las células a las diferentes concentraciones de NPs 2-40 $\mu\text{g/mL}$, incluyendo en ambos casos el control sin tratamiento (**Figura 36 C-D**). Para lograr visualizar y estimar los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, se utilizó el reactivo JC-1, que indica de color verde los monómeros formados por el proceso de despolarización, y la formación de aglomerados de color rojo en el caso de la polarización de las células; la superposición de ambas imágenes puede resultar en un color amarillo en donde los colores verde y rojo se traslapan. En la **Figura 36-A**, se aprecia que en comparación con las células sin tratamiento (control), en las células MDCK tratadas con las NPsZnO a diferentes concentraciones de 4, 8, 12, 16 y 20 $\mu\text{g/mL}$ hay presencia mayoritariamente de monómeros de color verde y en menor proporción, aglomerados de color rojo, lo que indica una despolarización de la membrana mitocondrial. Y en la **Figura 36-B**, las células AML-12 muestran una respuesta despolarización de la membrana mitocondrial al igual que las células MDCK al exponerlas a las diferentes concentraciones de NPsZnO, sin embargo, se observa mayor presencia de colocalización de los colores verde y rojo en las concentraciones de 12, 16 y 20 $\mu\text{g/mL}$.

Asimismo, en la **Figura 36 C-D**, se presentan los porcentajes de las fluorescencias roja y verde en las células MDCK y AML-12 expuestas a las NPsZnO obtenidos por citometría de flujo. En la figura 35C, los porcentajes de la fluorescencia verde para las concentraciones de NPsZnO evaluadas en las células MDCK son diferentes al control ($P < 0.0001$), por lo que esto corrobora la despolarización de la membrana mitocondrial detectada por microscopia confocal en donde los porcentajes de monómeros de JC-1 son entre el 40 y 60%. Y en la **Figura 36-D**, se muestra que existe una formación de monómeros de JC-1 diferente en las células AML-12 a partir de los 2 $\mu\text{g/mL}$ hasta los 40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO en comparación al control ($P < 0.0001$) y los porcentajes de monómeros de JC-1 registrados están en el intervalo de 65-90%. Además, el efecto de despolarización que inducen las diferentes concentraciones de NPsZnO es diferente ($P < 0.0001$) al compararlo entre la línea celular de riñón (MDCK) contra la línea celular de hígado (AML-12).

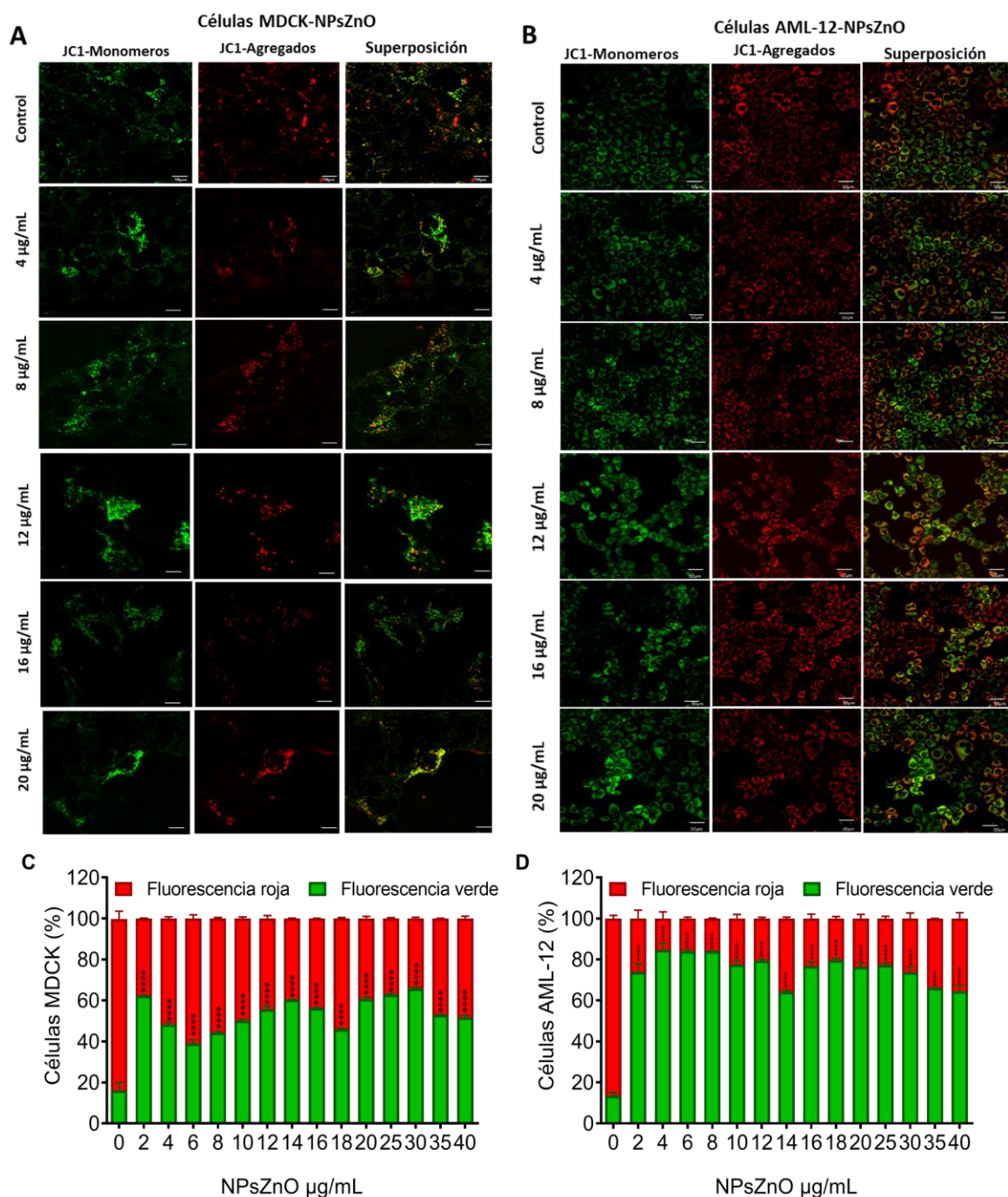


Figura 36. Potencial de membrana mitocondrial medido por microscopia confocal y citometría de flujo de las células MDCK y AML-12 expuestas de forma aguda (24 h) a NPsZnO. Se utilizó el reactivo JC-1 para evidenciar el cambio en el potencial de la membrana mitocondrial para las células MDCK (A y C) y las células AML-12 (B y D). En las micrografías de microscopia confocal (A y B), se observa que la despolarización se puede detectar por la formación de monómeros del JC-1 (color verde) mientras que la polarización forma agregados (color rojo) de JC-1. Las mediciones por citometría de flujo (C y D), permitieron obtener porcentajes de la fluorescencia del JC-1. La barra blanca indica la escala de medición de 10 µm para las células MDCK y de 50 µm para las células AML-12. Los resultados son expresados con las medias $\pm$ SD de 30, 000 células en duplicado. ****($P < 0.0001$) indica diferencias significativas entre las muestras tratadas con NPsZnO y las no tratadas (control).

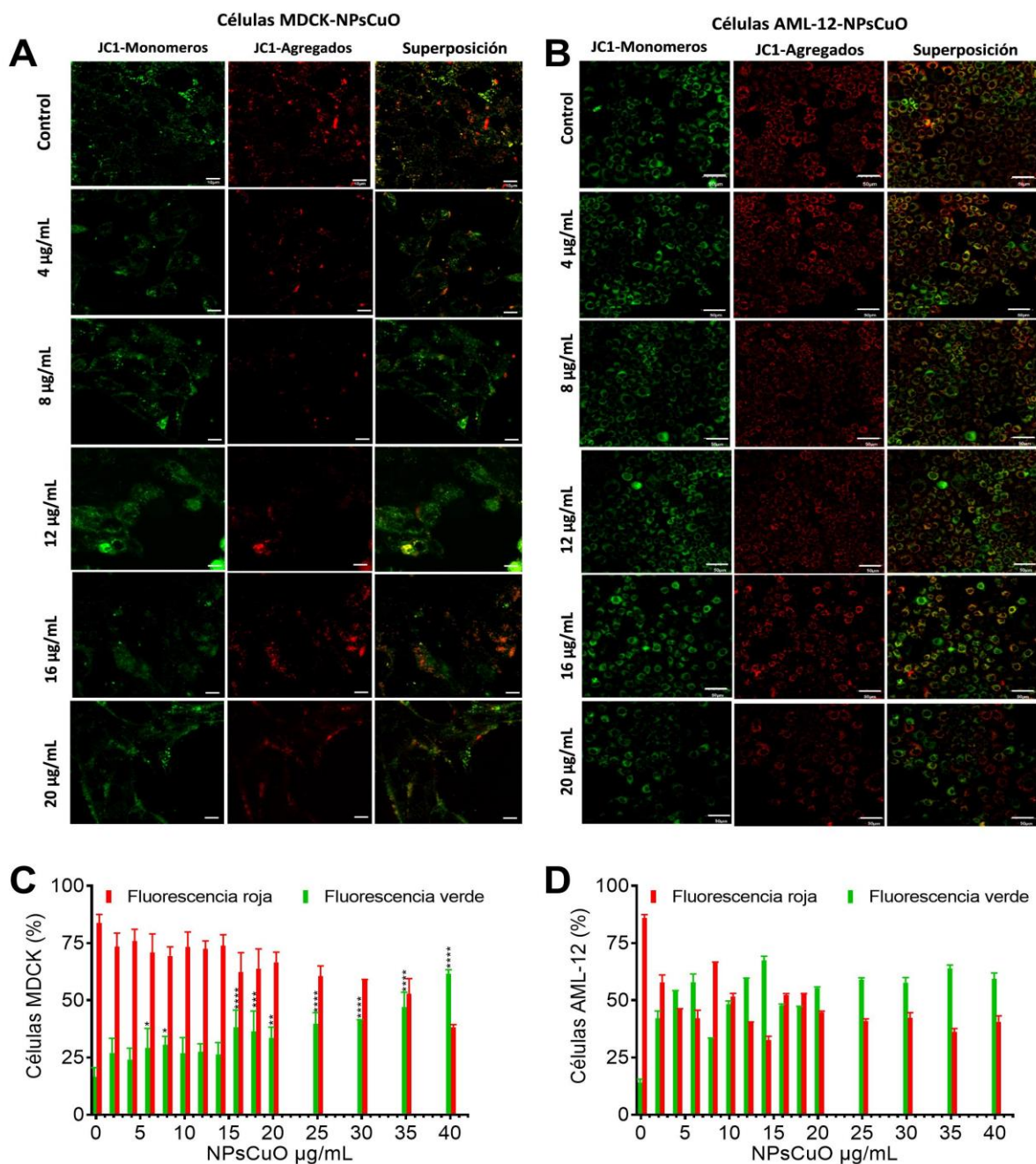


Figura 37. Potencial de membrana mitocondrial medido por microscopia confocal y citometría de flujo de las células MDCK y AML-12 expuestas de forma aguda (24 h) a NPsCuO. Se utilizó el reactivo JC-1 para evidenciar el cambio en el potencial de la membrana mitocondrial para las células MDCK (A y C) y las células AML-12 (B y D). En las micrografías de microscopia confocal (A y B), se observa que la despolarización se puede detectar por la formación de monómeros del JC-1 (color verde) mientras que la polarización forma agregados (color rojo) de JC-1. Las mediciones por citometría de flujo (C y D), permitieron obtener porcentajes de la fluorescencia del JC-1. La barra blanca indica la escala de medición de 10 μm para las células MDCK y de 50 μm para las células AML-12. Los resultados son expresados con las medias $\pm$ SD de 30, 000 células en duplicado. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$), **** ($P < 0.0001$) indican diferencias significativas entre las muestras tratadas con NPsCuO y las no tratadas (control) y ^{NS} ($P > 0.05$) hace referencia a que no existen diferencias significativas al compararlas con el control.

Por otro lado, en la **Figura 37-A**, se observa mayoritariamente la presencia de monómeros de JC-1 de color verde en las células MDCK tratadas con las diferentes concentraciones de NPsCuO en comparación con el control. También, en las concentraciones de 16 y 20 $\mu\text{g/mL}$ se aprecia minoritariamente fluorescencia naranja que indica la colocalización del color verde y rojo. Asimismo, se observa un cambio en la morfología de las células siendo más grandes y alargadas conforme aumenta la concentración de NPsCuO. De igual manera en la **Figura 37-B**, se muestra los resultados de la microscopia confocal para el potencial de la membrana mitocondrial de las células AML-12 expuestas a las distintas concentraciones de NPsCuO y se observa que, a partir de los 4 $\mu\text{g/mL}$ aumenta la presencia de monómeros de JC-1 de color verde hasta los 20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO al compararlas con el control. Del mismo modo, hay presencia de colocalización del color verde y rojo en las concentraciones de 4, 8, 12 y 16 $\mu\text{g/mL}$, en menor proporción que los monómeros de JC-1.

Por otro lado, en la **Figura 37-C**, se registró que el potencial de la membrana mitocondrial de las células MDCK permanece sin diferencias claras ($P > 0.05$) al compararlo con el control en las concentraciones de 2, 4, 10, 12 y 14 $\mu\text{g/mL}$ y decae ligeramente a los 6 y 8 $\mu\text{g/mL}$ ($P = 0.01$ y 0.03 respectivamente). Luego conforme aumenta la concentración de NPsCuO a partir de los 14 $\mu\text{g/mL}$ hasta los 20 $\mu\text{g/mL}$ hay una despolarización de la membrana mitocondrial de las células MDCK con diferencias significativas ($P < 0.0001$) en comparación al control. Por su parte, los resultados de la **Figura 37-D** indican que hay una despolarización de la membrana mitocondrial significativa ($P < 0.0001$) desde los 2 $\mu\text{g/mL}$ hasta los 20 $\mu\text{g/mL}$ en las células AML-12 con la formación de monómeros de JC-1 con porcentajes por arriba del 40% y no más del 60%. Además, los porcentajes de monómeros de JC-1 registrados para las concentraciones de 16 y 18 $\mu\text{g/mL}$ son iguales ($P > 0.05$). En último lugar, la despolarización que inducen las distintas concentraciones de NPsCuO en las células MDCK es diferente a la que se registró para las células AML-12 ($P < 0.0001$).

3.8 Ciclo celular y recultivo de las células MDCK y AML-12 expuestas de forma aguda a las nanopartículas de óxidos metálicos

Conocer el estado de los estadios del ciclo celular de las células MDCK y AML-12 después de estar expuestas por 24 horas a las diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO complementa parte del mecanismo que conlleva la muerte de las células. Para esto, se evaluaron los estadios del ciclo celular que incluyen la fase G0/G1, fase S y fase G2/M en las células MDCK y AML-12 expuestas a las NPsZnO y NPsCuO.

Con la finalidad de comprobar si existe un arresto celular permanente en algún estadio del ciclo celular o si sólo es un arresto momentáneo de las células mientras se encuentran sometidas al tratamiento con las NPs, se determinó la viabilidad celular realizando un recultivo de ellas después de ser expuestas a las diferentes concentraciones de NPs por 24 horas,

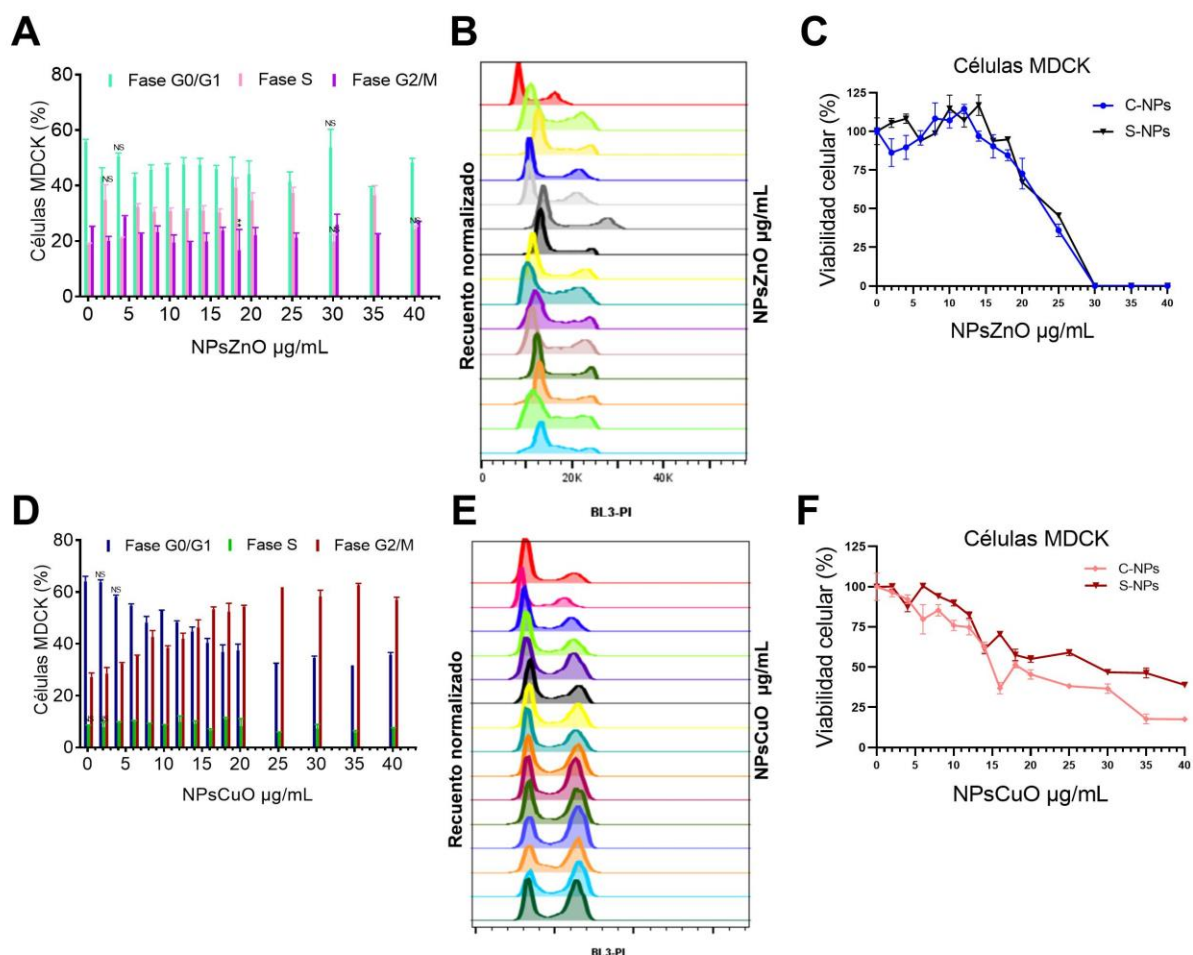


Figura 38. Ciclo celular de las células de riñón MDCK expuestas a NPsZnO y NPsCuO por 24 horas. (A Y D) Ciclo celular de las células MDCK después de ser expuestas a las concentraciones de 2-40 µg/mL de NPsZnO y NPsCuO e histograma del ciclo celular a las diferentes concentraciones estudiadas por citometría de flujo (B y E). (C y F) Viabilidad celular del recultivo de las células MDCK que estuvieron expuestas de 2-40 µg/mL NPsZnO y NPsCuO por 24 horas. Las abreviaturas C-NPs indican que se expusieron las células a las NPs y S-NPs cuando estuvieron en recultivo sin NPs. Los resultados son expresados con las medias $\pm$ SD de 30, 000 células por duplicado. ^{NS}($P>0.05$) hace referencia a que no existen diferencias significativas entre las muestras tratadas y el control.

En la **Figura 38 A-F**, se muestran los resultados de los estadios del ciclo celular y el recultivo de las células MDCK expuestas a las NPsZnO y NPsCuO en concentraciones que van desde los 2 µg/mL hasta 40 µg/mL.

En la **Figura 38-A**, se observa que los porcentajes de las células MDCK que se encuentran en la fase G0/G1 están disminuidos, mientras que los de la fase S se incrementaron significativamente en la mayoría de las concentraciones de NPsZnO estudiadas al compararlos con los porcentajes de los estadios G0/G1 del control ($P<0.05$); sin embargo, las concentraciones 4 y 30 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO en el estadio G0/G1 y los 4, 30 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO en el estadio S no presentan diferencias significativas al compararlas con los estadios del control ($P>0.05$).

También, los porcentajes de la fase G2/M no presentan diferencias significativas respecto de los porcentajes del control, exceptuando en la concentración de 18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO ($P=0.003$). Por lo que, la mayoría de las células presentan alteraciones con mayor significancia estadística en la fase S ($P<0.0001$) y con menor significancia en la fase G0/G1. Además, en la **Figura 38-B**, se aprecian los histogramas que evidencian la distribución disminuida de las células en la fase G0/G1 y aumentada en la fase S del ciclo celular para cada una de las concentraciones de NPsZnO estudiadas en las células MDCK. En la **Figura 38-C**, se comprobó que las alteraciones presentadas en la fase G0/G1 y S de las células MDCK después de la exposición a NPsZnO sólo fue momentánea, ya que los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en el recultivo fueron por arriba del 75% para concentraciones de 2-18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO y comenzaron a decaer a partir de los 20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO. Aún con los porcentajes de viabilidad obtenidos por arriba del 75% en el recultivo se registraron diferencias claras con los porcentajes de viabilidad del ensayo de las células MDCK evaluada después de 24 horas de exposición a las NPsZnO ($P<0.0001$).

En la **Figura 38-D**, se registraron los porcentajes de las células en cada una de las fases del ciclo celular, después de haber sido expuestas de forma aguda a las diferentes concentraciones de NPsCuO (2-40 $\mu\text{g/mL}$). La fase G0/G1 de las células MDCK, no presentó diferencias claras en las concentraciones de 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO ($P>0.05$); y en el resto de las concentraciones probadas, los porcentajes son menores y mostraron diferencias claras en esta fase al compararlas con el control ($P<0.0001$). La fase S de las células MDCK resultó ser igual a la del control en todas las concentraciones evaluadas de 2-40 $\mu\text{g/mL}$ NPsCuO

($P>0.05$). Y la fase G2/M para las concentraciones de 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO es igual al control ($P>0.05$) y las concentraciones de 6-40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO registraron porcentajes por arriba de los del control y son claramente distintos ($P<0.0001$).

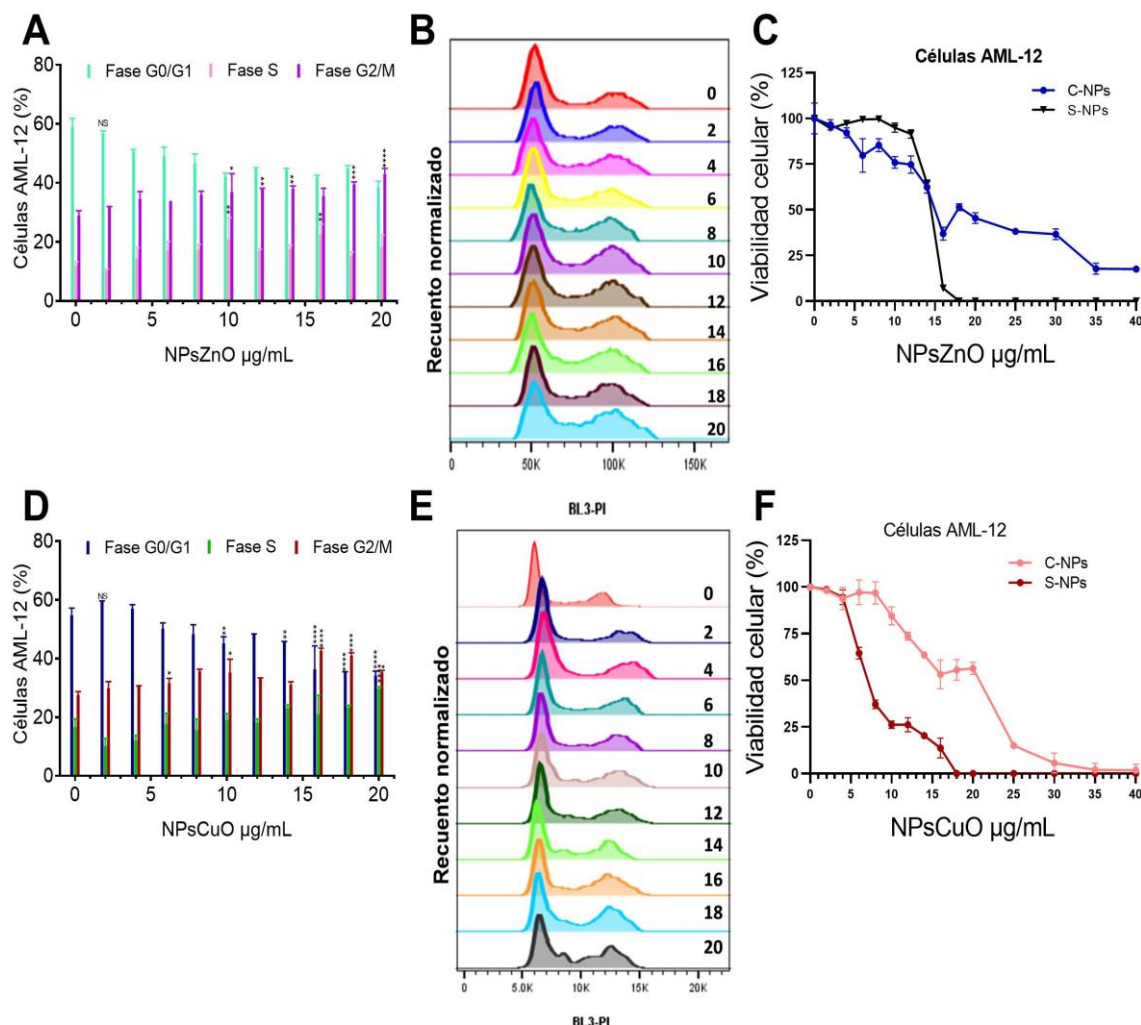


Figura 39. Ciclo celular de las células de hígado AML-12 expuestas a NPsZnO y NPsCuO por 24 horas. (A y D) Ciclo celular de las células AML-12 después de ser expuestas a las concentraciones de 2-40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO y NPsCuO e histograma del ciclo celular a las diferentes concentraciones estudiadas por citometría de flujo (B y E). (C y F) Viabilidad celular del recultivo de las células AML-12 que estuvieron expuestas de 2-40 $\mu\text{g/mL}$ NPsZnO y NPsCuO por 24 horas. Las abreviaturas C-NPs indican que se expusieron las células a las NPs y S-NPs cuando estuvieron en recultivo sin NPs. Los resultados son expresados con las medias $\pm$ SD 30, 000 células por duplicado. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$), **** ($P < 0.0001$) indican diferencias significativas entre las muestras tratadas con NPsCuO y las no tratadas (control).

Por lo tanto, las células MDCK expuestas a las NPsCuO presentan variación en la fase G0/G1 a partir de los 6 $\mu\text{g/mL}$ y hasta los 40 $\mu\text{g/mL}$ y en la fase G2/M en las mismas concentraciones ($P < 0.05$). Para completar lo anterior, en la **Figura 38-E**, se ilustran los histogramas con las fases del ciclo celular de las células MDCK para cada una de las concentraciones de NPsCuO estudiadas y se aprecia una disminución en distribución de la fase G0/G1 y un aumento en la fase G2/M desde los 6 $\mu\text{g/mL}$ hasta los 40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO. En la

Figura 38-F, se evaluó la viabilidad de las células MDCK del recultivo sin ser expuestas a NPsCuO y al compararlas con la viabilidad de las células MDCK expuestas por 24 horas a las NPsCuO, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.0001$), ya que los porcentajes de viabilidad de las células MDCK recultivadas de las concentraciones de 6, 8, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO fueron menores en comparación a los porcentajes de las células expuestas de forma aguda a las NPsCuO ($P < 0.0001$).

En la **Figura 39 A-F**, se resumen los resultados de la evaluación de los estadios del ciclo celular de las células AML-12 expuestas de forma aguda a las concentraciones de 2-20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO y NPsCuO. En la **Figura 39-A**, se representa que las células AML-12 expuestas a las NPsZnO tienen porcentajes disminuidos respecto del control en la fase G0/G1 a partir de la concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ y hasta los 20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO ($P < 0.05$), por el contrario en la fase S, la mayoría de las concentraciones de NPsZnO estudiadas registraron porcentajes similares a los del control ($P > 0.05$); excepto a 10 y 16 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO ($P < 0.05$), mientras tanto, los porcentajes de la fase G2/M son variados, ya que la mitad de las concentraciones NPsZnO estudiadas (2, 4, 6, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$) presentan porcentajes mayores y son diferentes al control ($P < 0.05$) y la otra mitad (10, 12, 14, 18, y 20 $\mu\text{g/mL}$) no presenta contraste con los porcentajes de la fase G2/M del control ($P > 0.05$). Por lo que, la fase G0/G1 de las células AML-12 estadísticamente presenta mayor perturbación al ser tratadas con las NPsZnO en comparación a la fase G2/M.

Del mismo modo en la **Figura 39-B**, los histogramas de los estadios del ciclo celular de las células AML-12 se encuentran disminuidos en la fase G0/G1 en las concentraciones de 4-20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO y aumentados en la fase G2/M para las concentraciones 2, 4, 6, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO.

Para terminar, en la **Figura 39-C**, se graficó la viabilidad de las células AML-12 del recultivo que permanece igual al control desde la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ a 13 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO ($P > 0.05$) y las células AML-12 recultivadas de las concentraciones de 16-40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO registraron porcentajes de viabilidad por debajo del 10% y la muerte total de las células AML-12 recultivadas se presentó a partir de los 18 $\mu\text{g/mL}$. La viabilidad de las células AML-12 del recultivo, es diferente de la viabilidad de las células expuestas a las NPsCuO ($P < 0.0001$), en las concentraciones de 4 $\mu\text{g/mL}$ a 12 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO los porcentajes de viabilidad de las células del recultivo son superiores al de la viabilidad de las células AML-12 expuestas a NPsZnO por 24 horas, sin embargo, las concentraciones 16-40 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO registraron porcentajes de viabilidad por debajo del 10% ($P < 0.0001$).

Por otra parte, en la **Figura 39-D**, los porcentajes de las células AML-12 en la fase G0/G1 para las concentraciones de 2-8 $\mu\text{g/mL}$ y 12 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO no presentan diferencias respecto del control

($P>0.05$); en cambio, las concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ y 14-20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO disminuyen los porcentajes de las células en la fase G0/G1 y presentan diferencias en comparación al control ($P<0.05$). Ahora bien, la fase S del ciclo celular de las células AML-12 no presentan diferencias al compararla el control ($P>0.05$) y al tratarlas con las concentraciones de 2-18 $\mu\text{g/mL}$ NPsCuO, con excepción en la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO donde el porcentaje de la fase S es mayor al control. La fase G2/M de las células AML-12 al exponerlas de forma aguda a las concentraciones de 2-6 $\mu\text{g/mL}$ y 12-14 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO no presentan diferencias en los porcentajes al compararlos con el control ($P>0.05$) y las concentraciones de 8-10 $\mu\text{g/mL}$ y 16-20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO inducen un aumento en la fase G2/M de las células AML-12 que es diferente al control ($P<0.05$). Del mismo modo, en la **Figura 39-E**, se observa la distribución de los estadios del ciclo celular de las células AML-12 en los histogramas para cada una de las concentraciones de NPsCuO estudiadas, se percibe una disminución de la fase G0/G1 para las concentraciones de 14-20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO, en cambio, la fase S se mantiene similar al control en cada una de las concentraciones con excepción de 20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO y la fase G2/M aumentase su distribución en las concentraciones 8, 10, 16 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO.

Por último, en la **Figura 39-F**, mediante un recultivo de las células AML-12 tratadas con las diferentes concentraciones de NPsCuO se obtuvo la viabilidad celular y se comparó con la de las células AML-12 expuestas a las NPsCuO, se encontraron diferencias a partir de las células recultivadas de los 4 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.0001$), pues redujeron su viabilidad por debajo del 75% y desde los 10 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO la viabilidad celular fue menor al 25% y diferente a la viabilidad de las células AML-12 tratadas con NPsCuO ($P<0.0001$). La muerte total de las células AML-12 recultivadas se registró a partir de los 18 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO mientras que para las NPsCuO fue a partir de los 35 $\mu\text{g/mL}$ de NPsCuO.

De forma general, las células de riñón MDCK tratadas con NPsZnO y NPsCuO no presentaron alteraciones distintas en la fase G0/G1 ($P=0.6$), nos obstante, la fase S y G2/M se distribuyó diferente con los tratamientos de las concentraciones de NPsZnO y NPsCuO ($P<0.0001$). Por el contrario, los estadios de las células AML-12 no presentan diferencias en su distribución al ser tratadas con las diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO ($P>0.05$). Y las células de riñón MDCK e hígado AML-12 responde de forma distinta con las alteraciones en las fases del ciclo celular al exponerlas de forma aguda a las NPsZnO y NPsCuO ($P<0.05$).

Capítulo 4. Discusión

La nanotoxicología se ha encargado de aportar información sobre la toxicidad de los nanomateriales sintéticos o aquellos que se producen de forma incidental. Dentro de los nanomateriales más utilizados en la industria y en productos comerciales, se encuentran las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos como zinc y cobre, de las cuales es necesario investigar los efectos tóxicos y las concentraciones adecuadas para su uso. Por ello, en esta investigación se planteó determinar el mecanismo biológico, por el cual las nanopartículas de óxido de zinc y de óxido de cobre ocasionan la muerte de las células del sistema excretor, ya que son escasos los estudios que aborden la toxicidad en células inmortalizadas no neoplásicas de riñón e hígado; por el contrario, existen muchos más reportes que evidencian los efectos anticancerígenos y otras aplicaciones de las NPs más allá de sus efectos tóxicos a una exposición aguda. En consecuencia, en este capítulo se discuten los resultados obtenidos en esta investigación, que incluyen las propiedades fisicoquímicas de las NPs y su relación con los efectos tóxicos observados.

Las características fisicoquímicas de las nanopartículas, tales como, el tamaño, la forma y la carga, son factores cruciales que influyen en los efectos tóxicos que las nanopartículas inducen en las células. Por lo que es importante realizar una caracterización fisicoquímica lo más completa posible. Dentro de las características fisicoquímicas intrínsecas de las NPsZnO y NPsCuO, se encuentra la banda de absorción en el espectro UV-Vis. Se obtuvo un pico a 360 nm para las NPsZnO, el cual es igual al que reporta (Ahamed et al., 2012; Tomaev et al., 2019; Wu et al., 2018) para diferentes tamaños de NPsZnO, confirmando que el pico obtenido por UV-Vis entre 360-365 nm corresponde a nanopartículas de óxido de zinc. También, se midió por espectroscopia UV-Vis las NPsCuO, las cuales mostraron un pico que va de los 350 a los 400 nm, con un valor mediano a los 375 nm, que coincide con el rango de absorción a 350-500 nm que informa (El-Batal et al., 2020; Thamer et al., 2018).

En esta investigación se obtuvo el tamaño promedio de 80 nm para NPsZnO y de 84 nm para las NPsCuO, estos valores fueron calculados a partir de las micrografías obtenidas por TEM, asimismo, este rango de tamaño nanométrico puede facilitar la formación de una corona proteica, la cual tiene mayor interacción con las proteínas, fosfolípidos u otros receptores de la membrana externa de las células en comparación con tamaños menores a los 5 nm que internalizan a la célula por difusión pasiva (Albanese et al., 2012; Hoshyar et al., 2016).

El potencial Z registrado para las NPsZnO fue de -24 mV y para las NPsCuO de -20 mV, lo que indica que la repulsión entre las cargas de las NPs con el medio circundante resulta en una estabilidad media que

favorece la aglomeración de estas NPs. De acuerdo con (Liu et al., 2018; X. Wang et al., 2020), la aglomeración de las NPsZnO y NPsCuO se relaciona con el pH del medio en donde se encuentran dispersas, por lo que a un pH alrededor de 7 el potencial Z se encuentra entre los 10-20 mV para este tipo de NPs, y este rango confiere baja estabilidad y tendencia a la aglomeración, además, que la cantidad de iones calcio, magnesio, potasio y sodio en el medio de cultivo celular, podría promover que el potencial Z disminuya y las NPs tengan baja estabilidad.

Aunado a lo anterior, en las micrografías obtenidas por TEM de las dos nanopartículas estudiadas, se aprecia que ambas tienen una forma esférica y que están aglomeradas, quizá debido a las fuerzas de van der Waals que dominan en la escala nanométrica, debido al aumento de la relación entre el área superficial y el volumen. Durante la medición DLS, la aglomeración se vuelve más evidente en el medio acuoso, por lo que la distribución de tamaño es heterogénea y registra tamaños de 430 nm (NPsZnO) y 742 nm (NPsCuO), por lo tanto, las células de riñón MDCK e hígado AML-12 fueron expuestas a concentraciones de nanopartículas con una distribución de tamaño heterodispersa. Algo similar reporta Gravely et al. (2022), quienes estudiaron la toxicidad de nanotubos de carbono fluorescentes de pared simple en células y determinan que los nanotubos que tienden a una alta agregación en el medio de cultivo ocasionan menor citotoxicidad en comparación con los nanotubos que presentan baja agregación.

Uno de los parámetros más importantes en las evaluaciones nanotoxicológicas, es el efecto de las NPs en la viabilidad celular. En ese sentido, el porcentaje de células MDCK y AML-12 expuestas por 24 horas a las diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO decrementa conforme aumenta la concentración de nanopartículas, estos resultados concuerdan con los de Kononenko et al. (2017) y de Wang et al. (2020), quienes expusieron por 24 horas a células de hígado y riñón con diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO, y determinaron que la viabilidad se reduce de manera dependiente de la concentración, en cambio, contrastan con los datos presentados por Ahamed et al. (2012), puesto que concluyen que a las concentraciones de 5-15 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO no inducen reducción en la viabilidad de células hepáticas sanas pero si en la viabilidad de células hepáticas cancerígenas, por lo que le atribuyen a las NPsZnO actividad anticancerígena.

Otro aspecto relevante son los cambios morfológicos que sufren las células MDCK y AML-12 expuestas a las NPsZnO y NPsCuO que van desde la reducción del tamaño hasta el cambio de la morfología poligonal a redondeada, así como menor densidad celular, conforme a Häcker (2000) estos cambios están asociados a las células moribundas, las cuales comienzan a romper las uniones con las células viables próximas a ellas, y por consiguiente, reducen su tamaño por reorganización del citoesqueleto en particular los

microfilamentos de actina, también, la densidad celular disminuye porque en las células moribundas se escinde la cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) lo cual favorece el desprendimiento celular. Asimismo, Li et al. (2020) reportaron efectos similares en la morfología de las células de mieloma múltiple y en células mononucleares de sangre periférica expuestas a NPsZnO tales como, contracción de las células, condensación nuclear, debris celular y en las concentraciones altas cambios morfológicos más graves.

En este trabajo, se determinó que la reducción de la viabilidad en las células MDCK expuestas a las NPsZnO y NPsCuO de forma aguda se debe a los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} liberados por las NPs; igualmente las células AML-12 expuestas a las NPsZnO reducen su viabilidad por los iones Zn^{2+} , no obstante, las NPsCuO son la causa de la reducción de la viabilidad de las células AML-12. Se ha registrado que las NPsZnO mayoritariamente tienden a desintegrarse en el medio de cultivo y a liberar iones Zn^{2+} y entrar a la célula por difusión pasiva (S. Singh, 2019), en cambio, las NPsCuO pueden internalizar a la célula o liberar sus iones Cu^{2+} , además que la toxicidad de los iones de Cu^{2+} de las NPsCuO es menor en comparación con los efectos de las propias nanopartículas (Naz, Gul, y Zia, 2020).

Se ha documentado que el zinc (Zn) es un metal traza esencial que tiene diferentes roles biológicos y a su vez un fuerte impacto en la vida. Es un elemento redox-neutro que podría ejercer propiedades antioxidantes y juega un papel clave en la síntesis de ADN, proteínas, división celular y procesos de autofagia.

Por otro lado, el cobre (Cu) es un elemento necesario para mantener la vida de los organismos, ya que puede participar en la inactivación de las proteínas celulares uniéndose directamente a los residuos de cisteína, también, puede promover protección contra el estrés oxidativo al participar en la activación de la enzima superóxido dismutasa a través de la chaperona de cobre para la superóxido dismutasa (CCS) y es un componente esencial de varias enzimas (cuproenzimas) involucradas en diversos procesos celulares como la metalochaperona de cobre (ATOX1) que entrega cobre desde el citosol a los transportadores ATP7A y ATP7B y la chaperona de cobre citocromo c oxidasa (SCO1) que codifica proteínas de metalochaperonas con funciones esenciales en el suministro de cobre a la citocromo c oxidasa (COX) (Navarro y Schneuwly, 2017).

Por lo tanto, los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} son necesarios para el metabolismo de las células y sus niveles deben estar estrictamente regulados para mantener un equilibrio preciso, y garantizar la biodisponibilidad de Zn

y Cu en la célula, en caso contrario, una concentración elevada de iones Zn^{2+} y Cu^{2+} inducen alteración en el metabolismo y participan en la muerte de las células.

Al evaluar la complejidad celular interna de las células MDCK y AML-12 no se detectó que las NPsZnO internalizaran a las células. Incluso la complejidad interna de las células MDCK no se modificó al exponerlas a las NPsCuO , por lo que se determinó que las NPsCuO no se internalizan en las células. Por el contrario, las células de hígado AML-12, presentaron mayor complejidad celular interna a partir de los $18 \mu\text{g/mL}$ de NPsCuO , se corroboró con las micrografías del TEM la presencia de $\text{NPsCuO} < 5 \text{ nm}$ dispersas en el citosol y dentro de vesículas. Las células de riñón solo pueden internalizar tamaños de nanopartículas menores a los 15 nm y las células de hígado tienen un rango más amplio de $50\text{-}200 \text{ nm}$ (Chen et al., 2016; Lavicoli et al., 2016) por lo que solo las NPsCuO lograron penetrar a las células AML-12.

La internalización de las NPsCuO en las células de hígado AML-12 puede ser por endocitosis para los cúmulos de nanopartículas o por difusión pasiva como los iones para las partículas individuales de $<5 \text{ nm}$ de diámetro. El primero es un proceso de transporte dinámico que incluye varias rutas (i) endocitosis mediada por receptor, donde el receptor de membrana depende del tamaño, la forma y la afinidad con las NPs; (ii) endocitosis dependiente de clatrina, dependiente de caveolas, y la vía independiente de caveolas, que dan como resultado la disposición de vesículas para el transporte de nanopartículas que dependen del tamaño de nanopartículas. El segundo es la internalización de las NPs por un flujo a través de la membrana sin que exista un aporte de energía (Behzadi et al., 2017; N. Singh et al., 2009).

Por otro lado, las células MDCK y AML-12 presentaron sobreproducción de ROS principalmente en concentraciones de NPsZnO altas, esto tiene relación con la actividad de las enzimas del sistema antioxidante y a la fuga de electrones en el complejo I y III de la cadena de transporte de electrones ubicada en las mitocondrias, lo que conduce a la reducción parcial de oxígeno para formar superóxido, posteriormente, este radical se dismuta a peróxido de hidrógeno por medio de la superóxido dismutasa I en el espacio intermembrana mitocondrial y la superóxido dismutasa II en la matriz mitocondrial (Fuhrmann y Brüne, 2017). Lo anterior impacta en el potencial de la membrana mitocondrial ocasionando la despolarización de las mitocondrias en las células MDCK y AML-12, se conoce que las mitocondrias son la fuente principal de energía intracelular por medio de la fosforilación oxidativa desde el punto de vista metabólico y su correcta función e integridad garantizan la energía suficiente para el metabolismo adecuado de las células.

Por lo que, la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial en las células MDCK y AML-12 desencadenan la apoptosis por vía intrínseca, dado que se ha descrito que los iones Zn^{2+} de las NPsZnO promueven la supresión de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica), el cual a su vez induce la expresión de Bak/Bax (proteínas pro apoptóticas) y por lo tanto, la liberación del citocromo C (transportador electrónico mitocondrial) del espacio intermembrana al citosol, este activa la formación de un complejo proteico (apoptosoma) y a su vez la activación directa de la caspasa 9, esta última desencadena la expresión y actividad de las caspasas efectoras 3 y 7, lo que finalmente conduce a la muerte apoptótica de las células por la vía intrínseca (Anjum et al., 2021).

Los hallazgos antes mencionados concuerdan con las investigaciones de Li et al. (2020), quienes concluyen que la muerte de las células de mieloma múltiple y células mononucleares de sangre periférica expuestas a NPsZnO de 30 nm y a concentraciones que van de los 2.5-60 $\mu\text{g/mL}$ es por la sobreproducción de especies de oxígeno reactivas mitocondriales, decaimiento en la producción de ATP y por consiguiente disrupción de la función mitocondrial dando paso a la activación de la vía apoptótica intrínseca que incluye la liberación del citocromo C y activación de la caspasa 9 y 3.

También, otras investigaciones (L. Wang, Guo, et al., 2020; S.-W. Wang, Lee, et al., 2020) reportaron la citotoxicidad de las NPsZnO <100 nm, y determinaron que inducen apoptosis por sobreproducción de radicales superóxidos en las mitocondrias de los fibroblastos y despolarización de la membrana mitocondrial.

Las células MDCK y AML-12 expuestas por 24 horas a las NPsCuO registraron niveles bajos de ROS en las concentraciones inferiores a la IC_{50} , lo que indica que las células sufren una adaptación metabólica, en otras palabras, las mitocondrias intentan minimizar la formación de ROS para reducir el riesgo de daño macromolecular y una producción de ATP adecuada (Fuhrmann y Brüne, 2017).

Lo cual puede estar influenciado por los iones Cu^{2+} y las NPsCuO al activar la enzima superóxido dismutasa a través de la chaperona de cobre para la superóxido dismutasa y suministrando cobre a la citocromo c oxidasa (Navarro y Schneuwly, 2017), sin embargo, el intento de minimizar los efectos tóxicos de ROS no fue suficiente para mantener la estabilidad en la membrana mitocondrial, puesto que las NPsCuO provocaron la despolarización de la membrana mitocondrial de las células MDCK y AML-12.

En las células MDCK el mecanismo preventivo para disminuir la producción de ROS al ser tratadas con NPsCuO por 24 horas, llevó a las células a una muerte celular dependiente de autofagia, con la finalidad

de reducir el daño oxidativo a biomoléculas y orgánulos e intentar encontrar un nuevo estado homeostático, al responder rápidamente al estrés oxidativo a través de la eliminación selectiva de orgánulos dañados (Filomeni et al., 2015; Mariño et al., 2014). Lo que puede estar asociado a un proceso de mitofagia en el cual se buscó degradar a las mitocondrias dañadas por la despolarización de la membrana mitocondrial y la producción de ROS, ya que las células MDCK de riñón requieren mayor producción de energía, por lo tanto, tienen una concentración mayor de mitocondrias para cubrir las necesidades del órgano en comparación a las células de hígado (Kimura et al., 2017; M. Zhao et al., 2021).

Existen tres tipos de autofagia en células de mamíferos, macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas, pero las NPsCuO inducen en las células MDCK macroautofagia, por la unión detectada del anticuerpo anti LC3-II unido a un fluorocromo de color azul que marco a los autofagosomas. Este tipo de autofagia implica la formación de vesículas citosólicas (autofagosomas) de novo y su fusión con los lisosomas para formar un autolisosoma que contiene el cargo para ser degradado por acción de hidrolasas lisosomales y permeasas (Parzych y Klionsky, 2014).

En las células AML-12 las NPsCuO indujeron muerte por apoptosis, lo cual se fundamenta con la investigación de Ma et al. (2014), quienes reportan que las células epiteliales derivadas de hígado suelen activar la apoptosis por la adenosina, un metabolito del ATP, que está involucrado en la producción basal de ROS en las células epiteliales, la adenosina facilita la activación de caspasa 8 y 9, aumenta el nivel de Bak y sumando la disfunción de la membrana mitocondrial por la pérdida de potencial, se da paso a la liberación del citocromo C.

Otro estudio (Farshori et al., 2022) de la toxicidad de NPsCuO en células epiteliales de vías respiratorias humanas (HEp-2), concluyo que después de exponer a las células por 24 horas a concentraciones de 1-40 $\mu\text{g/mL}$, existe citotoxicidad y alteración de la morfología de las células dependiente de la concentración de NPsCuO (IC_{50} = 10 $\mu\text{g/mL}$), lo que conduce a las células Hep-2 a un estrés oxidante y pérdida del potencial de la membrana mitocondrial que culmina con la muerte apoptótica de las células.

Aunado a lo anterior, las NPsZnO y NPsCuO inducen dos procesos autodestructivos en las células del sistema excretor, la apoptosis y la autofagia. La apoptosis es un proceso de muerte celular, que cumple una función de salud y protección para las células, por el contrario, la autofagia no es un tipo de muerte celular, realmente es un proceso de mantenimiento y supervivencia para las células, que provee de energía a las células con el propósito de evitar que sufran apoptosis (Fan y Zong, 2012; Jung et al., 2020). Entonces que las NPsCuO provoquen la muerte de las células MDCK por dependencia de autofagia, es un evento

que evidencia el daño grave que generan las NPsCuO y que no pueden ser minimizados por la autofagia en un intento de supervivencia y regulación homeostática.

Dentro de esta investigación, se estudiaron los efectos de las NPsZnO y NPsCuO en los estadios del ciclo celular de las células MDCK y AML-12 al ser expuestas de forma aguda a estas nanopartículas, los resultados obtenidos muestran un arresto mayoritario en la fase G2/M que impacta en la distribución de la fase G0/G1 disminuyéndola, con excepción de las células MDCK tratadas con NPsZnO que se arrestan en la fase S. El arresto en el punto de control G2/M podría ocurrir a través de la inhibición de la fosfatasa Stg encargada de eliminar los fosfatos inhibidores y activar las proteínas cinasas CDK1 y CDK2, también, por la baja expresión de la proteína Ciclina B1 (O'Farrell, 2001).

El arresto en la fase G2/M por las NPsZnO ya ha sido documentado en otras líneas celulares distintas a las del sistema excretor, como el estudio de Vallabani et al. (2019), donde concluyen que el arresto en la fase G2/M del ciclo celular de células HaCat, ocurre de forma dependiente de la concentración que va de los 0.5 a 110 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO y lo confirman con un análisis por Western Blot del anticuerpo pCHK1, un marcador específico de arresto celular. Y reportan un aumento en los niveles de fosforilación de CHK1 a las 24 horas de exposición. También, agregan que la sobreproducción de ROS inducido por las NPsZnO genera daño en el ADN lo que promueve la sobreexpresión de p53, por consiguiente, la supresión de CDK2 y la ciclina B1.

Asimismo, L. Li et al. (2016), evaluaron el efecto de 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de NPsZnO en el ciclo celular de células HaCat y determinaron arresto en la fase G2/M de estas células por supresión de CDK1, ciclina B1 y muerte de las células por apoptosis resultado de una sobreproducción de ROS y daño a la mitocondria.

Algunas investigaciones realizadas sobre compuestos hechos a base de cobre y que tienden al desprendimiento de iones Cu^{2+} , han descrito que este metal y sus iones tienden a generar el arresto en la fase G2/M del ciclo celular de diferentes células de cáncer. Se ha documentado que 0.5 a 1 μM de un complejo de idenoisoquinolina de cobre II, es capaz de arrestar a células de cáncer (MDA-MB-231, HeLa y HT-29) en la fase G2/M por distintos factores, el primero por el catión Cu^{2+} , el cual tiene alta afinidad entre los pares de bases del ADN y la capacidad de aumentar la interacción de los pares de bases con el Cu^{+2} , el segundo se debe a la activación de p53 que activa a p21 el inhibidor de la fase G2/M del ciclo celular, y que es capaz de inhibir CDK1 y ciclina B. Otro aspecto que mencionan los autores es que en algunas líneas de cáncer tratadas con las concentraciones bajas (0.5 μM) se registró síntesis de Beclin-1, aumento de LC3-II/LC3-1 y degradación de p62, lo que indica una muerte dependiente de autofagia (Molinaro et al., 2022).

Luo et al. (2014) presentan los resultados de su investigación y demuestran que las NPsCuO en concentraciones que van de los 40 a los 80 $\mu\text{g/mL}$ arrestan a las células HaCaT y MEF en la fase G2/M por desregulación a la baja de las ciclinas A y B. Las NPsCuO activaron a p53 y a la vía de las proteínas cinasas (MAPK/ERK, por sus siglas en inglés), que se asociaron con la protección que las células presentan ante la toxicidad de las NPsCuO. Las células HaCat tratadas con NPsZnO que presentaron arresto en la fase G2/M y fueron reparadas de los daños en el material genético durante el punto de verificación continuaron proliferando y el resto murió.

Debido a que las células MDCK expuestas por 24 horas a las NPsZnO son las únicas que presentan arresto en la fase S, se puede corroborar este efecto con el estudio hecho por He et al. (2018), quienes determinaron que el efecto de NPsZnO con un tamaño promedio de 50 nm y concentraciones de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ suprimen la proliferación de las células de sarcoma humano por arresto en la fase S del ciclo celular y desencadenan la muerte celular al mediar la apoptosis por sobreproducción de ROS. Además de que los iones Zn^{2+} permearon a la célula e iniciaron el proceso de muerte celular.

Zhang et al., (2020) demostró un mecanismo epigenético de los efectos anticancerígenos de distintas concentraciones de NPsZnO que van de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$, en células T24 de cáncer de vejiga, las cuales inducen arresto en la fase S de forma permanente, un efecto antiproliferativo e inhibición en la migración de las células y posteriormente, muerte por apoptosis tardía.

Aunque se comprobó mediante recultivo de las células MDCK que el arresto que presentan en la fase S y G2/M por las NPsZnO y NPsCuO es únicamente citostático y son capaces de continuar proliferando una vez que se retiran las NPs. Esto puede deberse a la inactivación de p21 y activación de CDK1 una vez que se retiran las NPs y antes de entrar a la división celular (Fase M), que participa en promover la reparación del ADN durante la fase G2 y este efecto se ha registrado mayoritariamente en células de riñón debido a abundante presencia de mitocondrias que proveen la energía requerida para el proceso (Molinaro et al., 2022; Vassilev, 2006; H. Zhao et al., 2020) por lo que se puede concluir que el arresto que indujeron las NPsZnO y NPsCuO y los daños generados en el material genético podría ser reparado.

No obstante, el arresto registrado en la fase G2/M de las células AML-12 tratadas por 24 horas con NPsZnO y NPsCuO es indefinido, ya que al recultivar las células se registra su muerte, por lo que el efecto es citotóxico, en este caso es probable que no se active CDK1 para reparar el daño generado y puede atribuirse al daño mayor que causan las NPs en esta línea celular, puesto que las células AML-12 de

acuerdo a su morfología e IC_{50} son más susceptibles a efectos tóxicos por la exposición aguda a las NPs a diferencia de las células MDCK.

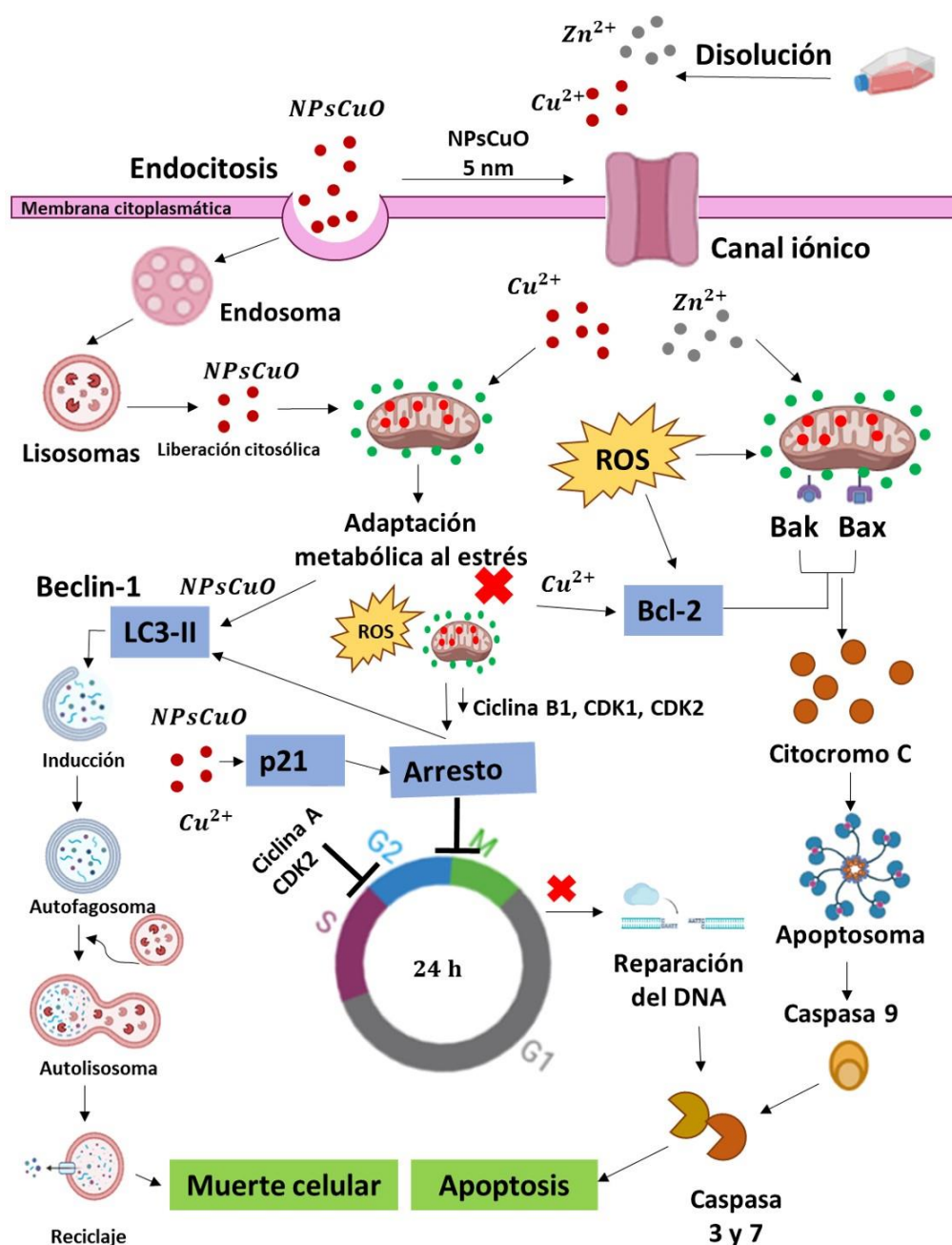


Figura 40. Mecanismo biológico propuesto para la reducción de la viabilidad de las células MDCK y AML-12 expuestas por 24 horas a las NPsZnO y NPsCuO. Las células MDCK y AML-12 al ser tratadas con NPsZnO reducen su viabilidad por acción de los iones Zn^{2+} , sobreproducción de ROS y despolarización de la membrana mitocondrial, lo que activa la vía intrínseca de la apoptosis y a su vez el arresto en la fase S de las células MDCK y en la fase G2/M de las células AML-12. Las células MDCK pueden reparar el daño al ADN, a diferencia de las células AML-12 que no lo hacen. Los iones Cu^{2+} provenientes de las NPsCuO desencadenan una adaptación metabólica al estrés generado por ROS y la despolarización de la membrana mitocondrial, que a su vez activa la autofagia y arresto en la fase G2/M del ciclo celular de las células de riñón MDCK, luego se induce la muerte celular dependiente de autofagia. Las NPsCuO provocan en las células de hígado AML-12 adaptación metabólica al estrés generado por ROS y despolarización de la membrana mitocondrial, arresto en la fase G2/M sin reparación del daño al ADN, y por consiguiente muerte apoptótica. (Creada por la autora en Power Point y BioRender.com)

Para finalizar, en la **Figura 40**, se propone el mecanismo biológico que reduce la viabilidad de las células MDCK y AML expuestas de forma aguda a las NPsZnO y NPsCuO, para lo cual de forma general se establecen las siguientes pautas:

- I. Disolución de los Zn^{2+} / Cu^{2+} de las NPs
- II. Internalización de los iones a las células y de las NPsCuO en las células AML-12
- III. Estrés oxidante y adaptación metabólica
- IV. Despolarización de la membrana mitocondrial y liberación del Citocromo C al citosol
- V. Activación de apoptosis; y autofagia para las células MDCK expuestas a NPsCuO
- VI. Arresto celular en la fase G2/M; y fase S para las células MDCK expuesta a las NPsZnO
- VII. Muerte celular por apoptosis y por dependencia de autofagia

Capítulo 5. Conclusión

La viabilidad de las células de riñón MDCK e hígado AML-12, expuestas de forma aguda a las NPsZnO y NPsCuO, decrementa de forma dependiente de la concentración de NPs evaluadas. La morfología de las células se altera conforme aumenta la concentración de nanopartículas, principalmente, se identifica la reducción de tamaño, cambio en la morfología y menor densidad celular; lo que corrobora el efecto citotóxico que induce la exposición aguda de las células a las NPs aquí evaluadas. De acuerdo con los datos de la IC₅₀ y los cambios morfológicos las NPsCuO son más tóxicas que las NPsZnO, y las células más susceptibles son las AML-12 de hígado.

El tipo de muerte inducido en las células AML-12 por las NPsZnO y NPsCuO es por apoptosis temprana independiente de la concentración de nanopartículas, sin embargo, las NPsCuO inducen muerte dependiente de autofagia en las células de riñón MDCK. La muerte apoptótica de las células MDCK expuestas a las NPsZnO se acompaña por una sobreproducción de ROS, seguido de un decremento del potencial de la membrana mitocondrial y alteraciones en los estadios del ciclo celular con una disminución en la distribución de la fase G0/G1 y aumento en la fase S por la interacción con las NPsZnO y la permeabilidad de los iones Zn²⁺. Al parecer no existe internalización de las NPs.

La exposición de las células MDCK a las NPsCuO, induce un decremento en la producción de ROS, decremento del potencial de la membrana mitocondrial, arresto en la fase G2/M, estas alteraciones se inducen tanto por los iones Cu²⁺ como por la interacción con las NPsCuO desde la membrana externa, ya que estas no internalizan a las células, lo que se asocia con el tipo de muerte celular dependiente de autofagia. Por otro lado, la muerte apoptótica de las células AML-12 expuesta a las NPsZnO y NPsCuO se lleva a cabo por procesos similares, en ambas el potencial de la membrana mitocondrial decrementa, se induce un arresto en la fase G2/M, pero las NPsZnO no se internalizan a las células AML-12 y únicamente se favorece la permeabilización de los iones Zn²⁺, lo que genera una sobreproducción de ROS, en cambio, las NPsCuO de tamaños menores o igual a los 5 nm internalizan a las células AML-12 y los iones Cu²⁺ no permean a las células y las ROS decremantan.

De acuerdo con lo anterior, la hipótesis planteada se acepta, ya que la exposición aguda de las células epiteliales sanas de hígado (AML-12) y riñón (MDCK) a diferentes concentraciones de NPsZnO y NPsCuO si reducen su viabilidad de manera dependiente de la concentración, debido al decremento en el potencial de la membrana mitocondrial y al arresto en los estadios del ciclo celular.

Literatura citada

- Abudayyak, M., Guzel, E., and Özhan, G. 2020. Cupric Oxide Nanoparticles Induce Cellular Toxicity in Liver and Intestine Cell Lines. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(2). doi: 10.34172/apb.2020.025
- Ahamed, M., Javed Akhtar, Kumar, Khan, M., Ahmad, and Alrokayan. 2012. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 845. doi: 10.2147/IJN.S29129
- Albanese, A., Tang, P. S., and Chan, W. C. W. 2012. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14(1), pp. 1–16. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124
- Anjum, S., Hashim, M., Malik, S. A., Khan, M., Lorenzo, J. M., Abbasi, B. H., and Hano, C. 2021. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers*, 13(18), pp. 4570. doi: 10.3390/cancers13184570
- Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D., and Krishnan, K. M. 2015. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 44(23). doi: 10.1039/C5CS00541H
- Arora, S., Rajwade, J. M., and Paknikar, K. M. 2012. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(2). doi: 10.1016/j.taap.2011.11.010
- Assadian, E., Zarei, M. H., Gilani, A. G., Farshin, M., Degampanah, H., and Pourahmad, J. 2018. Toxicity of Copper Oxide (CuO) Nanoparticles on Human Blood Lymphocytes. *Biological Trace Element Research*, 184(2). doi: 10.1007/s12011-017-1170-4
- Barnett, L. M. A. and Cummings, B. S. 2018. Nephrotoxicity and Renal Pathophysiology: A Contemporary Perspective. *Toxicological Sciences*, 164(2), pp. 379–390. doi: 10.1093/toxsci/kfy159
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., and Mahmoudi, M. 2017. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), pp. 4218–4244. doi: 10.1039/C6CS00636A
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., and Kahru, A. 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology*, 87(7). doi: 10.1007/s00204-013-1079-4
- Boverhof, D. R., Bramante, C. M., Butala, J. H., Clancy, S. F., Lafranconi, M., West, J., and Gordon, S. C. 2015. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1). doi: 10.1016/j.yrtph.2015.06.001

- Bugata, L. S. P., Pitta Venkata, P., Gundu, A. R., Mohammed Fazlur, R., Reddy, U. A., Kumar, J. M., Mekala, V. R., Bojja, S., and Mahboob, M. 2019. Acute and subacute oral toxicity of copper oxide nanoparticles in female albino Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 39(5). doi: 10.1002/jat.3760
- Chan, W. C. W. 2006. Bionanotechnology Progress and Advances. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 12(1). doi: 10.1016/j.bbmt.2005.10.004
- Chen, A., Feng, X., Sun, T., Zhang, Y., An, S., and Shao, L. 2016. Evaluation of the effect of time on the distribution of zinc oxide nanoparticles in tissues of rats and mice: a systematic review. *IET Nanobiotechnology*, 10(3), pp. 97–106. doi: 10.1049/iet-nbt.2015.0006
- Demir, E., Creus, A., and Marcos, R. 2014. Genotoxicity and DNA Repair Processes of Zinc Oxide Nanoparticles. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77(21). doi: 10.1080/15287394.2014.935540
- Dykes, P. 2015. Increase in skin surface elasticity in normal volunteer subjects following the use of copper oxide impregnated socks. *Skin Research and Technology*, 21(3), pp. 272–277. doi: 10.1111/srt.12187
- El-Batal, A. I., El-Sayyad, G. S., Mosallam, F. M., and Fathy, R. M. 2020. Penicillium chrysogenum-Mediated Mycogenic Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Gamma Rays for In Vitro Antimicrobial Activity Against Some Plant Pathogens. *Journal of Cluster Science*, 31(1), pp. 79–90. doi: 10.1007/s10876-019-01619-3
- El Bialy, B. E., Hamouda, R. A., Abd Eldaim, M. A., El Ballal, S. S., Heikal, H. S., Khalifa, H. K., and Hozzein, W. N. 2020. <p>Comparative Toxicological Effects of Biologically and Chemically Synthesized Copper Oxide Nanoparticles on Mice</p>. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15. doi: 10.2147/IJN.S241922
- Fan, Y.-J. and Zong, W.-X. 2012. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Chinese Journal of Cancer*. doi: 10.5732/cjc.012.10106
- Farshori, N. N., Siddiqui, M. A., Al-Oqail, M. M., Al-Sheddi, E. S., Al-Massarani, S. M., Ahamed, M., Ahmad, J., and Al-Khedhairi, A. A. 2022. Copper Oxide Nanoparticles Exhibit Cell Death Through Oxidative Stress Responses in Human Airway Epithelial Cells: a Mechanistic Study. *Biological Trace Element Research*. doi: 10.1007/s12011-022-03107-8
- Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death & Differentiation*, 22(3), pp. 377–388. doi: 10.1038/cdd.2014.150
- Fuhrmann, D. C. and Brüne, B. 2017. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biology*, 12, pp. 208–215. doi: 10.1016/j.redox.2017.02.012
- Gravelly, M., Kindopp, A., Hubert, L., Card, M., Nadeem, A., Miller, C., and Roxbury, D. 2022. Aggregation Reduces Subcellular Localization and Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Applied Materials & Interfaces*. doi: 10.1021/acsami.2c02238

- Guan, R., Kang, T., Lu, F., Zhang, Z., Shen, H., and Liu, M. 2012. Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), pp. 602. doi: 10.1186/1556-276X-7-602
- Guillermo Foladori, Edgar Arteaga Figueroa, Edgar Záyago Lau, Richard Applebaum, Eduardo Robles-Belmont, Laura Liliana Villa Vásquez, Rachel Parker, V. L. 2017. La política pública de nanotecnología en México. *Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad*, 12(34), pp. 51–64.
- Häcker, G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 301(1), pp. 5–17. doi: 10.1007/s004410000193
- Hassanen, E. I., Tohamy, A., Issa, M. Y., Ibrahim, M. A., Farroh, K. Y., and Hassan, A. M. 2019. <p>Pomegranate Juice Diminishes The Mitochondria-Dependent Cell Death And NF-κB Signaling Pathway Induced By Copper Oxide Nanoparticles On Liver And Kidneys Of Rats</p>. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14. doi: 10.2147/IJN.S229461
- Hassoun, E. and Mettling, C. 2015. Dichloroacetate and Trichloroacetate Toxicity in AML12 Cells: Role of Oxidative Stress. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29(11), pp. 508–512. doi: 10.1002/jbt.21720
- He, G., Ma, Y., Zhu, Y., Yong, L., Liu, X., Wang, P., Liang, C., Yang, C., Zhao, Z., Hai, B., Pan, X., Liu, Z., Liu, X., and Mao, C. 2018. Cross Talk Between Autophagy and Apoptosis Contributes to ZnO Nanoparticle-Induced Human Osteosarcoma Cell Death. *Advanced Healthcare Materials*, 7(17), pp. 1800332. doi: 10.1002/adhm.201800332
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., and Bao, G. 2016. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*, 11(6), pp. 673–692. doi: 10.2217/nnm.16.5
- Hufnagel, M., Neuberger, R., Wall, J., Link, M., Friesen, A., and Hartwig, A. 2021. Impact of Differentiated Macrophage-Like Cells on the Transcriptional Toxicity Profile of CuO Nanoparticles in Co-Cultured Lung Epithelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). doi: 10.3390/ijms22095044
- Iavicoli, I., Fontana, L., and Nordberg, G. 2016a. The effects of nanoparticles on the renal system. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(6), pp. 490–560. doi: 10.1080/10408444.2016.1181047
- Iavicoli, I., Fontana, L., and Nordberg, G. 2016b. The effects of nanoparticles on the renal system. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(6). doi: 10.1080/10408444.2016.1181047
- Jiang, J., Pi, J., and Cai, J. 2018. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018. doi: 10.1155/2018/1062562
- Joshi, A., Rastedt, W., Faber, K., Schultz, A. G., Bulcke, F., and Dringen, R. 2016. Uptake and Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles in C6 Glioma Cells. *Neurochemical Research*, 41(11). doi: 10.1007/s11064-016-2020-z

- Jung, S., Jeong, H., and Yu, S.-W. 2020. Autophagy as a decisive process for cell death. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(6), pp. 921–930. doi: 10.1038/s12276-020-0455-4
- Katsumiti, A., Thorley, A. J., Arostegui, I., Reip, P., Valsami-Jones, E., Tetley, T. D., and Cajaraville, M. P. 2018. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. *Toxicology in Vitro*, 48. doi: 10.1016/j.tiv.2018.01.013
- Kermanizadeh, A., Pojana, G., Gaiser, B. K., Birkedal, R., Bilanićová, D., Wallin, H., Jensen, K. A., Sellergren, B., Hutchison, G. R., Marcomini, A., and Stone, V. 2012. In vitro assessment of engineered nanomaterials using a hepatocyte cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory cytokines and functional markers. *Nanotoxicology*, 7(3). doi: 10.3109/17435390.2011.653416
- Kermanizadeh, A., Vranic, S., Boland, S., Moreau, K., Baeza-Squiban, A., Gaiser, B. K., Andrzejczuk, L. A., and Stone, V. 2013. An in vitro assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrology*, 14(1). doi: 10.1186/1471-2369-14-96
- Kim, K.-B., Kim, Y. W., Lim, S. K., Roh, T. H., Bang, D. Y., Choi, S. M., Lim, D. S., Kim, Y. J., Baek, S.-H., Kim, M.-K., Seo, H.-S., Kim, M.-H., Kim, H. S., Lee, J. Y., Kacew, S., and Lee, B.-M. 2017. Risk assessment of zinc oxide, a cosmetic ingredient used as a UV filter of sunscreens. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(3), pp. 155–182. doi: 10.1080/10937404.2017.1290516
- Kimura, T., Isaka, Y., and Yoshimori, T. 2017. Autophagy and kidney inflammation. *Autophagy*, 13(6), pp. 997–1003. doi: 10.1080/15548627.2017.1309485
- Kononenko, V., Repar, N., Marušič, N., Drašler, B., Romih, T., Hočevár, S., and Drobne, D. 2017. Comparative in vitro genotoxicity study of ZnO nanoparticles, ZnO macroparticles and ZnCl₂ to MDCK kidney cells: Size matters. *Toxicology in Vitro*, 40. doi: 10.1016/j.tiv.2017.01.015
- Li, L., Ma, N., Zhou, H., Wang, Q., Zhang, H., Wang, P., Hou, H., Wen, H., and Gao, F. 2016. Zinc oxide nanoparticles-induced epigenetic change and G2/M arrest are associated with apoptosis in human epidermal keratinocytes. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, pp. 3859–3874. doi: 10.2147/IJN.S107021
- Li, M., Zou, P., Tyner, K., and Lee, S. 2017. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pharmaceutical Nanoparticles. *The AAPS Journal*, 19(1). doi: 10.1208/s12248-016-0010-3
- Li, Y., Hong, M., Lin, Y., Bin, Q., Lin, Z., Cai, Z., and Chen, G. 2012. Highly sensitive electrochemical immunoassay for H1N1 influenza virus based on copper-mediated amplification. *Chemical Communications*, 48(52). doi: 10.1039/c2cc31990j
- Li, Z., Guo, D., Yin, X., Ding, S., Shen, M., Zhang, R., Wang, Y., and Xu, R. 2020. Zinc oxide nanoparticles induce human multiple myeloma cell death via reactive oxygen species and Cyt-C/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 signaling pathway in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 122, pp. 109712. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109712

- Liu, Z., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Miao, L., Lv, B., Yang, Y., You, G., Xu, Y., Zhang, M., and Ci, H. 2018. Aggregation, sedimentation, and dissolution of CuO and ZnO nanoparticles in five waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(31). doi: 10.1007/s11356-018-3123-7
- Luo, C., Li, Y., Yang, L., Long, J., Zheng, Y., Liu, J., Xiao, S., and Jia, J. 2014. Activation of Erk and p53 regulates copper oxide nanoparticle-induced cytotoxicity in keratinocytes and fibroblasts. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 4763. doi: 10.2147/IJN.S67688
- Ma, Y., Zhang, J., Zhang, Q., Chen, P., Song, J., Yu, S., Liu, H., Liu, F., Song, C., Yang, D., and Liu, J. 2014. Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 448(1), pp. 8–14. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.007
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., and Kroemer, G. 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), pp. 81–94. doi: 10.1038/nrm3735
- Mishra, P. K., Mishra, H., Ekielski, A., Talegaonkar, S., and Vaidya, B. 2017. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 22(12). doi: 10.1016/j.drudis.2017.08.006
- Molinaro, C., Wambang, N., Bousquet, T., Vercoutter-Edouart, A.-S., Pélinski, L., Cailliau, K., and Martoriati, A. 2022. A Novel Copper(II) Indenoisoquinoline Complex Inhibits Topoisomerase I, Induces G2 Phase Arrest, and Autophagy in Three Adenocarcinomas. *Frontiers in Oncology*, 12. doi: 10.3389/fonc.2022.837373
- Navarro, J. A. and Schneuwly, S. 2017. Copper and Zinc Homeostasis: Lessons from *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Genetics*, 8. doi: 10.3389/fgene.2017.00223
- Navya, P. N. and Daima, H. K. 2016. Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Convergence*, 3(1). doi: 10.1186/s40580-016-0064-z
- Naz, S., Gul, A., and Zia, M. 2020. Toxicity of copper oxide nanoparticles: a review study. *IET Nanobiotechnology*, 14(1), pp. 1–13. doi: 10.1049/iet-nbt.2019.0176
- O'Farrell, P. H. 2001. Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends in Cell Biology*, 11(12), pp. 512–519. doi: 10.1016/S0962-8924(01)02142-0
- Parzych, K. R. and Klionsky, D. J. 2014. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), pp. 460–473. doi: 10.1089/ars.2013.5371
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., and Tzur, A. 2012. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death & Disease*, 3(11), pp. e430–e430. doi: 10.1038/cddis.2012.171

- Pujalté, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Tréguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtès, C., and L'Azou, B. 2011. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1), pp. 10. doi: 10.1186/1743-8977-8-10
- Reddy, A. R. N. and Lonkala, S. 2019. In vitro evaluation of copper oxide nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative stress using human embryonic kidney cells. *Toxicology and Industrial Health*, 35(2). doi: 10.1177/0748233718819371
- Rodhe, Y., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Potáková, Z., and Möller, L. 2015. Copper-based nanoparticles induce high toxicity in leukemic HL60 cells. *Toxicology in Vitro*, 29(7). doi: 10.1016/j.tiv.2015.05.020
- Saldívar Tanaka, L. 2019. Regulación blanda, normas técnicas y armonización regulatoria internacional, para la nanotecnología. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 13(24). doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2020.24.69621
- Sánchez, V. 2018. Los grandes riesgos de las nanopartículas. Consultado el 18 agosto de 2021 de: <http://www.cienciamx.com/index.php/tecnologia/nanotecnologia/20567-grandes-riesgos-nanoparticulas>
- Shakeel, M., Jabeen, F., Shabbir, S., Asghar, M. S., Khan, M. S., and Chaudhry, A. S. 2016. Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. *Biological Trace Element Research*, 172(1). doi: 10.1007/s12011-015-0550-x
- Sharma, V., Anderson, D., and Dhawan, A. 2012. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, 17(8), pp. 852–870. doi: 10.1007/s10495-012-0705-6
- Simons, K., Virta, H. 2006. In *Cell Biology A Laboratory Handbook*. Ed.: J. E. Celis (ed.). Academic Press.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G. G., Wright, C. J., and Doak, S. H. 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23–24), pp. 3891–3914. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.009
- Singh, S. 2019. Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(4), pp. 300–311. doi: 10.1080/15376516.2018.1553221
- Stankic, S., Suman, S., Haque, F., and Vidic, J. 2016. Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1). doi: 10.1186/s12951-016-0225-6
- Tang, K. S. 2019. The current and future perspectives of zinc oxide nanoparticles in the treatment of diabetes mellitus. *Life Sciences*, 239. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117011
- Thamer, N. A., Muftin, N. Q., and Al-Rubae, S. H. N. 2018. Optimization Properties and Characterization of

Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Cordia myxa* L. Leaves. *Asian Journal of Chemistry*, 30(7), pp. 1559–1563. doi: 10.14233/ajchem.2018.21242

- Thongkam, W., Gerloff, K., van Berlo, D., Albrecht, C., and Schins, R. P. F. 2017. Oxidant generation, DNA damage and cytotoxicity by a panel of engineered nanomaterials in three different human epithelial cell lines. *Mutagenesis*, 32(1). doi: 10.1093/mutage/gew056
- Tomaev, V. V., Polishchuk, V. A., Vartanyan, T. A., and Vasil'ev, E. A. 2019. Surface Plasmon Resonance in Zinc Nanoparticles. *Glass Physics and Chemistry*, 45(3), pp. 238–241. doi: 10.1134/S1087659619030155
- Uzar, N. K., Abudayyak, M., Akcay, N., Algun, G., and Özhan, G. 2015. Zinc oxide nanoparticles induced cyto- and genotoxicity in kidney epithelial cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(4). doi: 10.3109/15376516.2015.1045654
- V.G., R. and P.V., M. 2017. Cellular interactions of zinc oxide nanoparticles with human embryonic kidney (HEK 293) cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, pp. 182–190. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.069
- Vallabani, N. V. S., Sengupta, S., Shukla, R. K., and Kumar, A. 2019. ZnO nanoparticles-associated mitochondrial stress-induced apoptosis and G2/M arrest in HaCaT cells: a mechanistic approach. *Mutagenesis*, 34(3), pp. 265–277. doi: 10.1093/mutage/gez017
- Vassilev, L. T. 2006. Cell Cycle Synchronization at the G₂/M Phase Border by Reversible Inhibition of CDK1. *Cell Cycle*, 5(22), pp. 2555–2556. doi: 10.4161/cc.5.22.3463
- Wang, L., Guo, D., Wang, Z., Yin, X., Wei, H., Hu, W., Chen, R., and Chen, C. 2020. Zinc oxide nanoparticles induce human tenon fibroblast apoptosis through reactive oxygen species and caspase signaling pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 683, pp. 108324. doi: 10.1016/j.abb.2020.108324
- Wang, S.-W., Lee, C.-H., Lin, M.-S., Chi, C.-W., Chen, Y.-J., Wang, G.-S., Liao, K.-W., Chiu, L.-P., Wu, S.-H., Huang, D.-M., Chen, L., and Shen, Y.-S. 2020. ZnO Nanoparticles Induced Caspase-Dependent Apoptosis in Gingival Squamous Cell Carcinoma through Mitochondrial Dysfunction and p70S6K Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), pp. 1612. doi: 10.3390/ijms21051612
- Wang, X., Chang, C. H., Jiang, J., Liu, X., Li, J., Liu, Q., Liao, Y., Li, L., Nel, A. E., and Xia, T. 2020. Mechanistic Differences in Cell Death Responses to Metal-Based Engineered Nanomaterials in Kupffer Cells and Hepatocytes. *Small*, 16(21), pp. 2000528. doi: 10.1002/smll.202000528
- Wang, X., Sun, T., Zhu, H., Han, T., Wang, J., and Dai, H. 2020. Roles of pH, cation valence, and ionic strength in the stability and aggregation behavior of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Environmental Management*, 267, pp. 110656. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110656

- Wang, Y., Aker, W. G., Hwang, H., Yedjou, C. G., Yu, H., and Tchounwou, P. B. 2011. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. *Science of The Total Environment*, 409(22), pp. 4753–4762. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.039
- Wu, Y., Sun, X.-J., Jia, Y.-P., and Li, D.-B. 2018. Review of improved spectral response of ultraviolet photodetectors by surface plasmon. *Chinese Physics B*, 27(12), pp. 126101. doi: 10.1088/1674-1056/27/12/126101
- Zhang, C., Liu, Z., Zhang, Y., Ma, L., Song, E., and 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(3). doi: 10.1038/s41419-020-2384-5
- Zhang, T., Du, E., Liu, Y., Cheng, J., Zhang, Z., Xu, Y., Qi, S., and Chen, Y. 2020. Anticancer Effects of Zinc Oxide Nanoparticles Through Altering the Methylation Status of Histone on Bladder Cancer Cells. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, pp. 1457–1468. doi: 10.2147/IJN.S228839
- Zhao, H., Jiang, N., Han, Y., Yang, M., Gao, P., Xiong, X., Xiong, S., Zeng, L., Xiao, Y., Wei, L., Li, L., Li, C., Yang, J., Tang, C., Xiao, L., Liu, F., Liu, Y., and Sun, L. 2020. Aristolochic acid induces renal fibrosis by arresting proximal tubular cells in G2/M phase mediated by HIF-1 α . *The FASEB Journal*, 34(9), pp. 12599–12614. doi: 10.1096/fj.202000949R
- Zhao, M., Wang, Y., Li, L., Liu, S., Wang, C., Yuan, Y., Yang, G., Chen, Y., Cheng, J., Lu, Y., and Liu, J. 2021. Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance. *Theranostics*, 11(4), pp. 1845–1863. doi: 10.7150/thno.50905