

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados.

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Evaluación toxicológica de nanopartículas de óxido de zinc
presentes en productos alimenticios en un modelo *in vitro* de
colon**

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

Presenta:

Salma López Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Salma López Rodríguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Directora de tesis

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Ernestina Castro Longoria



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Salma López Rodríguez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Evaluación toxicológica de nanopartículas de óxido de zinc presentes en productos alimenticios en un modelo in vitro de colon

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Directora de tesis

El desarrollo de los nanomateriales ha derivado en importantes avances tecnológicos que representan una ventaja en muchos aspectos de la vida diaria, pero su presencia en la cotidianidad también implica un riesgo toxicológico para los seres humanos expuestos a la ingesta de nanomateriales que pueden encontrarse en alimentos y bebidas como aditivos utilizados en la industria alimentaria. Tras ser ingeridos, los nanomateriales ocasionan la activación de mecanismos de estrés celular y, en consecuencia, potenciales enfermedades gastrointestinales. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto de dos formulaciones distintas de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs), formulación en suspensión y en polvo, en la línea celular de cáncer de colon HT-29. Las ZnO NPs se caracterizaron por espectrofotometría UV-vis, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de luz (DLS). Se evaluó in vitro la citotoxicidad de las nanopartículas por reducción de resazurina y se comparó su potencial citotóxico al ser tratadas con un agente quelante. Así mismo, se evaluó la internalización celular, los efectos en el ciclo celular y la activación de mecanismos de apoptosis en la línea celular HT-29. También se estimó la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), con y sin tratamiento de quelación, y la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Además, se llevaron a cabo ensayos con eritrocitos para evaluar la hemocompatibilidad de las ZnO NPs. Se encontró que las ZnO NPs en suspensión tienen un tamaño promedio mayor a la presentación en polvo y que, en general, las ZnO NPs en polvo parecen ser más citotóxicas. Se identificó que la actividad de la enzima SOD mantuvo al margen la producción de ROS por lo que no se presentaron condiciones de estrés oxidativo y que ambas formulaciones de ZnO NPs ocasionan la paralización de la viabilidad relacionado con el arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 por acción de los iones Zn^{2+} y no por la internalización de las nanopartículas que resultó ser mínima. Se determinó que las concentraciones evaluadas de ambas presentaciones de ZnO NPs son hemolíticas. Los resultados de este trabajo plantean un mecanismo de citotoxicidad alternativo para las ZnO NPs.

Palabras clave: nanomateriales, industria alimentaria, nanopartículas de óxido de zinc, citotoxicidad, ciclo celular

Abstract of the thesis presented by **Salma López Rodríguez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanosciences.

Toxicological evaluation of zinc oxide nanoparticles found in food products in an in vitro model of colon

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Thesis Director

Development of nanomaterials has led to important technological advances that represent an advantage in many aspects of daily life, but their presence also implies a toxicological risk for humans exposed to the ingestion of nanomaterials that can be found in food and beverages as additives used in food industry. After being ingested, nanomaterials cause the activation of cellular stress mechanisms and, consequently, potential gastrointestinal diseases. Therefore, in this study, the effect of two different formulations of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), suspension and powder formulation, on colon cancer cell line HT-29 was evaluated. ZnO NPs were characterized by UV-vis spectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM), and dynamic light scattering (DLS). The cytotoxicity of nanoparticles was evaluated in vitro by a resazurin reduction assay and it was compared with their cytotoxic potential when treated with a chelating agent. Likewise, cell internalization, effects on the cell cycle and activation of apoptosis mechanisms were evaluated. Production of reactive oxygen species (ROS), with and without chelation treatment, and the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) were also estimated. In addition, erythrocyte assays were carried out to assess the hemocompatibility of ZnO NPs. It was found that suspension ZnO NPs have a larger average size than the powder presentation and that, in general, powder ZnO NPs seemed to be more cytotoxic. It was identified that SOD activity kept the production of ROS in balance, so that no oxidative stress conditions were presented and that both formulations of ZnO NPs cause a stagnation in viability related to the arrest of the cell cycle in the G0/G1 phase by the action of Zn^{2+} ions and not by internalization of the nanoparticles, which was minimal. It was determined that the evaluated concentrations of both presentations of ZnO NPs are hemolytic. The results of this work suggest an alternative mechanism for ZnO NPs' cytotoxicity.

Keywords: nanomaterials, food industry, zinc oxide nanoparticles, cytotoxicity, cell cycle

Dedicatoria

Para todos los valientes que luchan por sus sueños

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de ser alumna del Posgrado en Nanociencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por respaldar mis estudios de maestría con una beca bajo mi número de CVU 1036813.

Al SINANOTOX (CONACYT PN-2017- 01-4710), al proyecto CONACYT 269071 y al Proyecto Cátedras No. 53 por los fondos proporcionados para mi investigación en nanotoxicología.

A todos quienes fueron mis maestros durante el tiempo de cursos del posgrado por compartir conmigo su conocimiento y experiencia.

Al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM), por abrirme las puertas de sus laboratorios y darme acceso a su infraestructura para la realización de mi proyecto. Gracias en particular al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por ser un gran jefe de departamento y siempre estar al pendiente de nuestras necesidades como científicos en formación.

Al Dr. Diego Delgado del Laboratorio Nacional de Microscopía (LNMA-CICESE) por ser mi guía en la adquisición de las imágenes por microscopía confocal y por las charlas enriquecedoras sobre los errores, el aprendizaje y la ciencia.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria de CICESE y al Dr. Josué Mota Morales de CFATA-UNAM, por su colaboración con las micrografías de TEM.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt, la Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández y la Dra. Ernestina Castro Longoria por sus valiosas y amables aportaciones al desarrollo de mi proyecto.

A mis compañeros pasados y actuales del grupo Nanotox Lab, por ser mis maestros con su ejemplo y por darme una mano ante cualquier eventualidad.

A mis amigos de Bionano, Leo, Jorge y Eli, por su encantadora compañía, su empatía y su paciencia al escuchar. Gracias por ofrecerme amistad sincera.

A mis amigos del Posgrado en Nanociencias, Carlos, Lalo, Luly, Javier, Gerardo y Marina por congeniar tan bien conmigo desde el primer momento y por todos los buenos ratos de fiesta y café que pasamos juntos.

A mi amiga Aidee, por siempre estar y seguir siendo mi incondicional a pesar de los años y las diferencias en nuestras rutinas.

A mi familia, Salomón, Alma y Alondra, por apoyarme en absolutamente todo y estar orgullosos de mí sin importar las circunstancias.

A Rosita, mi amorosa abuela, quien no pierde oportunidad de demostrarme su cariño y apoyo a pesar de la distancia.

A Paco, por atesorar mis más íntimos deseos y temores. Gracias por tenerme presente en cada uno de tus planes y acompañarme a descubrir todos los matices de la vida que soñamos juntos.

Finalmente, gracias infinitas a mi gran mentora y amiga, la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno. Gracias por tanta confianza en mí y en mis capacidades. Gracias por mostrarme la cara más amigable, resiliente y humana de la ciencia. Gracias por tanta formación y diversión. La quiero y admiro siempre.

Gracias a todos, este logro es tan suyo como mío.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xiii
Lista de ecuaciones.....	xiv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Los nanomateriales y sus aplicaciones.....	1
1.2 Exposición humana a nanomateriales	1
1.3 Riesgo por ingestión de nanomateriales.....	2
1.4 Los nanomateriales a través del aparato digestivo.....	3
1.5 Mecanismos de absorción intestinal e internalización celular	4
1.6 Citotoxicidad y efectos en el ciclo celular	6
1.7 Antecedentes	7
1.7.1 Potenciales consecuencias en la salud por ingestión de nanomateriales	7
1.7.2 Efecto de los nanomateriales en la función intestinal	7
1.7.3 Vías de internalización de nanomateriales en células intestinales.....	9
1.7.4 Principales mecanismos de citotoxicidad inducida por nanomateriales	10
1.8 Hipótesis.....	13
1.9 Objetivos	13
1.9.1 Objetivo general	13
1.9.2 Objetivos específicos.....	13
Capítulo 2. Metodología.....	14
2.1 Origen y preparación de las nanopartículas	14
2.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	14
2.2.1 Espectroscopia UV-Vis.....	14
2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	15
2.2.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)	15
2.3 Cultivo celular.....	16

2.3.1	Líneas celulares	16
2.3.2	Descongelamiento de células.....	16
2.3.3	Subcultivo y mantenimiento celular	16
2.3.4	Conteo celular por el método de exclusión por azul tripano.....	17
2.4	Evaluaciones de biocompatibilidad de las nanopartículas	18
2.4.1	Evaluación de la viabilidad celular por reducción de resazurina	18
2.4.2	Evaluación de la contribución de los iones Zn^{2+} a la citotoxicidad.....	20
2.4.3	Determinación de la hemocompatibilidad de las nanopartículas	20
2.4.4	Evaluación de los cambios morfológicos por exposición a las nanopartículas	21
2.4.5	Determinación del tipo de muerte celular inducido por las nanopartículas	22
2.5	Evaluaciones de arresto celular e internalización de las nanopartículas.....	24
2.5.1	Evaluación del efecto de las nanopartículas en el ciclo celular	24
2.5.2	Determinación de la internalización de las nanopartículas	26
2.6	Determinación de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas	26
2.6.1	Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno	26
2.6.2	Evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa	28
Capítulo 3.	Resultados	30
3.1	Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	30
3.1.1	Espectroscopia UV-Vis.....	30
3.1.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	30
3.1.3	Dispersión dinámica de luz (DLS)	31
3.2	Evaluaciones de biocompatibilidad.....	32
3.2.1	Evaluación de la viabilidad celular por reducción de resazurina	32
3.2.2	Evaluación de la contribución de los iones Zn^{2+} a la citotoxicidad.....	33
3.2.3	Determinación de la hemocompatibilidad de las nanopartículas	34
3.2.4	Evaluación de cambios morfológicos por exposición a las nanopartículas	35
3.2.5	Determinación del tipo de muerte celular inducido por las nanopartículas	39
3.3	Evaluaciones de arresto celular e internalización de las nanopartículas.....	41
3.3.1	Evaluación del efecto de las nanopartículas en el ciclo celular	41
3.3.2	Evaluación de la internalización de las nanopartículas.....	43
3.4	Determinación de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas	44
3.4.1	Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno	44
3.4.2	Evaluación de la actividad de superóxido dismutasa.....	51

Capítulo 4. Discusión.....	53
4.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	53
4.2 Evaluaciones de biocompatibilidad.....	54
4.3 Evaluaciones de arresto celular e internalización de las nanopartículas.....	58
4.4 Determinación de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas	59
4.5 Propuesta de mecanismo de citotoxicidad de las ZnO NPs	63
 Capítulo 5. Conclusiones	66
 Literatura citada	67
 Anexos	72

Lista de figuras

Figura	Página
1. Principales vías de exposición a nanomateriales. vía inhalatoria, vía oral y vía dérmica	2
2. Ciclo de contaminación por el uso de nanomateriales en la industria alimentaria y su potencial impacto en la salud humana. NMs: nanomateriales.	3
3. Posibles mecanismos de absorción intestinal e internalización celular de los nanomateriales ingeridos.....	5
4. Diagrama del orden y composición de las barreras intestinales.	8
5. Efectos de los nanomateriales en la estructura y función intestinal.	8
6. Internalización de nanopartículas a lo largo del ciclo celular.	12
7. Representación de los cuadrantes en la cámara de <i>Neubauer</i>	17
8. Reacción de reducción de resazurina a resorufina.	18
9. Esquema del marcaje por yoduro de propidio y anexina V para la identificación de las células en apoptosis temprana y apoptosis tardía por citometría de flujo.	23
10. Contenido de DNA en cada fase del ciclo celular de una célula sana.	25
11. Espectros de absorbancia UV-Vis de las ZnO NPs en suspensión y en polvo.....	30
12. Imágenes obtenidas por TEM e histogramas de distribución de tamaños de las ZnO NPs en suspensión y en polvo.	31
13. Viabilidad celular, asociada a la reducción de resazurina, de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión y en polvo durante 24, 48 y 72 horas.....	33
14. Comparación de la viabilidad celular, asociada a la reducción de resazurina, de la línea HT-29 expuesta durante 24 horas a ZnO NPs en suspensión y en polvo, dispersadas y previamente incubadas con EDTA 1 mM.....	34
15. Porcentajes de hemocompatibilidad de las concentraciones evaluadas de ZnO NPs en suspensión y polvo.	35
16. Imágenes obtenidas por microscopía óptica invertida de la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones evaluadas de ZnO NPs en suspensión durante 24, 48 y 72 horas.	37
17. Imágenes obtenidas por microscopía óptica invertida de la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones evaluadas de ZnO NPs en polvo durante 24, 48 y 72 horas.	39
18. Porcentaje de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión y en polvo durante 24 horas.	40

19. Porcentaje de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión y en polvo durante 48 horas..	40
20. Porcentaje de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión y en polvo durante 72 horas..	41
21. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión y en polvo durante 24 horas.	42
22. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión y en polvo durante 48 horas	42
23. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión y en polvo durante 72 horas.	43
24. Incremento en la complejidad celular de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión y en polvo durante 24, 48 y 72 horas, comparada contra una población control sin tratamiento. 44	
25. Evaluación cuantitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión y polvo durante 24, 48, 72 horas.	45
26. Comparación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuesta durante 24 horas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión y polvo, dispersadas y previamente incubadas con EDTA 1 mM.....	46
27. Relación entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fracción de células viables en la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión y polvo durante 24, 48 y 72 horas.....	47
28. Relación entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fracción de células viables en la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión y polvo, dispersadas y previamente incubadas con EDTA 1 mM y su comparación con la generación de especies reactivas de oxígeno con y sin este agente quelante.	48
29. Evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión durante 48 horas.	49
30. Evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión durante 72 horas.	50
31. Evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en polvo durante 48 horas.....	50
32. Evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en polvo durante 72 horas.....	51

33. Actividad enzimática de superóxido dismutasa en la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión y polvo durante 24, 48 y 72 horas 52
34. Mecanismo de citotoxicidad de las ZnO NPs en la línea celular de cáncer de colon, HT-29, propuesto con base en el análisis integral de todos los hallazgos de esta investigación. 65

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Cantidades de cada reactivo para la preparación de los controles necesarios para la detección de apoptosis y necrosis.	24
2. Cantidades de cada reactivo para la preparación de muestras y blancos para la medición de la actividad de SOD	29
3. Tamaño y potencial zeta de las ZnO NPs en distintos dispersantes a 0 y 24 horas.	32

Lista de ecuaciones

Ecuación	Página
1. Ecuación para determinar la cantidad de células por mililitro con la técnica de conteo por exclusión de azul tripano	18
2. Ecuación para el cálculo del porcentaje de reducción de resazurina	19
3. Ecuación para el cálculo de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)	29

Capítulo 1. Introducción

1.1 Los nanomateriales y sus aplicaciones

Con el surgimiento de la nanotecnología, los nanomateriales se han convertido en componentes fundamentales o incidentales de muchas áreas del desarrollo científico y tecnológico. La definición exacta del término nanomaterial ha sido motivo de extensos debates internacionales, situación que a su vez ha representado un conflicto en el establecimiento de regulaciones estrictas y específicas sobre el uso de los nanomateriales. Hasta el momento la definición de nanomaterial según la Comisión Europea es: “un material natural, secundario o fabricado que contiene partículas, en un estado no unido, como un agregado o un aglomerado, del que una o más de las dimensiones externas es de al menos 50% de sus partículas se encuentren en el rango de 1-100 nm” (Comisión Europea, 2011).

Los nanomateriales tienen aplicaciones muy variadas que comprenden varios tipos de industrias como la electrónica, farmacéutica, cosmética, biomédica y alimentaria. Su presencia en tantos aspectos de la vida diaria ocasiona que inevitablemente los humanos de todo el mundo se encuentren expuestos a ellos. Esto supone un potencial riesgo a la salud y al medio ambiente puesto que se desconoce con claridad cuáles son los efectos tóxicos de los nanomateriales, mismos que pueden variar según su composición y propiedades fisicoquímicas (Camacho and Zapata, 2017).

1.2 Exposición humana a nanomateriales

El aumento mundial en la producción y aplicación de nanomateriales demanda que se cuestione su seguridad para la salud humana. Las personas de la sociedad moderna se encuentran ininterrumpidamente expuestas a la materia en nanoescala que puede presentarse como aditivos o contaminantes en productos de consumo y que puede ingresar al organismo por distintas vías. La capacidad de los nanomateriales de atravesar las barreras biológicas implica que pueden absorberse hasta el torrente sanguíneo a través del cual pueden desplazarse a otros órganos y tejidos, desplegando un mecanismo de toxicidad dependiente de la estructura biológica en que se hayan localizado. Además, se sabe que tienen otras propiedades biológicas como una pobre remoción por macrófagos y alcance a estructuras intracelulares, por ejemplo, el núcleo y las mitocondrias (Ghafari et al., 2020).

Las principales vías de exposición son la vía inhalatoria, la vía oral y la vía dérmica. La inhalación de nanomateriales se da principalmente por personal de industrias en las que se fabriquen o se utilicen como elementos dentro del proceso productivo. Esta forma particular de exposición es conocida como “exposición ocupacional” a la que, hacia el fin del año 2020, se proyectaba se vieran sometidos 6 millones de trabajadores a nivel mundial (Ghafari et al., 2020). Por la vía oral, los nanomateriales ingresan al organismo al ingerir alimentos o bebidas a las que se hayan añadido a fin de extender su duración y mejorar su sabor, textura y composición nutricional. Además, están presentes como contaminantes en productos alimenticios provenientes del mar o que han sido empacados con envolturas plásticas (Lehner et al., 2019; Weir et al., 2012). Finalmente, la exposición dérmica se da a partir del uso de bloqueadores solares, cosméticos y productos de cuidado personal como cremas corporales, champús, desodorantes y espumas para afeitar. Los nanomateriales se agregan a estos productos con el fin de mejorar su eficiencia, protección, pigmentación e hidratación dérmica (Algin Yapar and Inal, 2012).

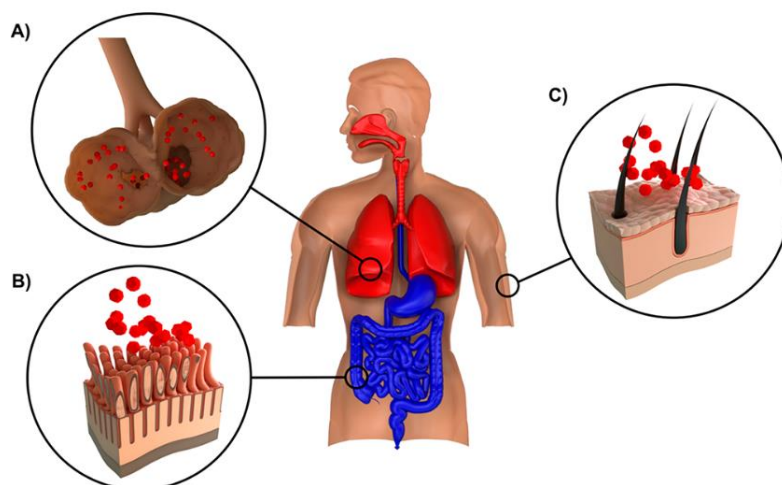


Figura 1. Principales vías de exposición a nanomateriales. A) vía inhalatoria, B) vía oral y C) vía dérmica. Recuperado de Lehner, Weder, Petri-Fink, & Rothen-Rutishauser, 2019.

1.3 Riesgo por ingestión de nanomateriales

En las últimas décadas, la industria alimentaria se ha visto invadida por nanomateriales que se encuentran en alimentos empaquetados y bebidas envasadas. Su presencia en los productos de consumo puede estar relacionada a su uso intencional como aditivos o a su condición incidental derivada de la contaminación ambiental. Los principales nanomateriales empleados como aditivos en la industria alimentaria son aquellos basados en óxidos metálicos. De estos, los más utilizados son el óxido de titanio (TiO_2), el óxido de silicio (SiO_2) y el óxido de zinc (ZnO) (Jeon et al., 2020).

Algunos miembros de la comunidad científica proponen que añadir nanomateriales a los procesos de las industrias alimentarias contribuirá al progreso tecnológico, mejorará su competencia en el mercado e incrementará sus cualidades nutricionales gracias a las propiedades únicas de la materia a nanoescala. Sin embargo, son estas mismas propiedades las que han propiciado gran incertidumbre acerca de los riesgos toxicológicos de los nanomateriales (Szakal et al., 2014). Se estima que cada persona consume aproximadamente 10^{12} partículas por día, de las cuales una cantidad considerable corresponde al tamaño nanométrico. Debido a esto, cobran importancia las investigaciones que ayuden a esclarecer qué sucede con los nanomateriales una vez dentro del aparato digestivo y cuáles son sus posibles efectos celulares y sistémicos (Sohal et al., 2018).

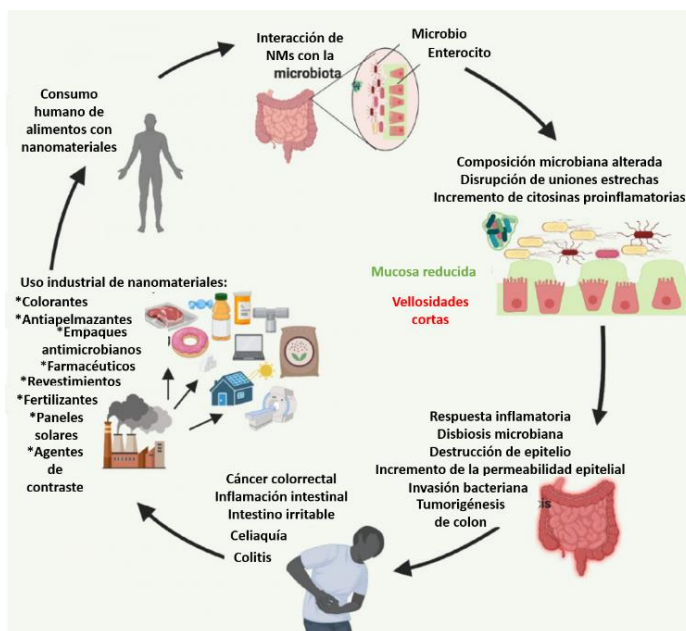


Figura 2. Ciclo de contaminación por el uso de nanomateriales en la industria alimentaria y su potencial impacto en la salud humana. NMs: nanomateriales. Modificado de Ghebretatios, Schaly, & Prakash, 2021

1.4 Los nanomateriales a través del aparato digestivo

Una vez que son ingeridos, los nanomateriales comienzan su trayecto por el tracto gastrointestinal, compuesto por el estómago, intestino delgado e intestino grueso. Cada parte del tracto está recubierta por células epiteliales secretoras de mucosa que varía de espesor y composición según la zona que se analice. Gracias a esta mucosa, los nanomateriales pueden ser absorbidos y migrar al torrente sanguíneo y otros órganos. Para determinar su interacción con los componentes del tracto intestinal deben tomarse en cuenta las características fisicoquímicas que podrían otorgarles propiedades biológicas particulares a los nanomateriales, como su tamaño, carga y funcionalización química, entre otras (García-Gallegos, 2015).

Durante su viaje por el tracto gastrointestinal, los nanomateriales se verán expuestos a ambientes con condiciones particulares dependientes del órgano que atraviesen, por ejemplo, cambios de pH, presencia de enzimas digestivas, peristalsis, microbiota o biomoléculas obtenidas de los alimentos. Las condiciones de cada órgano pueden alterar las propiedades de los nanomateriales promoviendo su aglomeración o disolución en iones e influenciando su absorción (Lukas, 2021). Inmersos en la saliva, los nanomateriales permanecen casi inalterados mientras que en el estómago el ambiente ácido promueve la aglomeración y ligera liberación de iones. Dentro del intestino, en cambio, los aglomerados se desintegran dejando nuevamente el nanomaterial prístino y iones que forman complejos con otros compuestos biológicos. A lo largo del trayecto por el tracto gastrointestinal, los nanomateriales pueden transformarse en iones y viceversa, presentándose una formación *de novo* a partir de los iones libres. Esto sugiere que el epitelio intestinal es el área mayormente expuesta a la absorción de nanomateriales (Lukas, 2021; Peters et al., 2012; Sieg et al., 2017).

1.5 Mecanismos de absorción intestinal e internalización celular

Una vez en el intestino, la primera barrera que enfrentan los nanomateriales es la mucosa intestinal, una red compleja de glicoproteínas, lípidos y otras macromoléculas, que va decreciendo de grosor a medida que se aleja del estómago. Esta mezcla de consistencia gelatinosa protege al intestino de agentes patógenos al ser semipermeable al paso de nutrientes, sales y otras moléculas. La mucosa intestinal está cargada negativamente por lo que, además del tamaño, la carga superficial de los nanomateriales es crucial para atravesarla. Por lo tanto, la penetración de nanomateriales con carga superficial positiva se ve favorecida (Alger et al., 2014; García-Gallegos, 2015).

Después de haber atravesado la mucosa, los nanomateriales son internalizados por las células epiteliales. Las células epiteliales que forman al intestino tienen una organización polarizada epitelial, es decir, constan de una zona apical, orientada hacia la cara interior del órgano, y una zona basal, dirigida hacia el tejido subyacente. Los nanomateriales que logran atravesar la mucosa son mayormente internalizados por las células M, localizadas en las placas de Peyer, y en menor proporción por los enterocitos (Bouwmeester, van der Zande, & Jepson, 2018; Lukas, 2021).

La internalización celular de nanomateriales en el intestino se da por vías endocíticas que pueden distinguirse según el tipo celular en que se presenten y los componentes que se involucren en la formación del endosoma. También puede darse por transcitosis y transporte paracelular regulado a través de las uniones estrechas que mantienen unidas a las células epiteliales. Es probable que la captación celular no solo dependa de las propiedades de los nanomateriales, sino también de factores particulares del organismo, como la edad, la dieta y las enfermedades gastrointestinales, por mencionar algunas.

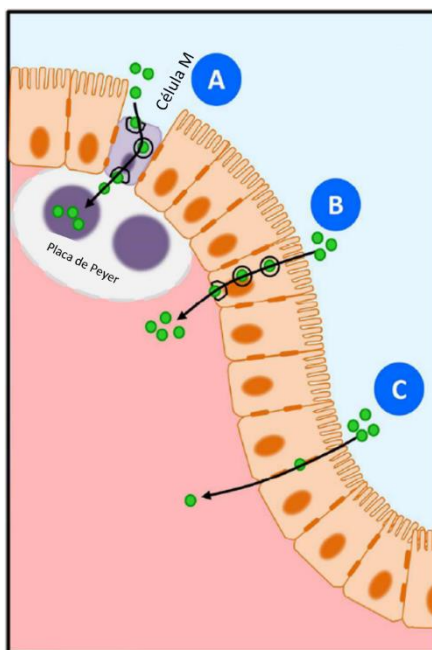


Figura 3. Posibles mecanismos de absorción intestinal e internalización celular de los nanomateriales ingeridos. (A) Internalización y transporte a los folículos linfoides del parche de Peyer por las células M, (B) transcitosis a través de células epiteliales, (C) transporte paracelular a través de uniones estrechas. Modificado de McCracken et al., 2016.

Dentro de las células, algunos nanomateriales pueden escapar de los endosomas o lisosomas e instalarse en el citoplasma, impactando negativamente en las células intestinales. Debido a que estas células garantizan la integridad del intestino y su mucosa, los materiales a nanoescala representan una amenaza para la protección del intestino y la homeostasis de la microbiota. En contraparte, la fracción de nanomateriales que no logre absorberse a través de las barreras intestinales puede acumularse en el interior del intestino, como consecuencia de la preocupante exposición diaria, y relacionarse con los microorganismos colonizadores (Ghebretatios et al., 2021; Lamas et al., 2020).

1.6 Citotoxicidad y efectos en el ciclo celular

Una vez dentro de las células, los nanomateriales pueden interactuar con una amplia variedad de componentes intracelulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, ocasionando daño celular. Se presume que la variabilidad en los mecanismos de toxicidad está relacionada con la función fisiológica de cada tipo celular y sus reacciones bioquímicas particulares. La composición, tamaño, forma, carga y química superficial son algunos de los parámetros a considerar en la evaluación de la interacción entre células y nanomateriales. En estudios de citotoxicidad, estas propiedades cobran importancia para dilucidar los mecanismos del daño celular y su disposición dentro de la célula (Sohaebuddin et al., 2010).

Si bien los mecanismos de citotoxicidad suelen conducir a la inducción de la muerte celular, existen casos en los que el daño celular se ve reflejado en la detención del ciclo celular, evitando su proliferación y previniendo su desarrollo normal. Un factor importante en la interacción entre nanopartículas y células es la etapa del ciclo celular en que se encuentren las células durante la exposición a los nanomateriales (Lukas, 2021).

El ciclo celular es la serie de eventos que debe atravesar una célula a fin de crecer, dividirse y replicar su material genético. Este ciclo consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M; cada fase debe completarse correctamente para que el ciclo pueda continuar. En la fase G1 las células se enfocan en el crecimiento, a fin de no perder tamaño tras la división. Durante la fase S, se lleva a cabo en el núcleo la replicación del material genético después de la cual las células entran a G2 donde sintetizan proteínas que las preparan para la división celular. Por último, las células se dividen durante la denominada fase M y las dos células hijas comienzan el ciclo, entrando nuevamente a G1. Adicional a estas fases, existe un periodo llamado G0 en el que se encuentran las células que han dejado de dividirse y están en reposo (Kim et al., 2012).

Cada fase del ciclo celular está caracterizada por procesos moleculares y bioquímicos, así como por la expresión de proteínas específicas según el objetivo de la etapa. La duración de las etapas está relacionada con el recambio necesario dependiente del tipo celular del que se trate. Por esta diferencia en las dinámicas de cada estadio del ciclo celular, es probable que los efectos que los nanomateriales tengan en cada uno de ellos no serán iguales.

Debido a lo anteriormente expuesto, cobran importancia las investigaciones que contribuyan a dilucidar los potenciales efectos tóxicos de los nanomateriales ingeridos por los humanos.

1.7 Antecedentes

1.7.1 Potenciales consecuencias en la salud por ingestión de nanomateriales

A partir de las investigaciones sobre la interacción de los nanomateriales con sistemas biológicos, han surgido múltiples inquietudes acerca de los posibles efectos adversos sobre la salud de los humanos, ocasionados por la exposición diaria a los distintos tipos de nanoestructuras. Hasta el momento se conoce poco respecto a su repercusión en el intestino.

Existen reportes de que la ingestión de ciertos nanomateriales tiene mayor impacto sobre el intestino, debido a que, de los órganos en el tracto gastrointestinal, es en este dónde ocurre la absorción de nutrientes. Dentro del intestino, los nanomateriales son capaces de inducir cambios en las células que lo componen, la mucosa que lo recubre y la microbiota que lo coloniza, contribuyendo al desarrollo de enfermedades intestinales. Ejemplos de estas enfermedades son el síndrome de intestino irritable, celiaquía, enfermedad inflamatoria intestinal, dentro de la cual se engloban la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, y cáncer colorrectal (Ghebretatios et al., 2021).

1.7.2 Efecto de los nanomateriales en la función intestinal

El intestino es un órgano complejo formado por cuatro capas de distinta composición que deben ser atravesadas a fin de alcanzar el torrente sanguíneo. Estas se encuentran colocadas en el orden descendente del lumen a la lámina propia: microbiota, mucosa, células epiteliales (enterocitos, células M y células caliciformes) y lamina propia. El delicado balance entre estas barreras es clave en el mantenimiento de la homeostasis y el correcto funcionamiento intestinal (Ghebretatios et al., 2021; Huang and Tang, 2021).

En este sentido, los nanomateriales pueden ocasionar una amplia variedad de efectos en cada una de las capas del intestino. Estos efectos incluyen la activación de la respuesta inmunológica, cambios morfológicos en las células epiteliales, modificaciones en la composición de la mucosa y desbalances en la colonización simbiótica de la microbiota. De la misma manera, puede verse afectada la efectividad de la absorción de carbohidratos, grasas y proteínas por la disrupción de las vellosidades y microvellosidades intestinales (Huang and Tang, 2021).

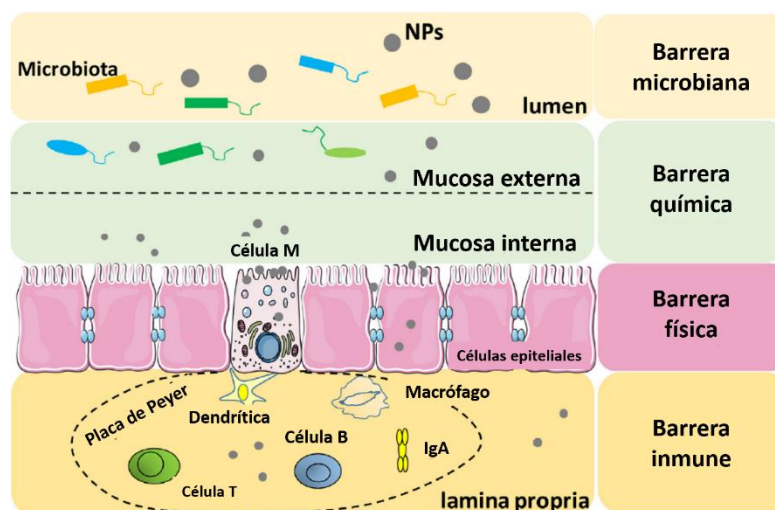


Figura 4. Diagrama del orden y composición de las barreras intestinales. Modificado de Huang & Tang, 2021.

En el caso de las ZnO NPs, Huang y Tang, describieron que, al estar compuestas de un óxido de metal, entre el 65 y 100% de este tipo de nanopartículas se disuelven con facilidad en el ambiente ácido del estómago, provocando que su biodurabilidad sea baja (Huang and Tang, 2021).

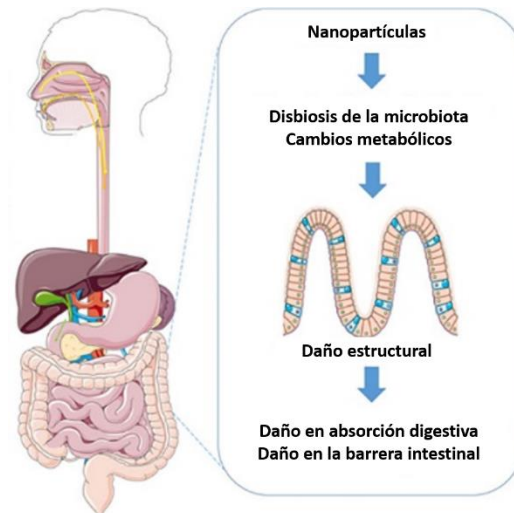


Figura 5. Efectos de los nanomateriales en la estructura y función intestinal. Modificado de Huang & Tang, 2021

En otro estudio, Ghebretatios y colaboradores, describieron que las ZnO NPs reducen la abundancia y diversidad bacteriana de la microbiota, especialmente de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, bacterias predominantes y beneficiosas para la función intestinal. Aunado a esto, se presenta un aumento en poblaciones bacterianas con finalidades opuestas. Estos hallazgos sugieren que las ZnO NPs inducen un

desbalance en la flora intestinal y alteraciones en su actividad metabólica (Ghebretatios et al., 2021). En concordancia con lo descrito por Ghebretatios y su equipo, Lamas y colaboradores, reportaron el mismo desbalance en la microbiota, reflejado en la disminución de *Lactobacillus* y el incremento en el filo patógeno *Proteobacteria* (Lamas et al., 2020).

Por otra parte, Moreno y colaboradores, realizaron un estudio detallado acerca del impacto de las ZnO NPs en los mecanismos de transporte intestinal. Entre sus aportes más notables presentaron que una dosis baja de ZnO NPs contribuye al correcto transporte intestinal de zinc, indispensable para múltiples procesos celulares en los humanos. Sin embargo, una saturación de zinc, producto de una dosis elevada de ZnO NPs, puede ocasionar la precipitación del zinc como ZnCO_3 , evitando su correcta absorción celular. Puntualizaron que dicha dosis elevada también puede provocar la disrupción de las microvellosidades, reduciendo el área de absorción y transporte intestinal. Además, es posible que las ZnO NPs susciten cambios en la expresión génica del transportador basolateral GLUT2, reduciendo así la absorción de glucosa, e inhiban competitivamente el transporte de Fe, puesto que ambos metales son movilizados por el transportador DMT1 (Moreno-Olivas et al., 2018).

1.7.3 Vías de internalización de nanomateriales en células intestinales

A lo largo de su viaje por el tracto gastrointestinal, los nanomateriales ingeridos sufrirán transformaciones que repercutirán en su efecto sobre las células intestinales y en la eficacia con que estas los internalicen. Las nanopartículas pueden ser internalizadas por las células del epitelio intestinal y su internalización depende en gran medida de sus propiedades fisicoquímicas, la composición de la mucosa y la interacción que tengan con esta. Existen dos posibles escenarios: que las nanopartículas atraviesen la mucosa y sean internalizadas por las células epiteliales o que sean retenidas en el espacio luminal del intestino. En el primer caso, es necesario considerar si las nanopartículas permanecen dentro de las células o si alcanzan la lámina propia y, de ser así, cómo interactúan con las células que radican en ella, puesto que esta interacción podría desencadenar la activación de la respuesta inmunológica. Si, por el contrario, las nanopartículas no atraviesan la mucosa, se deberá considerar su efecto sobre la barrera intestinal y la microbiota. En general se estima que la absorción celular de la materia es entre 15 y 20 veces mayor cuando se encuentra a nanoescala y que entre menor sea el tamaño de las nanopartículas, más inminente será su toxicidad (Huang and Tang, 2021; Mittag et al., 2021). Mittag y colaboradores estudiaron las líneas celulares de epitelio intestinal, Caco-2 y LT97, en presencia de ZnO NPs de $< 50 \text{ nm}$ y $< 100 \text{ nm}$ a concentraciones entre 12 y $1,229 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$, con lo cual demostraron que las ZnO NPs son internalizadas por

endocitosis. Una vez en el citoplasma, la formación de un endolisosoma ocasionará una disminución en el pH del medio en que se encuentran las ZnO NPs, hecho que promoverá su disolución en iones Zn^{2+} y la desestabilización del lisosoma. Esta cadena de eventos finalmente resultará en daño celular (Mittag et al., 2021; Olejnik et al., 2020).

Existen diversos reportes que coinciden en que la exposición de las ZnO NPs a un ambiente ácido promueve su disociación en iones Zn^{2+} . Jeon y colaboradores llevaron a cabo un estudio para determinar el destino de las ZnO NPs tras su ingestión en alimentos empaquetados. Expusieron la línea celular Caco-2 a $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ de ZnO NPs con un tamaño de aproximadamente 60 nm y encontraron que, efectivamente, la absorción celular se presentaba mayoritariamente en forma de iones Zn^{2+} debido a que las ZnO NPs sufrían severas disociaciones por la acidez de los alimentos estudiados o por interacción con otros componentes del medio de cultivo empleado. A pesar de esto, los autores recalcaron que no debe despreciarse la contribución de las ZnO NPs que logran absorberse en forma de nanopartículas (Jeon et al., 2020).

1.7.4 Principales mecanismos de citotoxicidad inducida por nanomateriales

El término citotoxicidad hace alusión a la capacidad de un agente de infligir algún tipo de daño que afecte el desarrollo correcto de la célula. El principal mecanismo de citotoxicidad inducido por la internalización celular de nanomateriales es el estrés oxidativo, ocasionado por el desbalance entre el sistema antioxidante y la sobreproducción de especies de oxígeno reactivas (ROS). De manera normal, las especies de oxígeno reactivas se encuentran en pequeñas cantidades dentro de las células y son contrarrestadas con la presencia de compuestos y enzimas antioxidantes. En condiciones de estrés oxidativo, se presenta una producción excesiva de especies de oxígeno reactivas y/o una disminución de los compuestos o expresión de enzimas antioxidantes, condiciones que propician daños severos en las estructuras intracelulares y pérdida en la funcionalidad de proteínas e integridad de la membrana plasmática (Lukas, 2021).

Se han observado dos posibles mecanismos por los que las ZnO NPs inducen citotoxicidad. El primero es dependiente de su tamaño y forma, así como de sus propiedades fisicoquímicas particulares. El segundo mecanismo se da por la liberación de iones tóxicos de Zn^{2+} dentro y fuera de las células (Król et al., 2017).

Para determinar si la toxicidad de las ZnO NPs proviene de las nanopartículas, de la liberación de iones o de ambos factores, Wang y colaboradores, evaluaron los mecanismos de toxicidad de estas y otras

nanopartículas de óxidos metálicos. Utilizando una cepa de *P. phosphoreum* analizaron los mecanismos de toxicidad de ZnO NPs de 30 nm en concentraciones de 0.19 a $0.48 \frac{mg}{L}$. Determinaron que la toxicidad de las ZnO NPs se debía únicamente a la acción de los iones Zn^{2+} . Sin embargo, aclararon que el método que se utilice para medir la toxicidad y los componentes del medio en que se encuentren las ZnO NPs, tendrán impactos significativos en los resultados. Debido a esto y a la existencia de reportes que asocian la toxicidad a su forma de nanopartículas, este mecanismo aún no puede ser tomado como contundente (Wang et al., 2016).

Liu y colaboradores describieron que los iones de zinc pueden internalizarse por canales como Zrt e Irt, por transportadores de la familia ZIP o por difusión pasiva (Liu et al., 2016). Por otra parte, Mittag y colaboradores, coincidieron en la citotoxicidad de los iones de Zn^{2+} y puntualizaron que la consecuencia principal de estos es la sobreproducción de las especies de oxígeno reactivas. A partir de sus ensayos anteriormente descritos, comprobaron cambios en el contenido intracelular de zinc que pueden afectar la cadena de transporte de electrones y la efectiva replicación y reparación del ADN (Mittag et al., 2021). Además, los iones Zn^{2+} pueden ocasionar la disfunción mitocondrial, la desestabilización lisosomal y la iniciación de una respuesta inmunitaria por inducción de la liberación del factor pro-inflamatorio IL-8. En conjunto, el estrés oxidativo ocasionado por las ZnO NPs, disminuye la viabilidad celular, daña el DNA y otras estructuras intracelulares, impacta la integridad de la membrana plasmática y, finalmente, compromete a la célula hacia la apoptosis (McCracken et al., 2016).

Otra manifestación de citotoxicidad son las alteraciones en el ciclo celular. Sobre este factor, se conoce que pueden presentarse diferencias en la cantidad y la velocidad a la que una célula internaliza los nanomateriales, así como en los efectos que estos desencadenen, según la fase del ciclo celular que atraviese la célula en cuestión. Además, se ha observado que después de haber sido internalizados, los nanomateriales pueden heredarse a las células hijas durante la repartición de contenido celular, necesaria en el proceso de división (Kim et al., 2012).

Considerando lo anterior, se ha intentado determinar si alguno de los estadios del ciclo celular aumenta la susceptibilidad de las células a las NPs, para lo cual se han diseñado investigaciones en las que se compara la captación de NPs en las cuatro fases del ciclo. El grupo de Kim y colaboradores, indicaron que, según sus evaluaciones de una línea celular de carcinoma de pulmón humano en presencia de nanopartículas de poliestireno carboxilado de ~40 nm, el punto en el que se presenta mayor captación de NPs es en la transición de la fase G2 a M, seguida por la fase S y la transición entre G0 y G1. Los autores concluyeron que las diferencias en acumulación de NPs surgen porque las células en la fase G2/M han

retenido las NPs por más tiempo que aquellas células en fase S o G0/G1. También determinaron que la presencia de NPs no arresta ni interrumpe el ciclo celular y que las NPs se heredan azarosamente (Kim et al., 2012)

Patel y colaboradores, estudiaron los efectos de concentraciones entre 10 y 80 $\frac{\mu g}{ml}$ de ZnO NPs con un tamaño de 30 nm, en el ciclo celular de células de carcinoma epitelial humano, A431. Concordaron en que la fase con mayor captación corresponde a G2/M. Sin embargo, difirieron en los hallazgos referentes a la continuidad del ciclo celular, pues observaron que las ZnO NPs pueden inducir el arresto del ciclo en las fases S y G2/M como una posible consecuencia del aumento en la generación de especies de oxígeno reactivas por la presencia del nanomaterial. Esto confirma que algunas NPs podrían tener impactos importantes en el ciclo celular (Patel et al., 2016a).

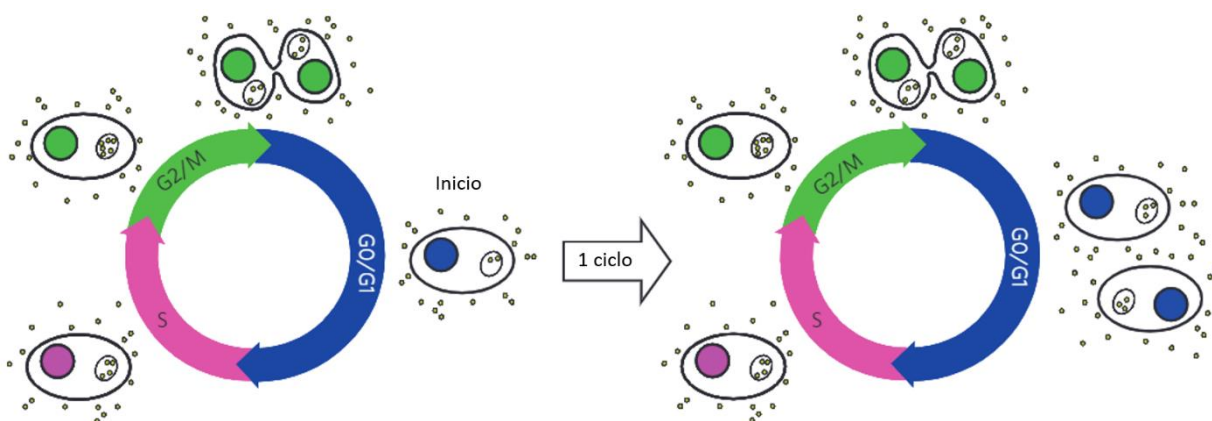


Figura 6. Internalización de nanopartículas a lo largo del ciclo celular. Los puntos ejemplifican las nanopartículas que se acumulan en los lisosomas, representados por los óvalos dentro de las células. Modificado de Kim et al., 2012.

Algunos otros autores reportan evidencia similar en la que las ZnO NPs tienen efectos importantes sobre el ciclo celular. En general, coinciden en que este tipo de NPs ocasiona una disminución en la cantidad de células que se encuentran en la fase G0/G1 e incrementa la cantidad de aquellas que atraviesan la fase S o G2/M, las cuales son propensas al arresto del ciclo celular (Król et al., 2017; Liu et al., 2016; McCracken et al., 2016). En este trabajo se busca evaluar los efectos celulares producidos por la presencia de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs), que pueden ser utilizados como aditivos en la industria alimentaria en un modelo *in vitro* de colon.

1.8 Hipótesis

Las ZnO NPs ocasionan la disminución en la viabilidad celular, desencadenan respuestas de estrés oxidativo y ocasionan el arresto del ciclo celular en la línea celular de colon HT-29.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Evaluar la citotoxicidad y el efecto en las etapas del ciclo celular de las ZnO NPs en la línea celular de colon HT-29.

1.9.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las ZnO NPs.
2. Estudiar el efecto citotóxico y la hemocompatibilidad de las ZnO NPs en células de colon HT-29.
3. Evaluar los cambios morfológicos y la activación de procesos de muerte celular en las células de colon expuestas a diferentes concentraciones de ZnO NPs.
4. Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de ZnO NPs en los estadios del ciclo celular y la internalización de las mismas en las células de colon.
5. Estudiar la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad de la enzima superóxido dismutasa en las células de colon expuestas a diferentes concentraciones de ZnO NPs.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Origen y preparación de las nanopartículas

En esta investigación se evaluaron dos presentaciones distintas de ZnO NPs adquiridas en la compañía Sigma-Aldrich: en suspensión (721077-100G) y en polvo (544906-10G). El fabricante reporta que ambas presentaciones contienen nanopartículas con un tamaño menor a los 100 nm. Antes de cada ensayo se prepararon dos soluciones stock de agua desionizada con una concentración de 1 mg/mL de ZnO NPs en suspensión y 0.5 mg/mL de ZnO NPs en polvo, respectivamente. Ambas soluciones se dispersaron por ultrasonificación durante 10 minutos, empleando intervalos de 9.9 segundos a una intensidad de 30%.

2.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

2.2.1 Espectroscopia UV-Vis

Los plasmones de superficie están asociados a la superficie de los metales y son definidos como las oscilaciones colectivas de los electrones restringidos a un volumen metálico pequeño. La frecuencia de resonancia del plasmón de superficie mide la interacción del plasmón con la radiación electromagnética y es característica de cada clase de metal. Así, utilizando la técnica de espectroscopia UV-Vis es posible determinar la presencia de un elemento metálico particular en una muestra de nanopartículas. Para medir la frecuencia de resonancia del plasmón de superficie de las ZnO NPs, se mezclaron 100 μ L de las ZnO NPs previamente dispersadas con 950 μ L de agua desionizada. Se colocó la mezcla en una celda de cuarzo de 1 cm y se realizó la lectura en un intervalo de longitudes de onda de 200-800 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Multiskan GO. Se consideró 1 mL de agua desionizada como blanco. Los resultados obtenidos se graficaron como la absorbancia de las ZnO NPs en relación a la longitud de onda en el software OriginPro 9.0.

2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la microscopia electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) se incide un haz de electrones acelerados que colisiona con la muestra y al hacerlo es posible formar una imagen en dos dimensiones modulando los electrones difractados (campo oscuro) o los electrones que atravesaron directamente la muestra (campo claro) mediante lentes especializadas. Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar la morfología, dispersión y distribución de tamaños de muestras nanométricas. Para analizar las ZnO NPs en el microscopio electrónico de transmisión, se colocaron 10 μL de la solución stock en una rejilla de cobre recubierta de carbón (malla 75, Ted Pella Inc.), misma que se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior análisis en el TEM (Hitachi H-7500 a 80 Kv). Se seleccionaron 5 imágenes de cada tipo de ZnO NPs a partir de las cuales se midieron 25 nanopartículas en cada una a fin de determinar la distribución de tamaños de la muestra utilizando el software Image J para la medición de las nanopartículas y Graph Pad Prism 8.0.2 para generar el histograma de distribución de tamaños.

2.2.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El potencial zeta es el valor teórico del potencial electrostático en la superficie dentro de la cual las nanopartículas interactúan con otras superficies. Comúnmente, este valor se emplea como un indicador de la estabilidad de las nanopartículas y es determinado por la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). El potencial zeta de las ZnO NPs fue determinado mediante esta técnica en un equipo Zetasizer (Nano-ZS DTS 1060, Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom) operado a $\lambda=532\text{ nm}$. Se mezclaron 50 μL de las ZnO NPs previamente dispersadas con 950 μL de agua desionizada, medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich-Cat. D7777) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB- Biowest Cat. L0010-100) y medio de cultivo DMEM sin suplementar. Se colocó 1 mL de cada dilución en una celda capilar y se llevó a cabo la lectura del potencial zeta en cada dispersante. Además, se preparó otra serie de diluciones idénticas que se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas, después de las cuales se leyeron en el Zetasizer con los mismos parámetros. Los resultados se obtuvieron directamente del software del equipo.

2.3 Cultivo celular

2.3.1 Líneas celulares

La línea celular de cáncer de colon HT-29 (ATCC, HTB-38) se adquirió en el American Type Culture Collection (USA). La línea celular HT-29 es una línea adherente con morfología epitelial extraída de un adenocarcinoma colorrectal de una fémina caucásica de 44 años.

2.3.2 Descongelamiento de células

El descongelamiento celular es el proceso para obtener un cultivo celular a partir de un volumen de células en criopreservación a -80°C . Los viales que contenían las líneas celulares HT-29 se descongelaron a temperatura ambiente y se trasladó el contenido de cada uno a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Estos tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 25°C . Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo para centrifugar nuevamente con los mismos parámetros. Una vez más se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo. Por otra parte, en un par de cajas de cultivo celular, se colocaron 5 mL de medio de cultivo DMEM con SFB al 10% y se adicionó el volumen de células resuspendidas repartido entre las dos cajas. Ambas cajas de cultivo celular se rotularon con el nombre de la línea celular, el número de pase, fecha y nombre del usuario. Las células se incubaron a 37°C y 5 % de CO_2 .

2.3.3 Subcultivo y mantenimiento celular

Una vez que los cultivos celulares se encuentran confluentes en un 80-90%, es necesario realizar un pase celular o subcultivo, al cual se transfiere una cantidad determinada de células a fin de que continúen su crecimiento. Para llevar a cabo cada subcultivo requerido a lo largo de los ensayos, se removieron las células de las cajas de cultivo confluentes por acción de la enzima tripsina y acción mecánica del operador. Para comenzar la separación, se descartó el medio de los cultivos confluentes y se realizó un lavado de los cultivos con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1x). Se colocó 1 mL de tripsina por cada subcultivo y se incubaron las células por 5 min a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, se agitó cuidadosamente la caja de cultivo y se recirculó su contenido con una micropipeta a fin de separar

las células mecánicamente. El contenido se colocó en tubos de microcentrífuga que se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 25°C. Se descartó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con el medio de cultivo correspondiente a cada línea celular, centrifugando bajo los parámetros anteriormente mencionados. Una vez más, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet y el volumen de células deseado se colocó en cajas de cultivo con 5 mL del medio de cultivo correspondiente. Finalmente, las cajas se rotularon con la línea celular correspondiente, número de pase y fecha y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

2.3.4 Conteo celular por el método de exclusión por azul tripano

A fin de determinar el volumen necesario para colocar la cantidad de células viables deseadas en cada subcultivo se utilizó la técnica de conteo celular por exclusión de azul tripano. Esta técnica permite diferenciar y contar las células viables tomando como referencia los cuadrantes de una cámara de Neubauer. En una célula viable, la membrana plasmática es impermeable a la molécula del colorante azul tripano, por lo que únicamente se teñirán de azul aquellas células cuya membrana se encuentre alterada en función y estructura. De esta forma, en el conteo sólo se consideran las células sin teñir que no se encuentren sobre los márgenes exteriores de cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer, representados en la Figura 7 por las letras A, B, C y D.

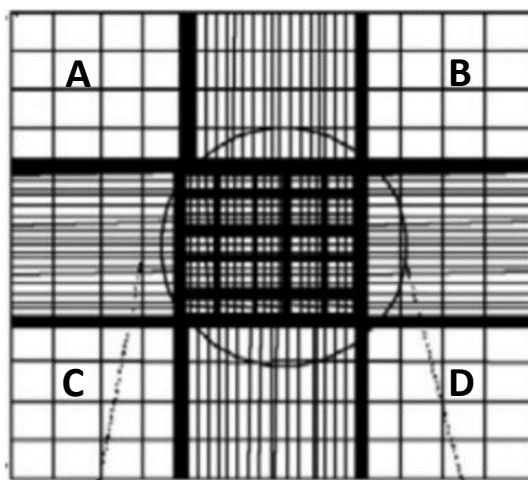


Figura 7. Representación de los cuadrantes en la cámara de *Neubauer* (Pica Granados, 2004).

Para realizar el conteo de las células viables, se colocaron en la cámara de *Neubauer* 10 μL de una mezcla con 10 partes de medio de cultivo con células y 40 partes de azul tripano, es decir, una solución con un factor de dilución de 5. La cantidad de células por mililitro se calculó según la fórmula siguiente:

$$\text{células}/\text{mL} = (x)(FD)(10,000) \quad (1)$$

donde:

x : promedio del conteo de los cuatro cuadrantes

FD : factor de dilución

2.4 Evaluaciones de biocompatibilidad de las nanopartículas

2.4.1 Evaluación de la viabilidad celular por reducción de resazurina

La resazurina es un compuesto de color azul que al reducirse a resorufina adquiere una coloración rosa. Esta reacción de reducción es ampliamente utilizada en ensayos colorimétricos como un indicador de metabolismo celular activo. Si se utiliza una población celular homogénea, es posible relacionar el cambio de coloración en el cultivo al número de células viables, tomando como base una curva de calibración de resazurina (Präbst et al., 2017).

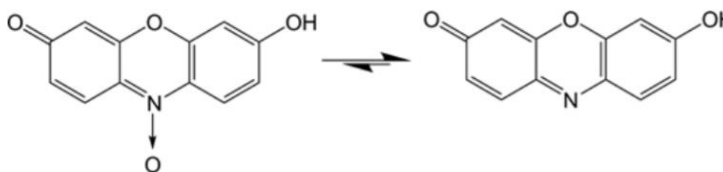


Figura 8. Reacción de reducción de resazurina a resorufina (Präbst et al., 2017).

Las evaluaciones de citotoxicidad por reducción de resazurina se llevaron a cabo en placas de cultivo de 96 pozos. Partiendo del conteo por exclusión de azul tripano, descrito en el apartado 2.3.4, se colocaron 5,000 células en cada pozo de la placa de 96 pozos con un volumen final de 100 μL por pozo del medio de cultivo correspondiente. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Terminado el periodo de

incubación, se prepararon las soluciones stock de las ZnO NPs, descritas en el apartado 2.1.1, a partir de las cuales se preparó una serie de soluciones con medio de cultivo a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL de ZnO NPs. Se removió el medio de cultivo en que se encontraban las células y se colocaron 100 µL por pozo de cada concentración a evaluar, ubicando una concentración por fila. Como control positivo se reservó una fila con células que no fueron expuestas a las ZnO NPs y como control negativo se reservó una fila con resazurina al 10% sin células. Las células se expusieron a los tratamientos por periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de exposición correspondiente, se removió el medio con ZnO NPs y se realizó un lavado con PBS 1x, colocando 200 µL en cada pozo y agitando cuidadosamente. Después, se colocaron en cada pozo 100 µL de una mezcla de medio de cultivo con resazurina al 10%. La placa con resazurina se incubó nuevamente a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente, se obtuvieron los resultados de absorbancia leyendo la placa a 570 y 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Multiskan GO. El porcentaje de reducción de resazurina se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{(E_{oxi600} \times A_{570}) - (E_{oxi570} \times A_{600})}{(E_{red570} \times C_{600}) - (E_{red600} \times C_{570})} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

E_{oxi570} = coeficiente de extinción molar de la resazurina oxidada a 570 nm

E_{oxi600} = coeficiente de extinción molar de la resazurina oxidada a 600 nm

A_{570} = absorbancia del pozo con muestra a 570 nm

A_{600} = absorbancia del pozo con muestra a 600 nm

E_{red570} = coeficiente de extinción molar de la resazurina reducida a 570 nm

E_{red600} = coeficiente de extinción molar de la resazurina reducida a 600 nm

C_{570} = absorbancia del pozo de control negativo con resazurina al 10% a 570 nm

C_{600} = absorbancia del pozo de control negativo con resazurina al 10% a 600 nm

Los ensayos se realizaron tres veces por cada periodo de exposición con sus respectivos triplicados internos y controles.

2.4.2 Evaluación de la contribución de los iones Zn^{2+} a la citotoxicidad

Existen diversos reportes que concuerdan en que el principal mecanismo de citotoxicidad de las ZnO NPs es el efecto de los iones liberados durante la disociación de las nanopartículas al interactuar con el medio líquido en que se encuentren. Tomando en consideración lo anterior, se llevaron a cabo ensayos de quelación de iones con ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) a fin de evaluar el efecto de los iones en la citotoxicidad. El EDTA funge como un agente quelante de los iones metálicos divalentes mediante la formación de estructuras de anillo, impidiendo así que estos sigan sus reacciones químicas normales.

De manera similar a los ensayos de citotoxicidad descritos en el apartado anterior, se cultivaron 5,000 células en 100 μL de medio DMEM colocado en cada pozo de una placa de cultivo de 96 pozos, tomando como base el conteo por exclusión de azul tripano. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Terminado el periodo de incubación, se dispersaron las soluciones stock de las ZnO NPs por ultrasonificación y a partir de las estas se prepararon soluciones con medio de cultivo a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs. Adicionalmente, cada una de estas soluciones se incubó con 10 μL de EDTA 1 mM durante 1 hora a 37°C y 5% de CO_2 . Se removió el medio de cultivo en que se encontraban las células y se colocaron 100 μL por pozo de cada concentración a evaluar, ubicando una concentración por fila. Como control positivo se reservó una fila con células que no fueron expuestas a las ZnO NPs y como control negativo se reservó una fila con resazurina al 10% sin células. Nuevamente, la placa se incubó por 24 horas, después de las cuales se evaluó la viabilidad de los pozos por reducción del reactivo resazurina, siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior.

2.4.3 Determinación de la hemocompatibilidad de las nanopartículas

A fin de garantizar la biocompatibilidad de una molécula o sustancia, es preciso determinar su hemocompatibilidad. Una forma sencilla de lograrlo es mediante una prueba de hemólisis, en la cual se mide la liberación de hemoglobina al medio ocasionada por la ruptura de la membrana de los eritrocitos derivada de la interacción de las células sanguíneas con la molécula o sustancia que se evalúe. La liberación

de la hemoglobina por el proceso de hemólisis puede cuantificarse leyendo la absorbancia de las muestras a 540 nm y comparándola con la absorbancia de un control negativo.

Para determinar la hemocompatibilidad de las dos presentaciones de ZnO NPs, se comenzó por extraer una muestra de sangre de un donador humano, que fue colocada en un tubo BD Vacutainer (R) con EDTA-K2 para prevenir la coagulación. La muestra de sangre se centrifugó a 1750 rpm por 10 min, y se retiró el plasma con una micropipeta. El precipitado se resuspendió en 10 mL de una solución de cloruro de sodio 150 mM de NaCl. Esta mezcla se centrifugó nuevamente a 1750 rpm por 10 minutos, después de lo cual se retiró el sobrenadante y se repitió 5 veces este ciclo de lavado de la muestra, pero utilizando en cada ciclo 10 mL de PBS 1x. Terminado este proceso, se llevó a cabo una dilución 1:50 de la muestra de eritrocitos, empleando PBS 1x como diluyente.

Una vez lista la muestra de eritrocitos, se prepararon las soluciones stock de ambas presentaciones de ZnO NPs, descritas en el apartado 2.1.1, a partir de las cuales se preparó una serie de soluciones con medio de cultivo a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs. Se tomaron 30 μL de cada concentración y se colocaron en un tubo con 270 μL de la muestra de eritrocitos. Además, con 270 μL de la muestra de eritrocitos se mezclaron 30 μL de medio de cultivo DMEM como control negativo y 30 μL de Tritón-X al 20% como control positivo. Todos los tubos se incubaron durante 1 h a 37°C y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y se colocó por triplicado en una placa de 96 pozos para leer su absorbancia a 541 nm por espectrofotometría UV-vis.

Para determinar el porcentaje de hemólisis se obtuvo el promedio de las absorbancias del control positivo y se normalizó la absorbancia de las muestras y el control negativo a dicho valor, tomando el promedio como el 100% de hemólisis.

2.4.4 Evaluación de los cambios morfológicos por exposición a las nanopartículas

La morfología de las células está íntimamente relacionada con su correcta función y desarrollo. Por lo tanto, a lo largo de los ensayos de citotoxicidad, se llevó un registro cualitativo de las células en las placas de 96 pozos a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Se tomaron imágenes obtenidas con un microscopio óptico invertido (Etaluma LS720) a partir de las cuales se evaluó la morfología, organización y crecimiento de las líneas celulares en presencia de las ZnO NPs. Se capturaron imágenes del cultivo control sin exposición a las ZnO NPs como referencia.

2.4.5 Determinación del tipo de muerte celular inducido por las nanopartículas

La muerte celular es fundamental en el ciclo de vida de las células puesto que es a través de este proceso que se eliminan aquellas células dañadas, mutadas o que han completado su tiempo de vida. La regulación de este evento celular se da a nivel genético y es crucial para mantener la homeostasis en los organismos pluricelulares. Sin embargo, las células también activan mecanismos de muerte programada cuando se encuentran expuestas a algún agente que altera una o varias de sus estructuras o funciones. Por este motivo, resulta importante conocer si las células evaluadas activan mecanismos de muerte celular al estar en contacto con las ZnO NPs y cuál mecanismo de muerte celular que han desplegado. Los dos tipos más comunes de muerte celular, son la necrosis y la apoptosis. Estos pueden detectarse a través de citometría de flujo utilizando yoduro de propidio (PI) y anexina V acoplada a FITC (anexinaV-FITC). La anexina V es una proteína intracelular que se une a la fosfatidilserina, uno de los lípidos más abundantes en la cara interna de la membrana plasmática.

En la etapa temprana de la apoptosis, la simetría de la membrana se perderá y ocurrirá un movimiento en los lípidos que la componen, conocido como flip flop, que dejará expuesta a la fosfatidilserina hacia la cara externa. De esta forma, la anexinaV-FITC se unirá a aquellas células que tengan expuesta la fosfatidilserina y estas podrán ser reconocidas gracias al fluorocromo asociado a esta proteína.

Por otra parte, en la etapa tardía de la apoptosis, la membrana plasmática habrá perdido su integridad por lo cual, además del marcaje con anexinaV-FITC, será posible teñir el material genético de las células con PI, un fluorocromo capaz de intercalarse en el DNA y que solo podrá entrar en las células cuya membrana impermeable se encuentre comprometida. En el caso de la necrosis, ocurrirá una desintegración total de la membrana y su consecuente pérdida del material intracelular, por lo que las células necróticas únicamente se verán marcadas por el PI. Por el contrario, las células sanas no se teñirán por ninguno de los dos fluorocromos. Lo anteriormente descrito, se esquematiza en la Figura 9.

Para llevar a cabo el ensayo de apoptosis/necrosis por citometría de flujo se utilizó el Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI de Biolegend (Cat. 640392). Este kit incluye ambos fluorocromos y un buffer de unión que permite la interacción entre la anexina V y la fosfatidilserina debido a que esta unión lípido-proteína es dependiente de calcio.

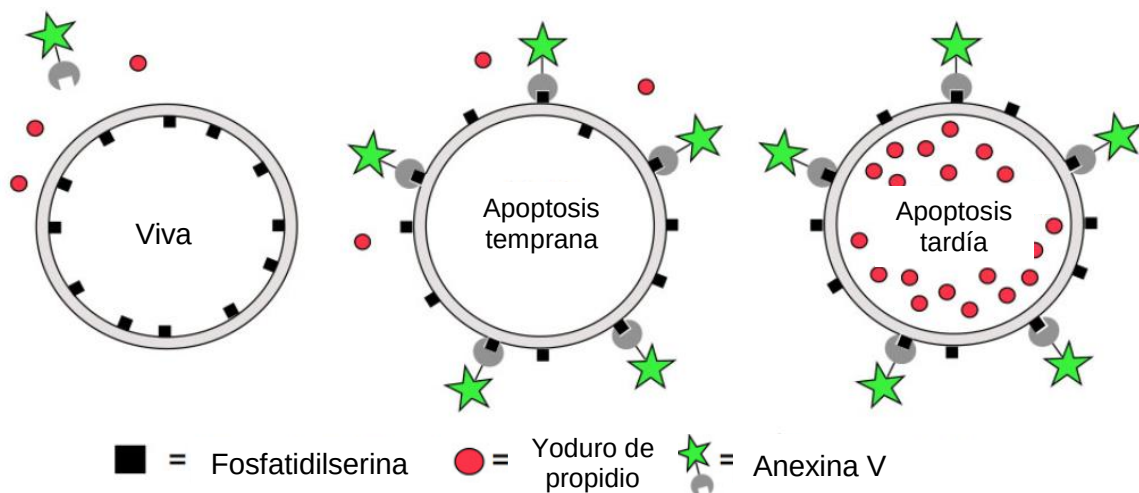


Figura 9. Esquema del marcaje por yoduro de propidio y anexina V para la identificación de las células en apoptosis temprana y apoptosis tardía por citometría de flujo. Modificado de “Cell Death and Apoptosis, School of Life Sciences,”

Partiendo del conteo por exclusión de azul tripano, descrito en el apartado 2.3.4, se colocaron 5,000 células en cada pozo de una placa de 96 pozos con un volumen final de 100 μL por pozo del medio de cultivo correspondiente. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Terminado el periodo de incubación, se prepararon las soluciones stock de las ZnO NPs, descritas en el apartado 2.1.1, a partir de las cuales se preparó una serie de soluciones con medio de cultivo a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs. Se removió el medio de cultivo en que se encontraban las células y se colocaron 100 μL por pozo de cada concentración a evaluar, ubicando una concentración por fila. Como control positivo se reservó una fila con células que no fueron expuestas a las ZnO NPs y como control negativo se empleó una fila de células expuestas a Tritón-X100 al 2%.

Las células se expusieron a los tratamientos por periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido el tiempo de exposición correspondiente, se recuperó el medio con ZnO NPs en un tubo de microcentrifuga para cada tratamiento y control empleado y se colocaron 100 μL de tripsina en cada pozo utilizado de la placa. La placa se incubó durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO_2 . Las células desprendidas de la placa de cultivo fueron trasladadas al tubo correspondiente. Los tubos se centrifugaron a 1550 rpm durante 5 minutos, después de los cuales se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 μL de PBS 1x. Los tubos se centrifugaron nuevamente con los mismos parámetros descritos y el sobrenadante se resuspendió en 500 μL de buffer de unión, en el caso de los controles, y en 480 μL del mismo en el caso de las muestras. En este ensayo se consideraron 2 controles de células vivas y 4

controles de células muertas. Después de haber resuspendido el pellet, se añadieron los fluorocromos a los tubos de los controles según lo que se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidades de cada reactivo para la preparación de los controles necesarios para la detección de apoptosis y necrosis.

	1		2		3	4
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Muertas	Muertas
PI (5 μ L)	-	-	✓	✓	-	✓
AnexinaV-FITC (3 μ L)	-	-	✓	-	✓	✓

En el caso de las muestras se preparó un volumen suficiente de un máster mix que contuviera 5 μ L de PI y 3 μ L de anexinaV-FITC para cada muestra a analizar; se completó el volumen requerido con buffer de unión. A cada muestra se le agregaron 20 μ L de este máster mix. Tanto los controles como las muestras se incubaron con los fluorocromos durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Finalizado el tiempo de incubación, se adquirieron los datos por citometría de flujo. Para este ensayo se utilizó el citómetro Attune NxT (Thermofisher). Para la potencia en la luz de dispersión lateral (SSC) y frontal (FSC) se utilizó un voltaje de 350 mV.

2.5 Evaluaciones de arresto celular e internalización de las nanopartículas

2.5.1 Evaluación del efecto de las nanopartículas en el ciclo celular

A lo largo del ciclo celular, el contenido de DNA varía según el estadio que atraviesen las células, como se esquematiza en la Figura 10. Cada fase del ciclo celular de una célula sana contiene una cantidad característica de DNA relacionada con los eventos que ocurren durante dicha fase. Por ejemplo, durante la fase S se lleva a cabo la replicación del material genético, por lo que las células en la fase G2/M tendrán el doble de DNA previo a la división. De esta forma, cuando algún agente induce el arresto del ciclo celular, el contenido de DNA se concentrará en el pico característico de la fase en que se hayan arrestado las células. Así, la cuantificación del contenido de DNA por citometría de flujo es útil para determinar si una población celular desarrolla sus funciones de manera normal o se encuentra arrestada.

Para determinar si las ZnO NPs ocasionan alteraciones en el ciclo celular, se evaluó el contenido de DNA en las células HT-29 por tinción del material genético con yoduro de propidio, el cual es un reactivo fluorescente que se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA y permite su análisis por citometría de flujo. Se debe considerar que el yoduro de propidio se une a todos los ácidos nucleicos, por lo que durante el ensayo se incluyó una ARNasa para evitar que el ARN presente en las células interfiriera en los resultados.

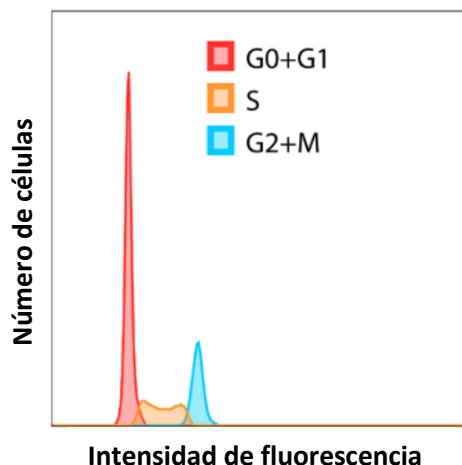


Figura 10. Contenido de DNA en cada fase del ciclo celular de una célula sana. Modificado de Sheerar, 2017.

Partiendo del conteo por exclusión de azul tripano, descrito en el apartado 2.3.4, se colocaron 5,000 células en cada pozo de una placa de 96 pozos con un volumen final de 100 μ L por pozo del medio de cultivo correspondiente. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Terminado el periodo de incubación, se prepararon las soluciones stock de las ZnO NPs, descritas en el apartado 2.1.1, a partir de las cuales se preparó una serie de soluciones con medio de cultivo a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ g/mL de ZnO NPs. Se removió el medio de cultivo en que se encontraban las células y se colocaron 100 μ L por pozo de cada concentración a evaluar, ubicando una concentración por fila. Como control positivo se reservó una fila con células que no fueron expuestas a las ZnO NPs. Las células se expusieron a los tratamientos por periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de exposición correspondiente, se removió el medio con ZnO NPs y se colocaron 100 μ L de tripsina en cada pozo. La placa se incubó durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Las células desprendidas de la placa de cultivo fueron trasladadas a un tubo de microcentrifuga para cada tratamiento y control empleado. Estos tubos se centrifugaron a 1550 rpm durante 5 minutos, después de los cuales se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 mL de PBS 1x. Los tubos se centrifugaron nuevamente

con los mismos parámetros descritos y el sobrenadante se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% a 4°C. Las muestras con etanol se mantuvieron a 4°C durante 2 horas para permeabilizar las células. Después de este tiempo, los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos y se lavó el pellet celular con 1 mL de PBS 1x. Una vez más se centrifugaron las muestras y se resuspendieron en 200 µL de una solución de PBS 1x y 100 µg/mL de ARNasa con la cual se incubaron los tubos durante 20 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron a cada tubo 200 µL de una solución de PBS 1x y 50 µg/mL de PI con la cual se incubaron los tubos durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron una última vez y se resuspendieron en PBS para adquirir los datos por citometría de flujo. Para este ensayo se utilizó el citómetro Attune NxT (Thermofisher). Se empleó una potencia de 350 para el láser de dispersión lateral (SSC) y frontal (FSC) y un valor de 150 para el láser BL-3 para la detección de PI.

2.5.2 Determinación de la internalización de las nanopartículas

Para determinar si las ZnO NPs son internalizadas por las células, se utilizaron los datos obtenidos por citometría de flujo en el apartado 2.4.4. Durante la adquisición de eventos, el citómetro de flujo analiza el tamaño de las células a través de la dispersión frontal de la luz o Forward Scatter Light, FSC por sus siglas en inglés, y la complejidad interna de las células a partir de la dispersión lateral de la luz o Side Scatter Light, SSC por sus siglas en inglés. En este caso, la internalización de las nanopartículas se estimó realizando una comparación entre la complejidad de una población celular sana, empleada como control, y la complejidad de las células expuestas a ZnO NPs.

2.6 Determinación de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas

2.6.1 Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno

A pesar de que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un mecanismo necesario para el desarrollo normal de todas las células viables, de presentarse un desbalance entre la generación de ROS y la producción de especies antioxidantes, las células sufrirían daños a la membrana y otras estructuras intracelulares e incluso podrían verse comprometidas a la muerte celular. Por este motivo, resulta importante evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de ZnO NPs en la generación de especies

reactivas de oxígeno en las líneas celulares, para lo cual se llevó a cabo una determinación cuantitativa por fluorimetría y una determinación cualitativa por microscopía confocal utilizando el reactivo fluorogénico 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFDA) (Sigma Aldrich-Cat. 35845) como marcador de las especies reactivas de oxígeno.

Evaluación cuantitativa de la producción de ROS

Se colocaron 5,000 células en cada pozo de una placa negra de 96 pozos con un volumen final de 100 μ L por pozo del medio de cultivo correspondiente a la línea celular. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras el periodo de incubación, se prepararon una serie de soluciones con medio de cultivo a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/mL de ZnO NPs a partir de las soluciones stock de ZnO NPs. Se removió el medio de cultivo en que se encontraban las células y se colocaron 100 μ L por pozo de cada concentración a evaluar, ubicando una concentración por fila; como control positivo se reservó una fila con células que no fueron expuestas a las ZnO NPs. Las células se expusieron a los tratamientos por periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de exposición correspondiente, se removió el medio con ZnO NPs y se realizaron dos lavados con PBS 1x, colocando 200 μ L en cada pozo y agitando cuidadosamente. Después, se colocaron en cada pozo 100 μ L de medio de cultivo sin SFB con DCFDA 25 μ M y se incubó la placa nuevamente a 37°C y 5% de CO₂ durante 1 hora. Posteriormente, cubriendo la placa de la luz para evitar el fotoblanqueo del reactivo, se descartó el medio de cultivo con DCFDA y se realizó otro lavado con PBS 1x. Finalmente, se agregaron a cada pozo 100 μ L de agua desionizada estéril y se leyó la fluorescencia a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/530 nm en un espectrofluorómetro Cary Eclipse (Agilent). Se utilizó como referencia la fluorescencia de las ROS producidas por las células que no fueron expuestas a las ZnO NPs.

A fin de evaluar la contribución de los iones Zn²⁺ en la producción de ROS, se llevó a cabo el ensayo anteriormente descrito, pero incubando cada una de las concentraciones de ZnO NPs con 10 μ L de EDTA 1 mM durante 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂.

Evaluación cualitativa de la producción de ROS por microscopía confocal

Para la determinación cualitativa de la generación de ROS se siguió el mismo protocolo descrito para la determinación cuantitativa. Sin embargo, se utilizó una concentración de DCFDA de 30 μ M. Además, a los 55 minutos de incubación se agregaron a cada pozo 50 μ L de medio de cultivo sin SFB con una concentración 5 μ M del colorante azul fluorescente Hoechst 33342 que se intercala entre las bases de

DNA y es útil para obtener una tinción específica nuclear que permita localizar las células al observarlas en el microscopio confocal. Las células se incubaron con Hoechst 33342 durante 5 minutos, después de los cuales se descartó el medio de cultivo y se realizó otro lavado con PBS 1x. Finalmente, se agregaron a cada pozo 100 μ L de medio de cultivo sin SFB. Las células se observaron en un microscopio confocal invertido Olympus Fluoview FV100, usando un objetivo 20X. La tinción nuclear con el reactivo Hoescht 33342, así como la oxidación del DCFDA, se observaron con la ayuda de un láser de iones de argón (excitación a 488 nm) con filtros FTIC para emisión a 515-530 nm. La intensidad del láser se mantuvo en un 20 % para reducir el foto-blanqueo. Las micrografías se capturaron utilizando el software FV-10 ASW y se analizaron con el software Visor FV-10ASW versión 3.1 de Olympus. La barra de escala representa 50 μ m.

2.6.2 Evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

Lisis celular para obtención de proteína total

Para cuantificar la cantidad total de proteína en las células expuestas a los distintos tratamientos y determinar cuánta de esta corresponde a la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD), es necesario llevar a cabo una lisis celular. Se comenzó por colocar 5,000 células en cada pozo de una placa de 96 pozos con un volumen final de 100 μ L por pozo del medio de cultivo correspondiente. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Terminado el periodo de incubación, se prepararon las soluciones stock de las ZnO NPs, a partir de las cuales se preparó una serie de soluciones con medio de cultivo a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ g/mL de ZnO NPs. Se removió el medio de cultivo en que se encontraban las células y se colocaron 100 μ L por pozo de cada concentración a evaluar, ubicando una concentración por fila. Como control positivo se colocó una fila con células que no fueron expuestas a las ZnO NPs y como control negativo se colocó una fila con Triton X-100 al 2%. Las células se expusieron a los tratamientos por periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de exposición correspondiente, se removió el medio con ZnO NPs y se realizó un lavado con PBS 1x, colocando 200 μ L en cada pozo y agitando cuidadosamente. Posteriormente, se colocaron 100 μ L de tripsina y se incubó la placa durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Las células desprendidas de la placa de cultivo fueron trasladadas a un tubo de microcentrífuga para cada tratamiento y control empleado. Estos tubos se centrifugaron a 1550 rpm durante 5 minutos, después de los cuales se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS 1x. Los tubos con PBS 1x se centrifugaron de nuevo con los parámetros anteriores, el pellet se resuspendió en 930 μ L de agua miliQ y se agregaron a cada tubo 70 μ L de buffer RIPA frío. Se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos, luego de los cuales las muestras se

agitaron en vórtex durante 3 minutos, se sonicaron en baño por 5 minutos y finalmente se congelaron a -70°C durante 10 minutos. Transcurridos los 10 minutos, se descongelaron las muestras y se repitió el mismo ciclo 3 veces más. Una vez completados los 4 ciclos, las muestras se centrifugaron a 12500 rpm por 15 minutos a 4°C . Finalmente, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo para cada muestra y el homogenizado se utilizó para las determinaciones de actividad de SOD.

Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa es una de las principales enzimas del sistema antioxidante de las células puesto que cataliza la conversión del anión de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Para determinar la actividad de SOD se empleó el SOD determination kit (19160 Sigma-Aldrich). Este kit basa la cuantificación de SOD en la reducción de la sal de tetrazolio WST-1 (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio por el anión superóxido, reacción que es inhibida por SOD. Debido a que la absorbancia a 440 nm del compuesto de formazán formado por la reducción de la sal WST-1 es proporcional a la cantidad del anión superóxido presente, la actividad de SOD puede cuantificarse midiendo los cambios en la coloración a esta longitud de onda. Derivado de lo anterior y siguiendo las instrucciones del kit, se preparó una placa de 96 pozos agregando los reactivos correspondientes a cada pozo, según la siguiente tabla:

Tabla 2. Cantidades de cada reactivo para la preparación de muestras y blancos para la medición de la actividad de SOD

	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Homogenizado	20 μL		20 μL	
Agua mili Q		20 μL		20 μL
Solución de WST	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL
Solución enzimática	20 μL	20 μL		
Buffer de dilución			20 μL	20 μL

Una vez listos los pozos, se incubó la placa por 20 minutos a 37°C para posteriormente leer la absorbancia de los pozos a 450 nm por espectrofotometría UV-Vis. Las absorbancias registradas se emplearon en la ecuación 3 a fin de calcular el porcentaje de inhibición de SOD:

$$\text{Actividad de SOD (\% de inhibición)} = \frac{(A_{\text{Blanco 1}} - A_{\text{Blanco 3}}) - (A_{\text{Muestra}} - A_{\text{Blanco 2}})}{(A_{\text{Blanco 1}} - A_{\text{Blanco 3}})} \times 100 \quad (3)$$

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

3.1.1 Espectroscopia UV-Vis

Al medir la frecuencia de resonancia del plasmón de superficie de las ZnO NPs se obtuvo una banda de absorción máxima en 365 nm para las nanopartículas en suspensión y en 375 nm para las nanopartículas en polvo (Figura 11).

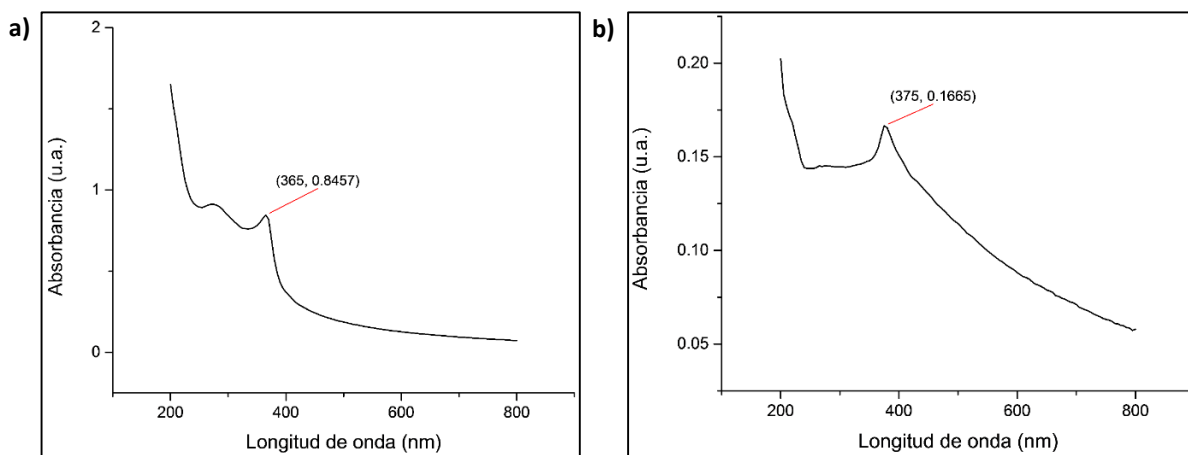


Figura 11. Espectros de absorbancia UV-Vis de las ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b).

3.1.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la Figura 12 a y 12 b, se presentan las imágenes de TEM de las ZnO NPs en suspensión y polvo, respectivamente. En dichas imágenes es posible observar que ambas presentaciones de ZnO NPs tienen morfologías heterogéneas e irregulares, es decir, las nanopartículas de las muestras tienen distintas formas. En ambos casos, se aprecia que las nanopartículas forman agregados. Por otro lado, a fin de determinar la distribución de tamaños de las NPs, se construyó un histograma de frecuencias para cada clase de ZnO NPs, expuestos en la Figura 12 c y 12 d. El eje de abscisas de los histogramas representa los tamaños de nanopartículas reportados y el eje de las ordenadas la frecuencia con que se reportaron entre las 100 nanopartículas medidas para cada presentación de ZnO NPs. La nanopartícula de menor tamaño

encontrada en la muestra de ZnO NPs en suspensión es de 57 nm, la de mayor tamaño es de 168 nm y el tamaño promedio de las nanopartículas es de 101 nm. En el caso de las ZnO NPs en polvo el menor tamaño reportado es de 24 nm, el mayor de 211 nm y el tamaño promedio es de 70 nm.

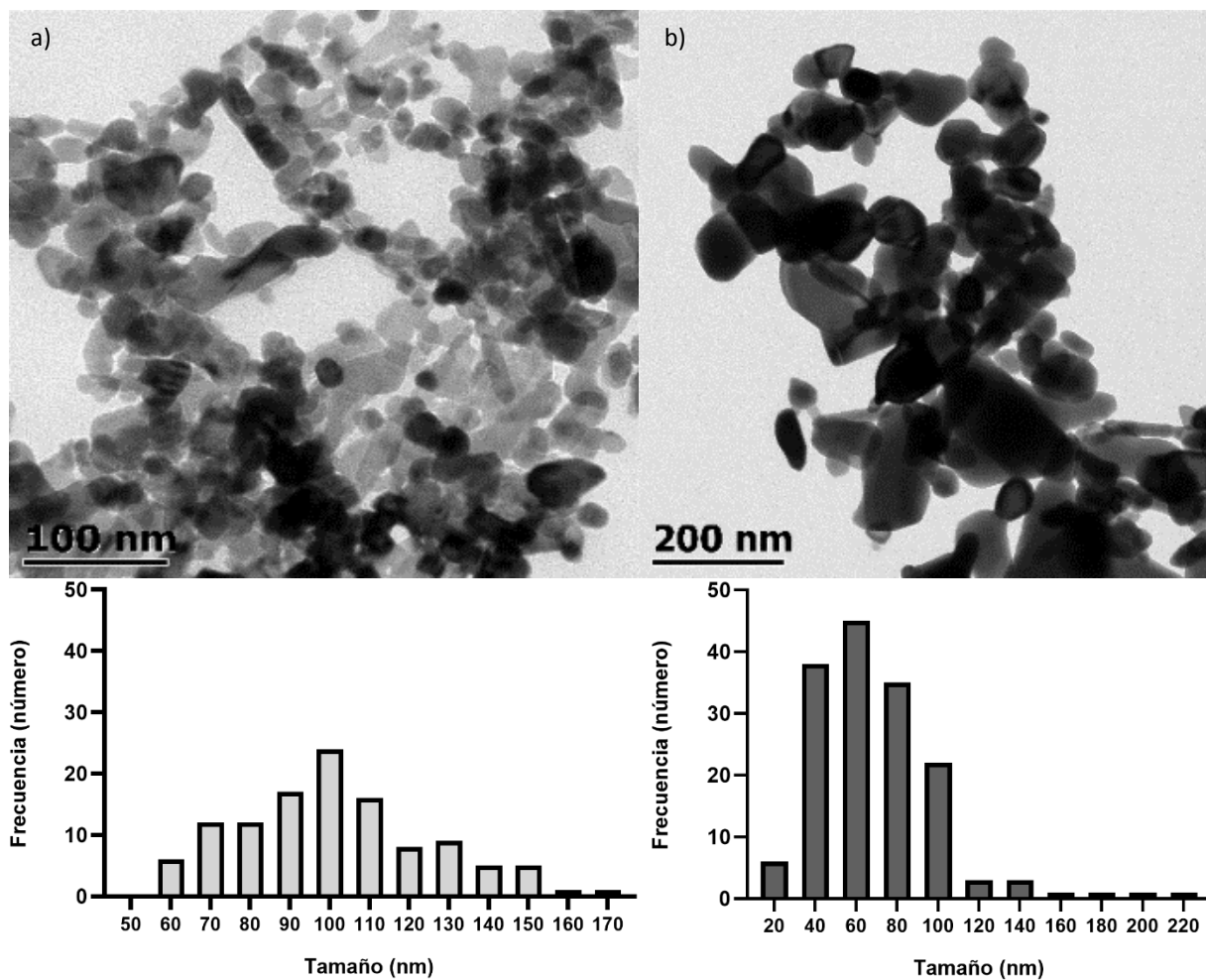


Figura 12. Imágenes obtenidas por TEM e histogramas de distribución de tamaños de las ZnO NPs en suspensión (a, c) y en polvo (b, d).

3.1.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los valores de tamaño y estabilidad en solución de las ZnO NPs en suspensión y polvo se determinaron mediante la técnica de dispersión dinámica de luz y se presentan en la Tabla 3. A fin de conocer si el tamaño y la estabilidad de las ZnO NPs en solución cambia con respecto al tipo de dispersante y el tiempo de incubación, las mediciones de ambos parámetros se llevaron a cabo en agua desionizada (pH 5.5), medio de cultivo DMEM sin SFB (pH 7.4) y medio de cultivo DMEM con SFB (pH 7.4). Además, con el propósito de reproducir las condiciones en las que se encuentran las ZnO NPs durante los ensayos con

células, se realizaron las mismas mediciones tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, parámetros bajo los cuales se mantienen los cultivos celulares. La Tabla 2 muestra la recopilación de los resultados obtenidos a 0 y 24 horas para cada tipo de ZnO NPs en cada dispersante.

En todos los casos, el tamaño de las nanopartículas incrementa de 0 a 24 horas, con excepción de las ZnO NPs en polvo en agua desionizada; este incremento es más abrupto para las ZnO NPs en suspensión. El potencial zeta también aumenta de manera importante en ambos tipos de ZnO NPs, pero, solo cuando se encuentran en DMEM con o sin SFB. Caso contrario, el potencial zeta disminuye de 0 a 24 horas en ambas clases de ZnO NPs en agua desionizada.

Tabla 3. Tamaño y potencial zeta de las ZnO NPs en distintos dispersantes a 0 y 24 horas.

		Agua desionizada		DMEM sin SFB		DMEM con SFB	
		0 horas	24 horas	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas
ZnO NPs en suspensión	Tamaño (nm)	194.1	1178	1297	2000	165.7	1965
	Potencial zeta (mV)	-24.2	-17.1	-27.2	-32.6	-3.82	-22.2
ZnO NPs en polvo	Tamaño (nm)	920	1746	1089	2069	752	2109
	Potencial zeta (mV)	-24.0	-18.0	-15.4	-22.1	-5.2	-12.8

3.2 Evaluaciones de biocompatibilidad

3.2.1 Evaluación de la viabilidad celular por reducción de resazurina

En la Figura 13, se presentan los resultados de viabilidad celular de la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs (5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL) durante 24, 48 y 72 horas. El eje de abscisas de las gráficas representa las concentraciones evaluadas y el eje y el porcentaje de viabilidad del cultivo, asociado a la reducción de resazurina. Tras 24 horas de exposición a las ZnO NPs en suspensión (Figura 13 a), la viabilidad celular a las concentraciones de 5 y 10 µg/mL es muy similar a la del control, sin embargo, se presenta un decremento no significativo en el porcentaje de viabilidad celular a 20 µg/mL. A

partir de esta concentración, la viabilidad celular permanece igual para 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ en los tres tiempos evaluados. A 48 y 72 horas se observan las mismas similitudes entre 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, pero, la disminución de la viabilidad celular a 20 $\mu\text{g/mL}$ es más pronunciada que a 24 horas. Particularmente a 72 horas, se presenta un porcentaje menor de células viables desde los 5 $\mu\text{g/mL}$ y la estabilización de la viabilidad celular entre los 20 y los 50 $\mu\text{g/mL}$.

Se aprecia que la gráfica que presenta el comportamiento del cultivo expuesto a ZnO NPs en polvo (Figura 13 b) sigue una tendencia semejante, aunque el decremento en el porcentaje de viabilidad se presenta a 10 $\mu\text{g/mL}$ y permanece igual conforme la concentración de ZnO NPs aumenta en los tres tiempos evaluados.

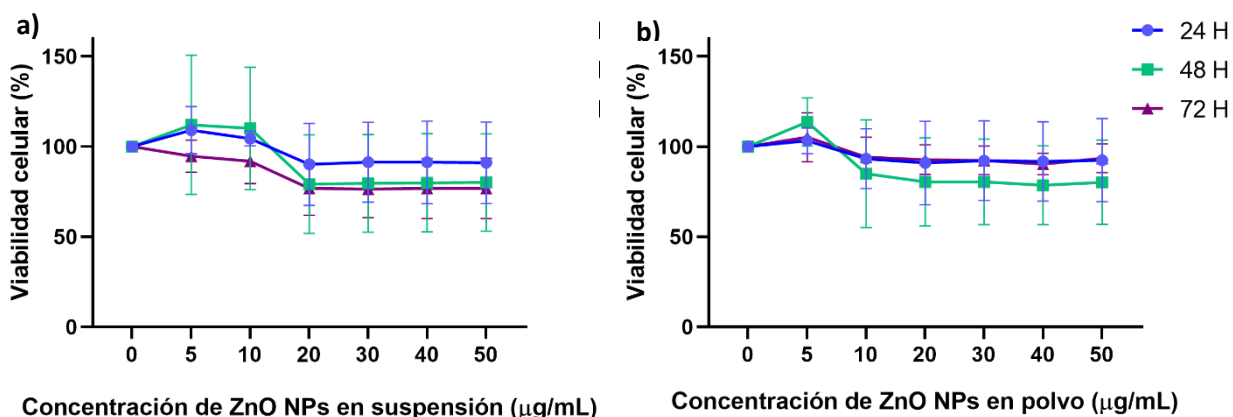


Figura 13. Viabilidad celular, asociada a la reducción de resazurina, de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b) durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

3.2.2 Evaluación de la contribución de los iones Zn^{2+} a la citotoxicidad

A continuación, se presenta la comparación del efecto de las ZnO NPs en suspensión y polvo en la viabilidad celular cuando las células son expuestas a las nanopartículas dispersadas y cuando son expuestas a las nanopartículas dispersadas e incubadas con EDTA 1 mM con la finalidad de que este compuesto actúe como agente quelante de los iones Zn^{2+} desprendidos de las nanopartículas al medio dispersante.

En la Figura 14, es posible apreciar que la viabilidad de las células expuestas durante 24 horas a ZnO NPs incubadas con EDTA es mayor a la viabilidad de las células expuestas a ZnO NPs sin EDTA, tanto para las nanopartículas en suspensión (Figura 14 a) como para las nanopartículas en polvo (Figura 14 b). Además,

con respecto a las concentraciones de los tratamientos incubados con EDTA, la viabilidad celular es muy similar entre todas las concentraciones evaluadas, disminuyendo ligeramente, sin llegar a ser estadísticamente significativo en las concentraciones más altas (30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$) de ambas presentaciones de nanopartículas.

3.2.3 Determinación de la hemocompatibilidad de las nanopartículas

Un parámetro crucial en la acreditación de cualquier agente como biocompatible es la hemocompatibilidad, la cual refleja la tolerancia de la membrana de los eritrocitos a la presencia de dicho agente. El histograma expuesto en la Figura 15 muestra el porcentaje de hemólisis ocasionado por la exposición de los glóbulos rojos a las distintas concentraciones de ZnO NPs en suspensión y en polvo, además del porcentaje de hemólisis de las células expuestas únicamente a medio de cultivo (control negativo), y de células expuestas a Tritón-X100 al 20% como control positivo de hemólisis.

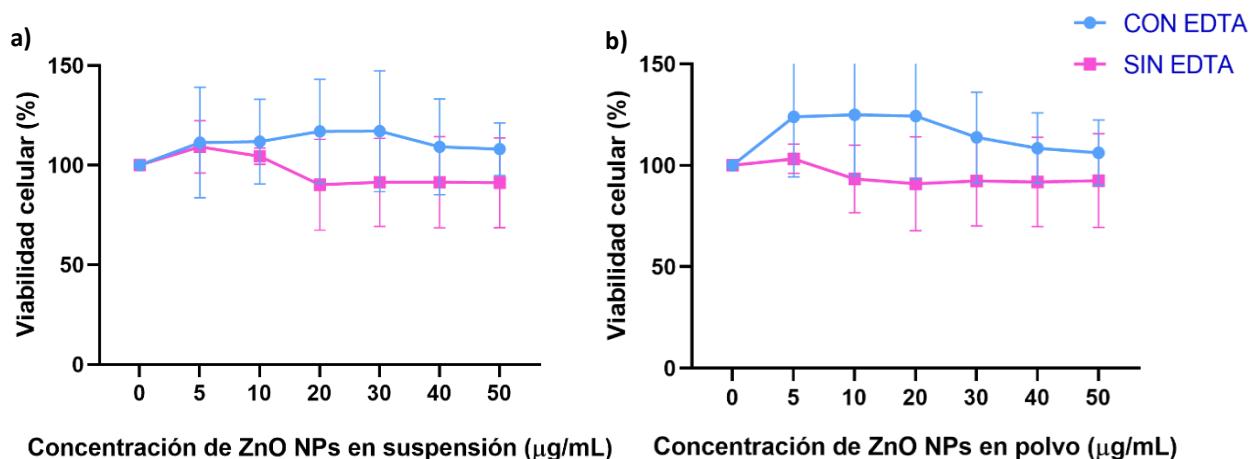


Figura 14. Comparación de la viabilidad celular, asociada a la reducción de resazurina, de la línea HT-29 expuesta durante 24 horas a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b), dispersadas y previamente incubadas con EDTA 1 mM. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

Todas las concentraciones de ZnO NPs, en ambas presentaciones, ocasionan un porcentaje de hemólisis muy similar que ronda el 12%. Este valor excede el límite de 5% que permite considerar a una sustancia como hemocompatible y que está reglamentado por la ISO 10993-4:201

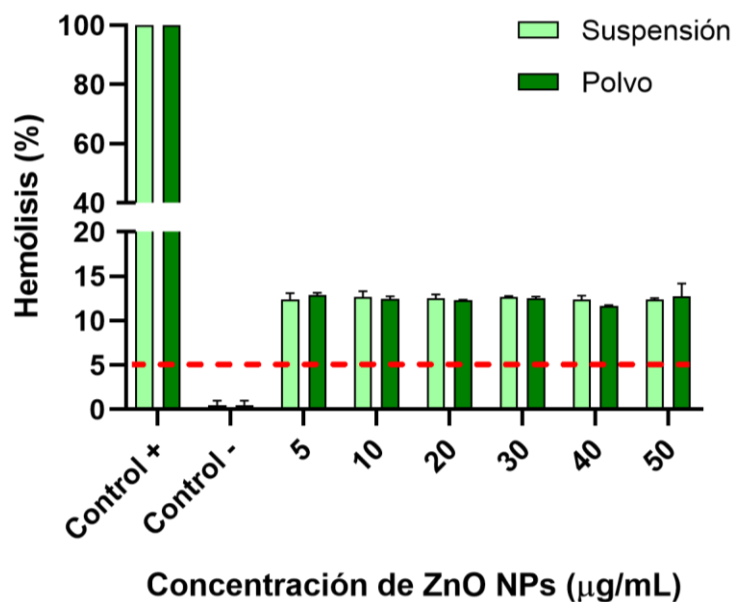


Figura 15. Porcentajes de hemocompatibilidad de las concentraciones evaluadas de ZnO NPs en suspensión y polvo.

3.2.4 Evaluación de cambios morfológicos por exposición a las nanopartículas

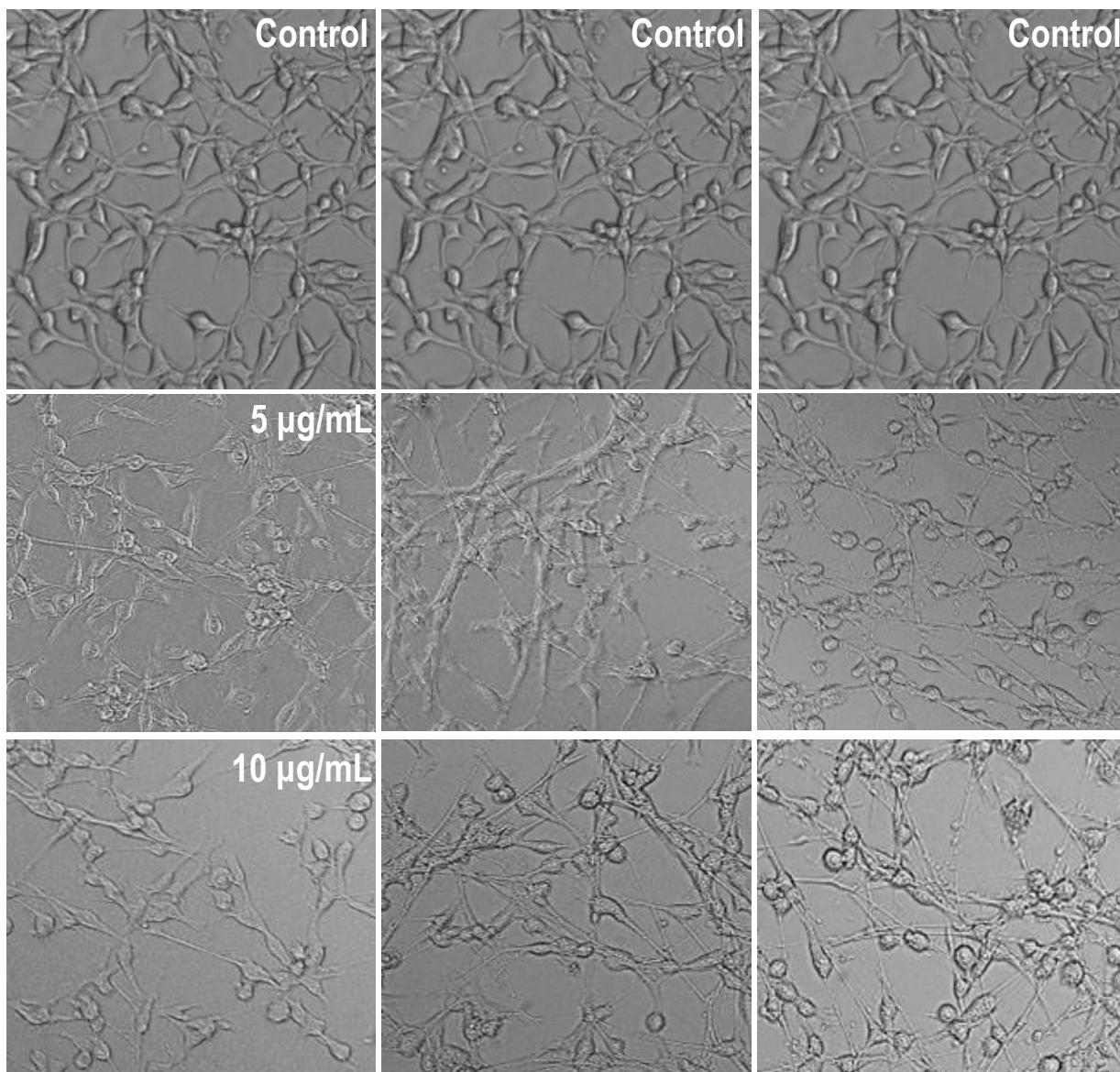
Como un reflejo cualitativo directo del impacto de las ZnO NPs en la viabilidad celular, se observaron las células bajo el microscopio óptico invertido a fin de evidenciar los cambios en la morfología, crecimiento y organización de la línea celular HT-29. Las figuras 16 y 17 muestran las imágenes de los cultivos obtenidas en los ensayos de citotoxicidad con ZnO NPs en suspensión y en polvo, respectivamente. La morfología normal de las células de colon HT-29 es alargada, las células tienden a formar prolongaciones de la membrana en varias direcciones que las conecten con células cercanas y, por lo tanto, forman redes entre sí.

En el caso de las ZnO NPs en suspensión (Figura 16), se aprecia que a una concentración de 5 µg/mL la morfología de las células es igual a la del control en los tres tiempos evaluados. A 10 µg/mL la morfología es similar a la del control, aunque la confluencia es ligeramente menor. A esta concentración, la reducción de la confluencia es más notoria a 24 que a 72 horas debido a que las células tuvieron más tiempo para continuar proliferando a pesar de la presencia de nanopartículas. El primer cambio significativo en la morfología se manifiesta cuando las células HT-29 han sido expuestas a 20 µg/mL, concentración en la que puede observarse que las prolongaciones de membrana se acortan y las células se distancian y adquieren una forma menos alargada y ligeramente esférica. Las células que han sido expuestas a 30 µg/mL de ZnO NPs, se tornan completamente esféricas y retraen todas las prolongaciones de la membrana, mientras que

las concentraciones de 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO NPs inducen un notable distanciamiento entre las células y la pérdida de su morfología típica.

En la Figura 17, las células HT-29 expuestas a 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZnO NPs en polvo presentan un cambio evidente en su morfología típica, que consta de una disminución en el tamaño y número de células.

ZnO NPs en suspensión



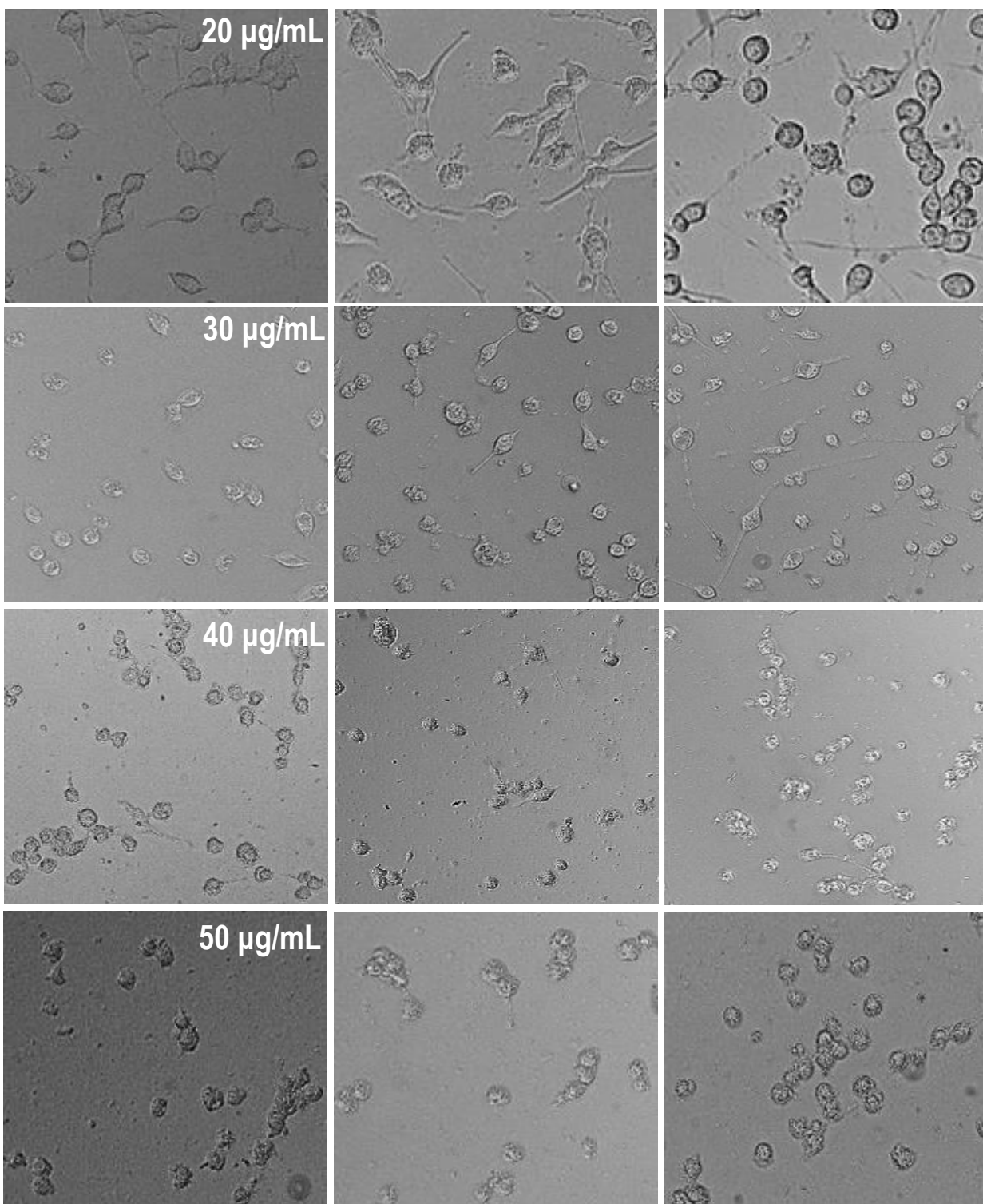
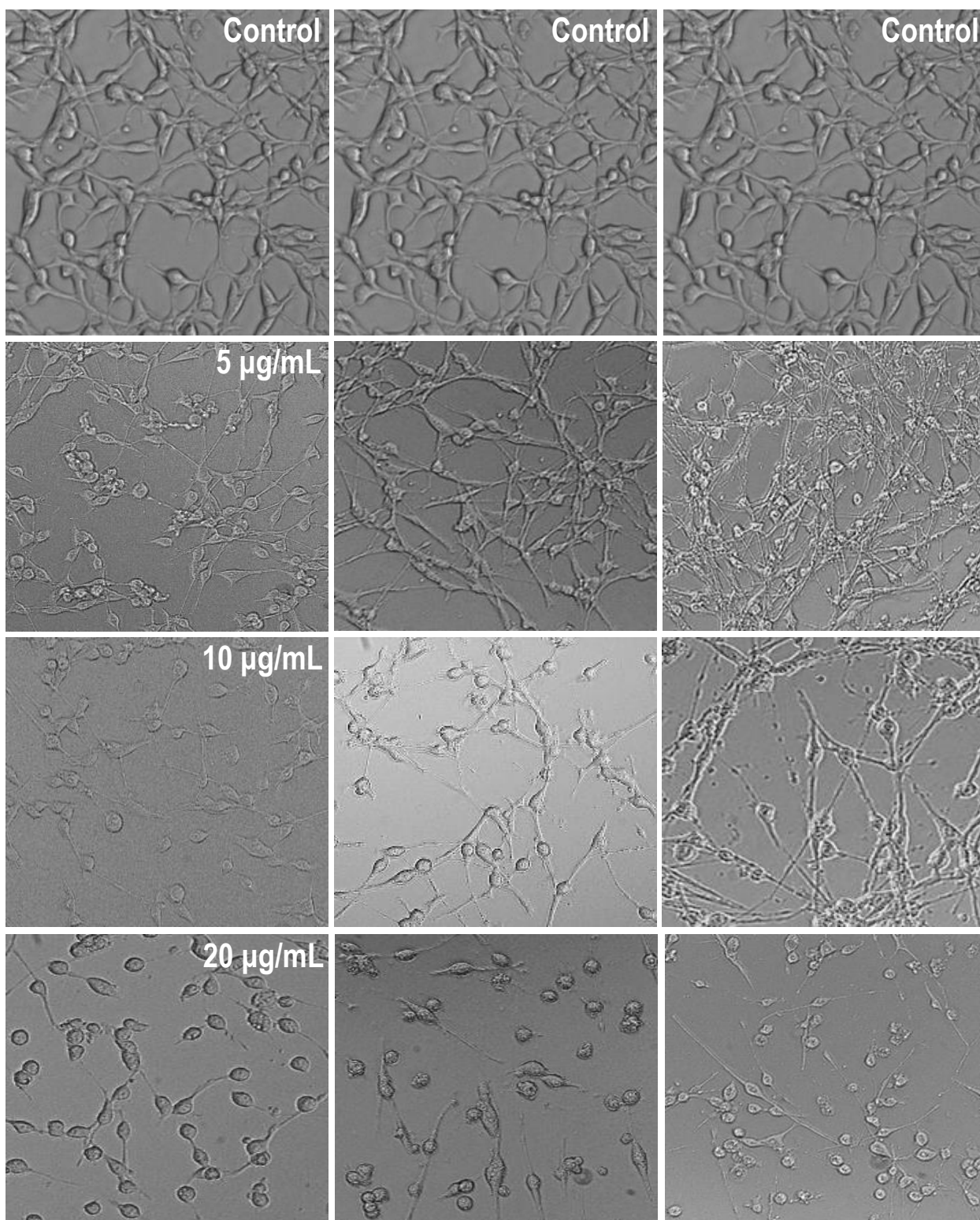


Figura 16. Imágenes obtenidas por microscopía óptica invertida de la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones evaluadas de ZnO NPs en suspensión durante 24, 48 y 72 horas.

Zno NPs en polvo



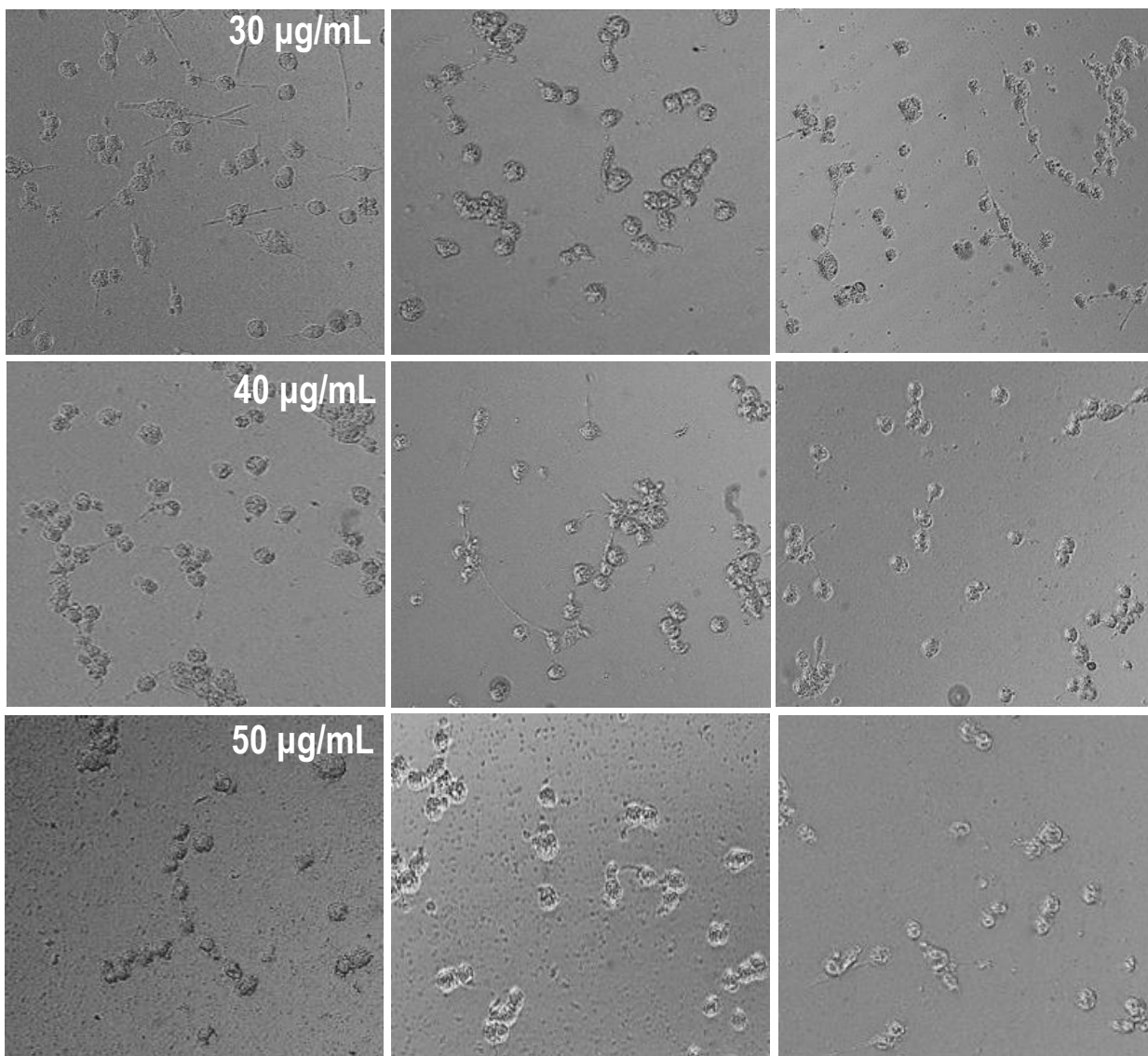


Figura 17. Imágenes obtenidas por microscopía óptica invertida de la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones evaluadas de ZnO NPs en polvo durante 24, 48 y 72 horas.

3.2.5 Determinación del tipo de muerte celular inducido por las nanopartículas

Para establecer la biocompatibilidad de las ZnO NPs es importante determinar si la exposición de las células a estas nanopartículas activa mecanismos de muerte celular. Este análisis puede llevarse a cabo por citometría de flujo y permite identificar los dos tipos de muerte celular más comunes: necrosis y apoptosis en etapas tempranas y tardías.

Las figuras 18, 19 y 20, muestran el porcentaje de células que se encuentran atravesando procesos de necrosis, apoptosis temprana y apoptosis tardía, tras ser expuestas a ambas presentaciones de ZnO NPs durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

A 24 horas (Figura 18), las células en necrosis y apoptosis tardía son casi nulas y aquellas en apoptosis temprana aumentan de manera dependiente de la concentración en el caso de las ZnO NPs en suspensión. En las células expuestas a las ZnO NPs en polvo, el porcentaje de células en apoptosis temprana fluctúa ligeramente entre las concentraciones evaluadas, pero es superior al control.

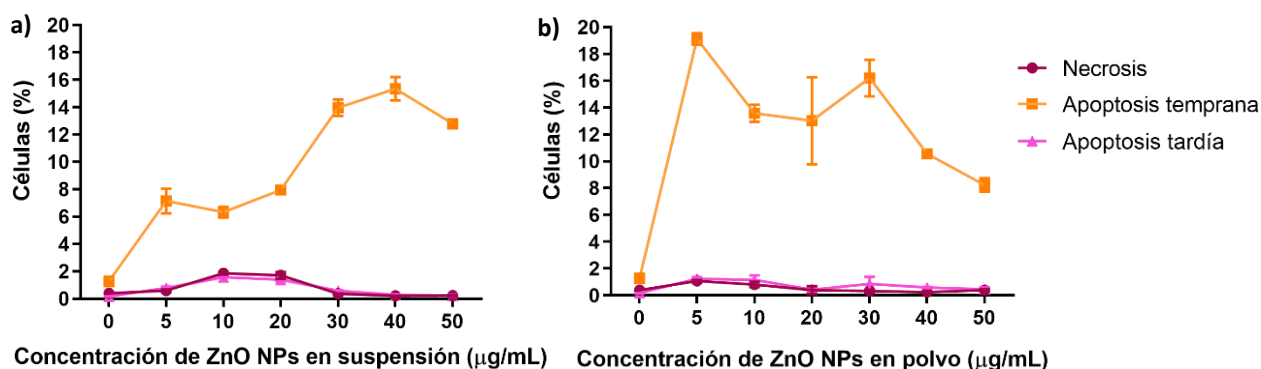


Figura 18. Porcentaje de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b) durante 24 horas. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

Después de que las células HT-29 han sido expuestas por 48 horas a las diferentes concentraciones de ZnO NPs (Figura 19), las células en necrosis y apoptosis tardía también son casi nulas. Para el caso de las células en apoptosis temprana, en esta ventana de tiempo, la relación entre el aumento del porcentaje de células y la concentración de ZnO NPs es clara para ambas presentaciones de nanopartículas. En general, el porcentaje de células en apoptosis temprana es menor que a 24 horas en todas las concentraciones.

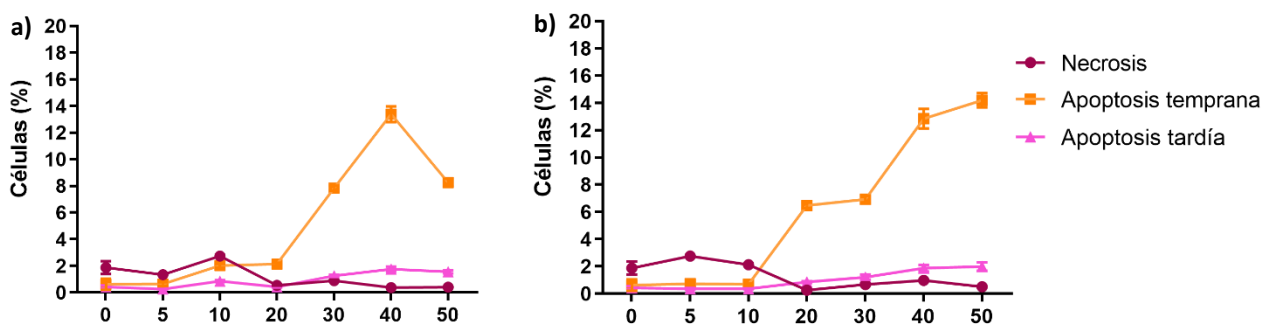


Figura 19. Porcentaje de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b) durante 48 horas. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

Finalmente, después de 72 horas de exposición a las ZnO NPs (Figura 20), las células en necrosis y apoptosis tardía continúan siendo casi nulas. El porcentaje de células HT-29 en apoptosis temprana disminuye con respecto a las 24 y 48 horas. Sin embargo, a las 72 horas, aún es posible observar la relación entre el aumento en el porcentaje de células en apoptosis temprana y la concentración para las ZnO NPs en polvo. Sin embargo, en el caso de las ZnO NPs en suspensión, este proceso de muerte celular únicamente aparece en las concentraciones de 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$.

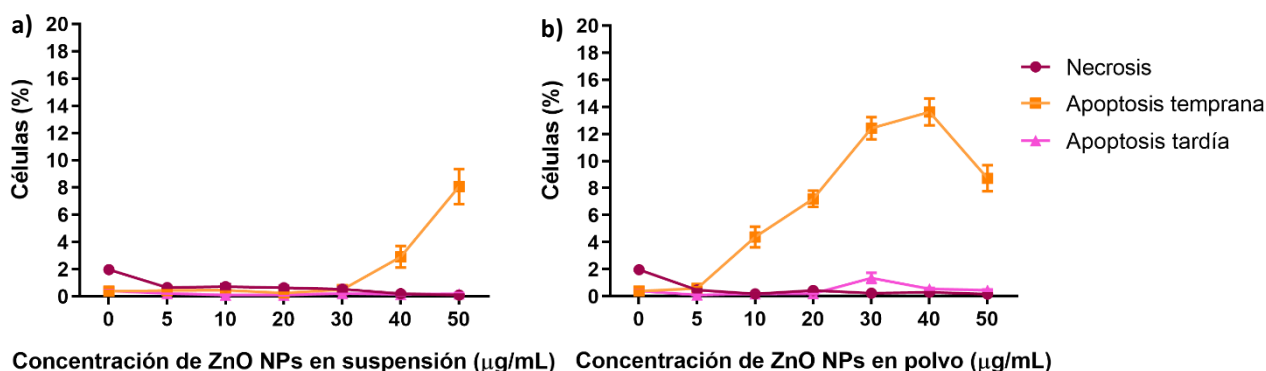


Figura 20. Porcentaje de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b) durante 72 horas. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

3.3 Evaluaciones de arresto celular e internalización de las nanopartículas

3.3.1 Evaluación del efecto de las nanopartículas en el ciclo celular

A fin de profundizar en los hallazgos de las evaluaciones de biocompatibilidad, se llevaron a cabo ensayos para determinar si la fracción viable de células sufre un arresto de alguna de las fases del ciclo celular, por lo cual se analizó la cantidad de células en cada fase del ciclo celular de un cultivo expuesto a ambas presentaciones de ZnO NPs a tres tiempos, comparada con la cantidad de células en cada fase del ciclo celular de un cultivo control que no fue expuesto a las ZnO NPs.

Las figuras 21, 22 y 23, muestran el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular tras ser expuestas a ambas presentaciones de ZnO NPs durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

El porcentaje normal de células que se encuentran en cada etapa del ciclo celular se determinó en un cultivo control sin tratamiento de nanopartículas, siendo la fase G2/M la más abundante, seguida de la fase G0/G1 y luego la S, como se muestra en la Figura 21. Sin embargo, la fase más abundante en las células

HT-29 expuestas por 24 horas a ambas presentaciones de ZnO NPs es la fase G0/G1, seguida de la fase S, en todas las concentraciones evaluadas.

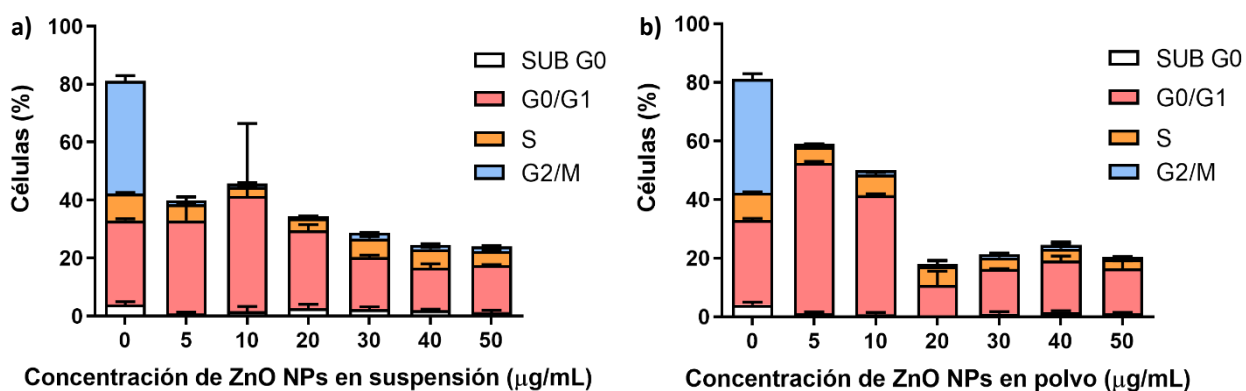


Figura 21. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b) durante 24 horas. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

En un cultivo de células HT-29 expuestas durante 48 horas a las distintas concentraciones de ZnO NPs, se observa que la fase más abundante es la G0/G1 tanto para las nanopartículas en suspensión (Figura 22 a) como en polvo (Figura 22 b). Además, el porcentaje de células en la fase S es menor que a las 24 horas.

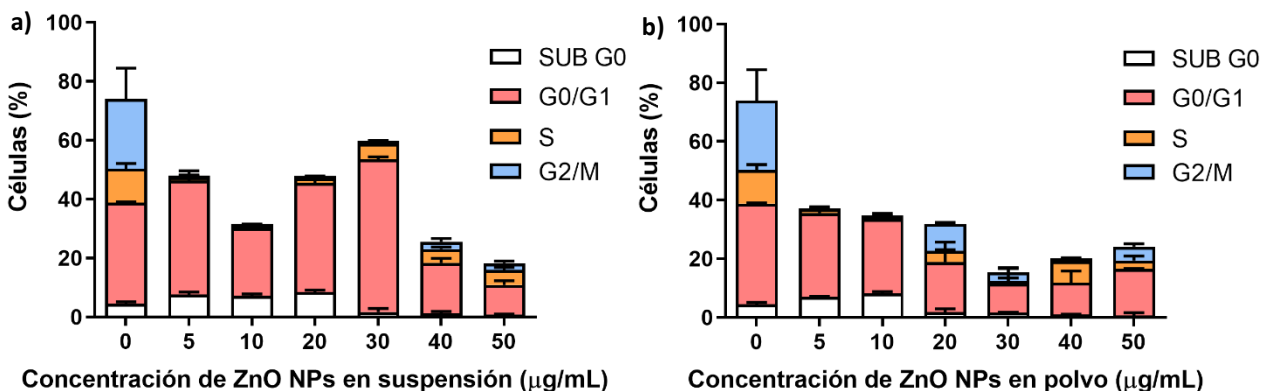


Figura 22. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b) durante 48 horas. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

A 72 horas (Figura 23), el porcentaje de células recuperadas del control es menor que a 48 horas y, por lo tanto, menor que a 24 horas. En esta ventana de tiempo, la fase más abundante es la G0/G1 en todos los

casos incluido el control negativo. Dicha fase es prácticamente la única registrada en las concentraciones de 30 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs en suspensión y de 20 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs en polvo.

3.3.2 Evaluación de la internalización de las nanopartículas

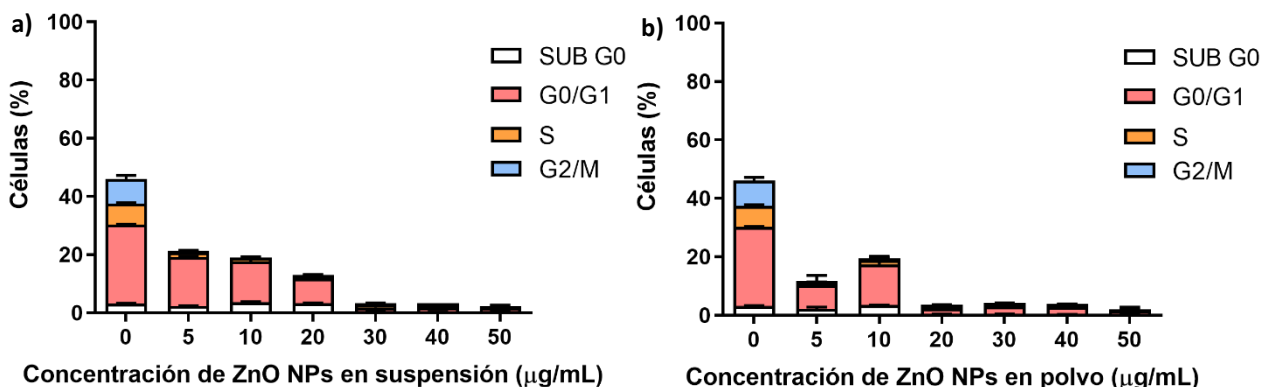


Figura 23. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b) durante 72 horas. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

Una de las interacciones más importantes que pueden ocurrir entre las células y las nanopartículas es la internalización de estas últimas. Las células son capaces de internalizar a las ZnO NPs por procesos de endocitosis que consisten en encerrar a las nanoestructuras en endosomas formados a partir de la membrana plasmática y que son trasladados hacia el citoplasma. La presencia de estos endosomas ocasiona un aumento en la complejidad celular que puede ser detectado por citometría de flujo mediante la comparación de un control de células que no fueron expuestas a las ZnO NPs.

El eje de abscisas de los histogramas de la Figura 24 muestra las concentraciones evaluadas de ZnO NPs, mientras que el eje y presenta el porcentaje de incremento en la complejidad celular de las células expuestas a las nanopartículas durante 24, 48 y 72 horas con respecto al cultivo control.

Se observa que después de las 72 horas de incubación con 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs en suspensión (Figura 24 a), las células HT-29 incrementan su complejidad celular. En todos los casos restantes, las variaciones en la complejidad son mínimas.

Las células expuestas a ZnO NPs en polvo durante 72 horas sufren un incremento en su complejidad a partir de los 40 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas. Asimismo, una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas en la presentación en polvo, incrementa la complejidad celular desde las 24 horas (Figura 24 b).

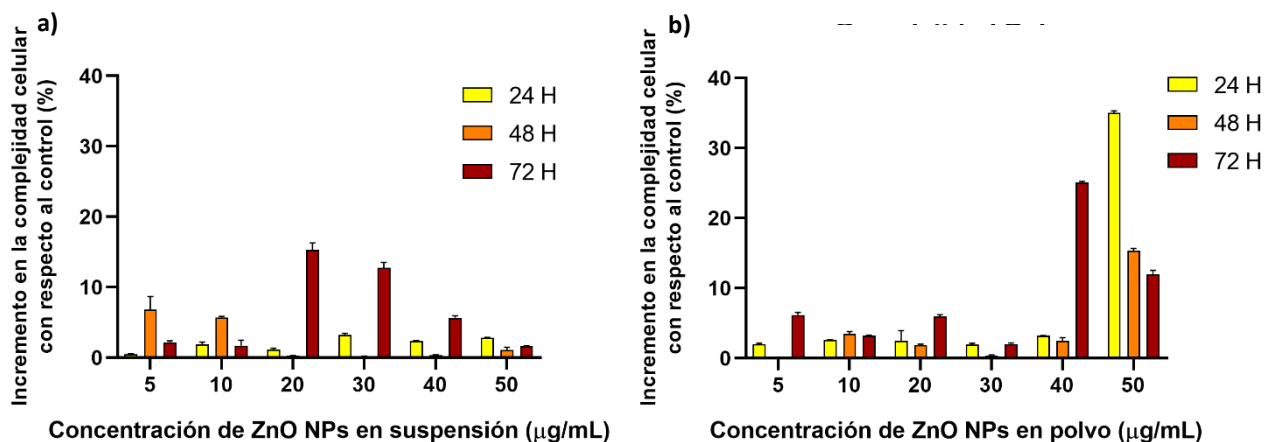


Figura 24. Incremento en la complejidad celular de la línea HT-29 expuesta a ZnO NPs en suspensión (a) y en polvo (b) durante 24, 48 y 72 horas, comparada contra una población control sin tratamiento. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado

3.4 Determinación de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas

3.4.1 Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno

Evaluación cuantitativa de la producción de ROS

En la Figura 25, se presentan los resultados de la generación de especies reactivas de oxígeno en la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs (5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$) durante 24, 48 y 72 horas. El eje de abscisas de las gráficas representa las concentraciones evaluadas y el eje y la fluorescencia ocasionada por la reducción del reactivo DCFDA por acción de las especies reactivas de oxígeno.

En el caso de las ZnO NPs en suspensión (Figura 25 a) se observa que la tendencia en la producción de ROS con relación a la concentración de ZnO NPs es semejante en los tres tiempos evaluados. Ninguna de las concentraciones ocasiona niveles de ROS mayores a los que la línea celular HT-29 produce de manera basal. En los tres tiempos, se presenta un punto máximo de producción de ROS a 10 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs que permanece menor al nivel del cultivo control (células sin tratamiento). A partir de esta concentración,

los niveles de ROS disminuyen y se mantienen de 20 a 50 $\mu\text{g/mL}$. A pesar de que la tendencia es la misma en relación a las concentraciones, el porcentaje de ROS aumenta de las 24 a las 72 horas.

El fenómeno expuesto en la gráfica correspondiente a las ZnO NPs en polvo (Figura 25 b) es muy similar al presentado en la Figura 25 a, con un punto máximo a 10 $\mu\text{g/mL}$ en los tres tiempos, mismo que tampoco sobrepasa el valor de fluorescencia del control. A concentraciones mayores de 10 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs, la generación de ROS en las células HT-29 disminuye y se mantiene en todos los casos. De la misma manera que con las ZnO NPs en suspensión, la tendencia en los tres tiempos es la misma en relación a las concentraciones, pero el porcentaje de ROS incrementa de las 24 a las 72 horas.

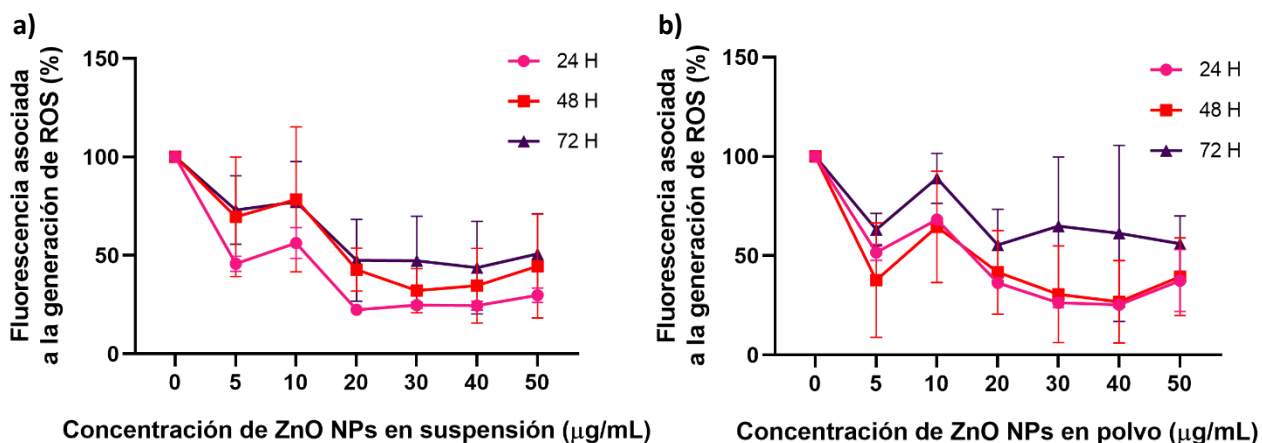


Figura 25. Evaluación cuantitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión (a) y polvo (b) durante 24, 48, 72 horas. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado

Evaluación de la contribución de los iones Zn^{2+} a la generación de ROS

De manera similar a lo presentado para la viabilidad celular, se evaluó la comparación del efecto de las ZnO NPs en suspensión y polvo en la generación de especies de oxígeno reactivas cuando las células son expuestas a las nanopartículas dispersadas y cuando son expuestas a las nanopartículas dispersadas e incubadas con EDTA 1 mM como agente quelante de los iones Zn^{2+} .

En la Figura 26, se observa que las células expuestas durante 24 horas a las ZnO NPs (sin EDTA) producen una cantidad menor de ROS con respecto a las células control sin tratamiento. Por el contrario, cuando las ZnO NPs han sido incubadas con el agente quelante EDTA, a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ los niveles de ROS son menores a los del control con EDTA, mientras que a concentraciones de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ los niveles

de ROS aumentan de manera ligera y progresiva conforme incrementa la concentración de ZnO NPs. Esta tendencia es la misma tanto para nanopartículas en suspensión (Figura 26 a) como para nanopartículas en polvo (Figura 26 b).

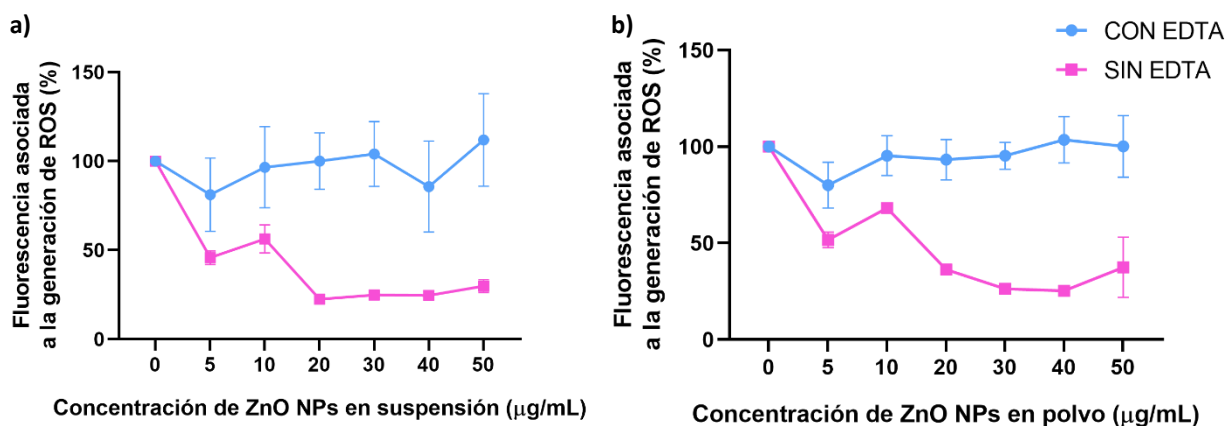


Figura 26. Comparación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuesta durante 24 horas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión (a) y polvo (b), dispersadas y previamente incubadas con EDTA 1 mM. Los resultados representan el promedio $\pm$ desviación estándar de cada concentración por triplicado.

Relación de la viabilidad celular con la generación de ROS

Con la finalidad de comprender mejor cuál es la respuesta de las células de colon cuando son expuestas a las ZnO NPs, se analizó la relación entre la viabilidad celular y la generación de especies de oxígeno reactivas, reflejada en las gráficas correspondientes a la Figura 27. Esta relación expresa la cantidad de células viables que generan el total de las especies de oxígeno reactivas cuantificadas en el cultivo a 24, 48 y 72 horas de exposición a nanopartículas de óxido de zinc en suspensión y polvo.

Después de que las células de colon se han expuesto durante 24 horas a las ZnO NPs en suspensión (Figura 27 a), una concentración de 5 µg/mL de las nanopartículas ocasiona una producción de ROS menor a la del control que es desencadenada por la misma cantidad de células viables. A una concentración de 10 µg/mL de ZnO NPs, la producción de ROS intracelular es ligeramente mayor, a pesar de que la viabilidad celular permanece prácticamente igual. Por el contrario, en las concentraciones restantes la viabilidad permanece igual y la producción de ROS disminuye entre 20 y 40 µg/mL y finalmente sube ligeramente a 50 µg/mL. Esta tendencia también se observa en las concentraciones evaluadas a 48 horas, pero, en comparación con las 24 horas, se presentan niveles mayores de ROS y menores de células viables. A 72 horas, una cantidad menor de células viables producen la misma cantidad de ROS que a 48 horas al exponer a las

células a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. A concentraciones entre 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$ una cantidad menor de células viables producen cantidades mayores de ROS en comparación con lo reportado a las 48 horas.

La tendencia en la producción de ROS y viabilidad celular expuesta anteriormente, se presenta también en las evaluaciones con las ZnO NPs en polvo correspondientes a 24 horas (Figura 27 b). A una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ evaluada a 48 horas, el porcentaje de ROS se reduce y la viabilidad aumenta ligeramente con respecto a las 24 horas. A partir de los 10 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad disminuye y se mantiene, alcanzando niveles menores a los reportados a 24 horas, mientras que los niveles de ROS aumentan únicamente a 10 $\mu\text{g/mL}$, concentración tras la cual presentan una ligera caída. En el caso de las evaluaciones a 72 horas, la viabilidad permanece igual en todas las concentraciones. Sin embargo, los niveles de ROS son mucho mayores que los registrados a 48 horas. El porcentaje de ROS sigue la misma tendencia descrita a 24 y 48 horas entre los 5 y los 20 $\mu\text{g/mL}$, pero a 30 y 40 $\mu\text{g/mL}$ la producción de especies reactivas de oxígeno incrementa de nuevo, para tener una última caída a 50 $\mu\text{g/mL}$.

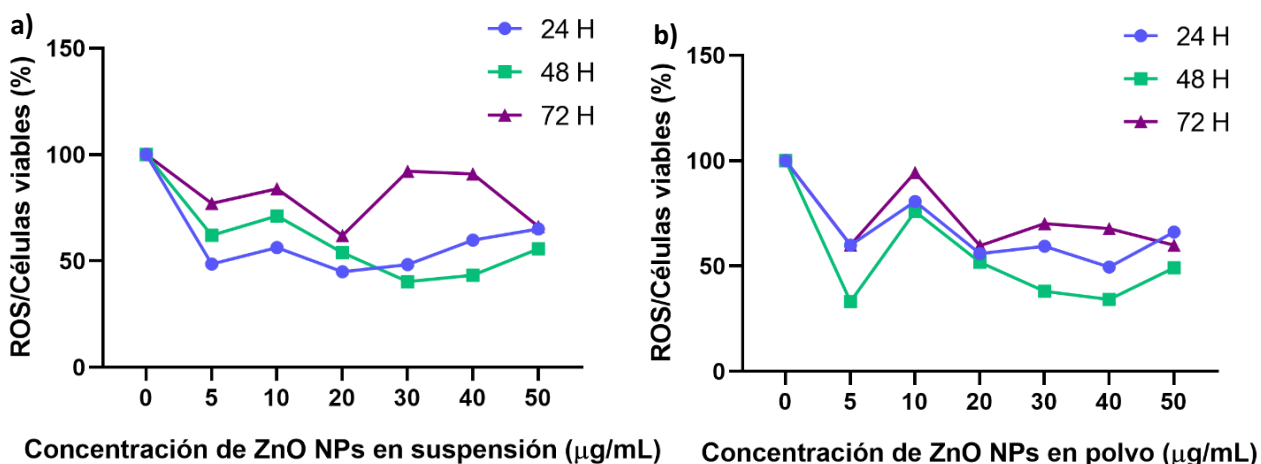


Figura 27. Relación entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fracción de células viables en la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión (a) y polvo (b) durante 24, 48 y 72 horas.

Relación de la viabilidad celular con la generación de ROS tras la quelación de los iones Zn^{2+}

Con base en las evaluaciones de viabilidad celular y producción de ROS cuando las células son expuestas a las nanopartículas cuyos iones Zn^{2+} han sido quelados previo a la interacción con las células, se construyeron las gráficas de la Figura 28. Estas gráficas expresan la relación entre la cantidad de células viables que generan el total de las especies de oxígeno reactivas cuantificadas en el cultivo a 24 horas de exposición a nanopartículas en suspensión y polvo tratadas con EDTA.

Se observa que la Figura 28 es muy similar a los resultados de la Figura 26 correspondientes a ambas ZnO NPs incubadas con EDTA. Esto indica que la relación ROS/células viables encontrada en los cultivos expuestos a nanopartículas con tratamiento de quelación de iones es muy similar a la tendencia de producción de ROS con nanopartículas queladas con EDTA debido a que la ausencia de iones mantiene la viabilidad del cultivo y las ROS generadas por las células corresponden casi de forma exclusiva a la producción endógena de la línea celular.

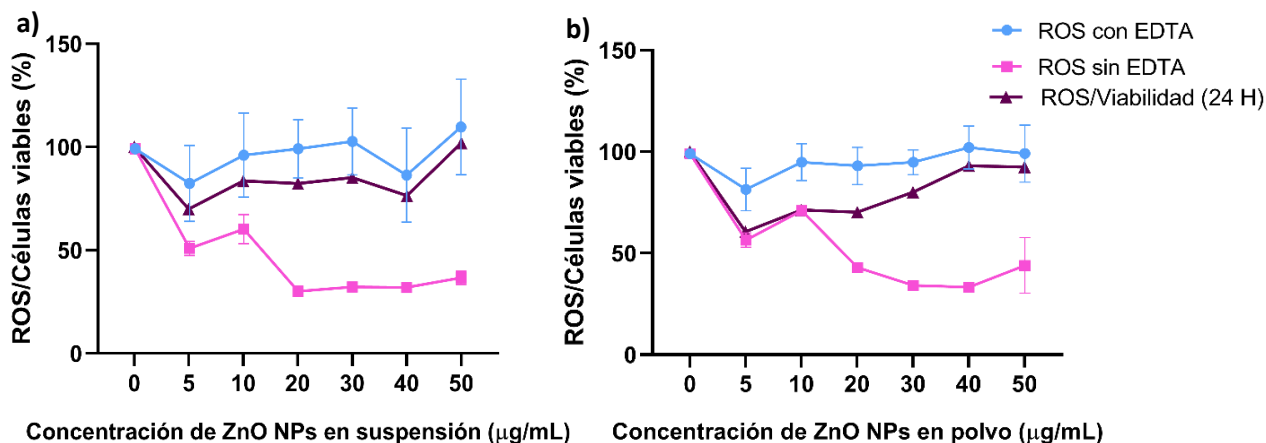


Figura 28. Relación entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fracción de células viables en la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión (a) y polvo (b), dispersadas y previamente incubadas con EDTA 1 mM y su comparación con la generación de especies reactivas de oxígeno con y sin este agente quelante.

Evaluación cualitativa de la producción de ROS por microscopía confocal

Para detectar por microscopía confocal las especies reactivas de oxígeno, medidas en el apartado anterior, se utilizó el reactivo DCFDA que al oxidarse adquiere una fluorescencia verde y funge como un marcador de las ROS, además del reactivo Hoechst 33342 que tiñe el núcleo de azul al intercalarse en las bases del DNA y permite localizar a las células dónde se producen las ROS.

En las figuras 29 y 30 se presentan las imágenes de la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión durante 48 y 72 horas, obtenidas por microscopía confocal. Se observa que, en concordancia con los ensayos cuantitativos por fluorimetría, la producción endógena de ROS en esta línea celular es mayor a la producción de ROS asociada a las concentraciones de ZnO NPs. En las evaluaciones a 48 horas, se observa que a 5 $\mu\text{g/mL}$ la producción de ROS es menor a la del control e incrementa a partir de los 10 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs, sin embargo, la producción de ROS disminuye en las concentraciones de 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas. Se aprecia lo mismo en las evaluaciones a 72 horas, aunque en este caso la fluorescencia es mayor, en conformidad con lo descrito en los ensayos

cuantitativos. Tanto a 48 como a 72 horas, la fluorescencia por ROS a 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ es casi inexistente y es muy notorio que las células han perdido por completo su morfología típica. Además, en las imágenes de confocal pueden corroborarse los cambios en la morfología asociados a la exposición a ZnO NPs, puntualizados a partir de las imágenes obtenidas por microscopía óptica invertida.

ZnO NPs en suspensión

48 horas

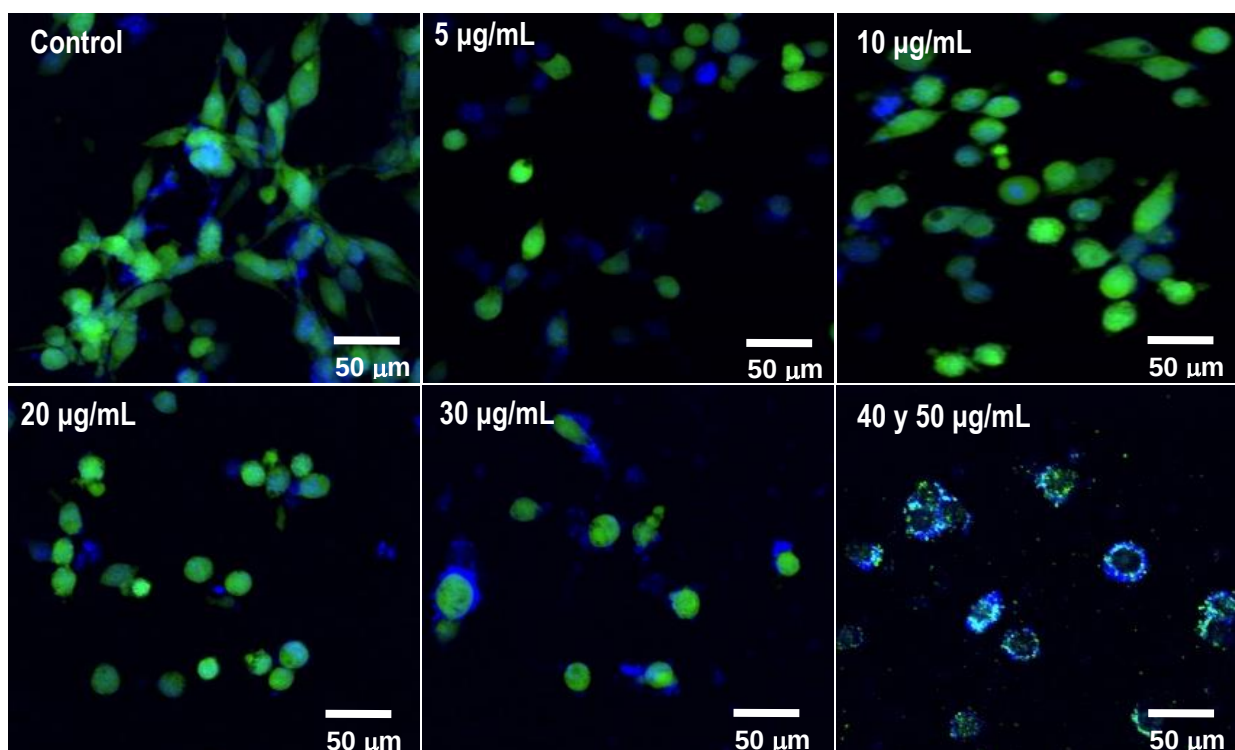


Figura 29. Evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión durante 48 horas.

Asimismo, en las figuras 31 y 32 se presentan las imágenes de la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en polvo durante 48 y 72 horas, obtenidas por microscopía confocal. En estas imágenes también se observa que la producción endógena de ROS en la línea celular HT-29 es mayor a la producción de ROS asociada a las concentraciones de ZnO NPs. Adicionalmente, se aprecia que la generación de ROS incrementa a 10 $\mu\text{g/mL}$ tanto a 48 como a 72 horas y disminuye a partir de los 30 $\mu\text{g/mL}$, en las evaluaciones a 48 horas, y a 20 $\mu\text{g/mL}$ en las evaluaciones a 72 horas. Después de esta concentración la fluorescencia comienza a disminuir conforme aumenta la concentración de NPs. En ambas ventanas de tiempo, las concentraciones a partir de los 30 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs en polvo ocasionan la pérdida completa de la morfología celular típica y la fluorescencia por ROS es casi nula.

72 horas

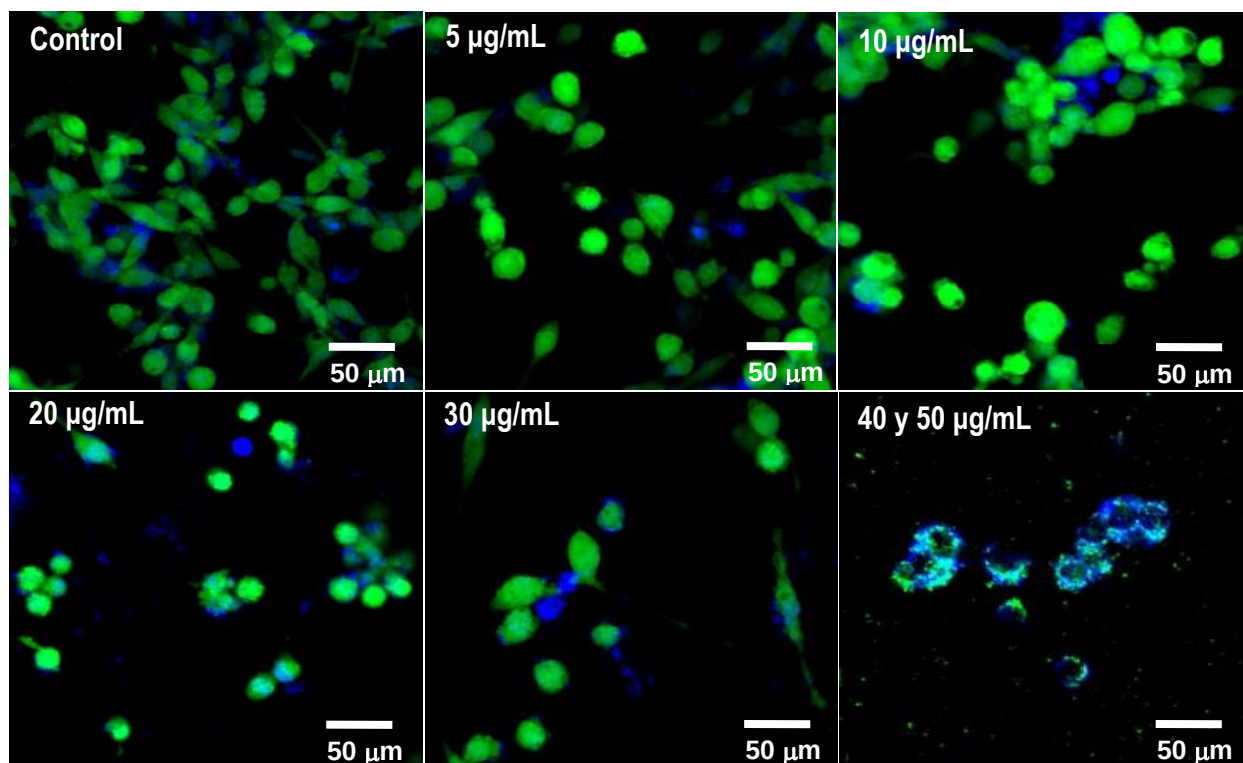


Figura 30. Evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión durante 72 horas.

ZnO NPs en polvo

48 horas

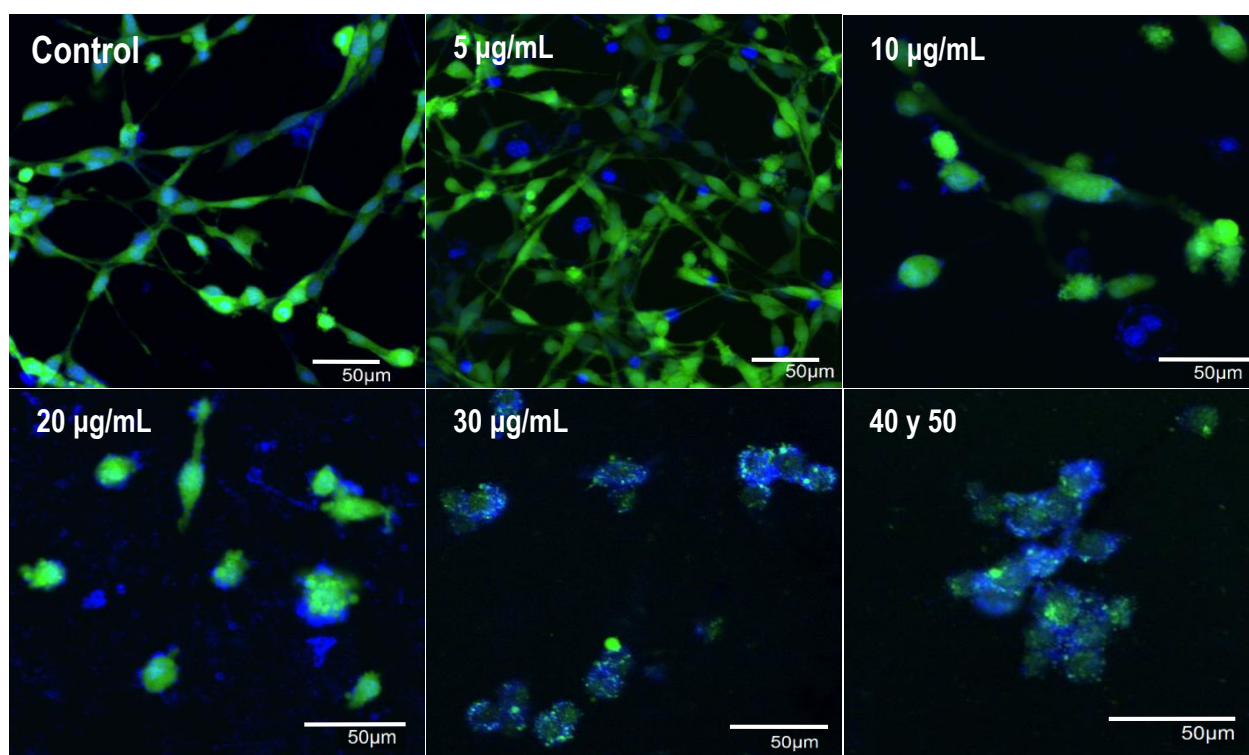


Figura 31. Evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en polvo durante 48 horas.

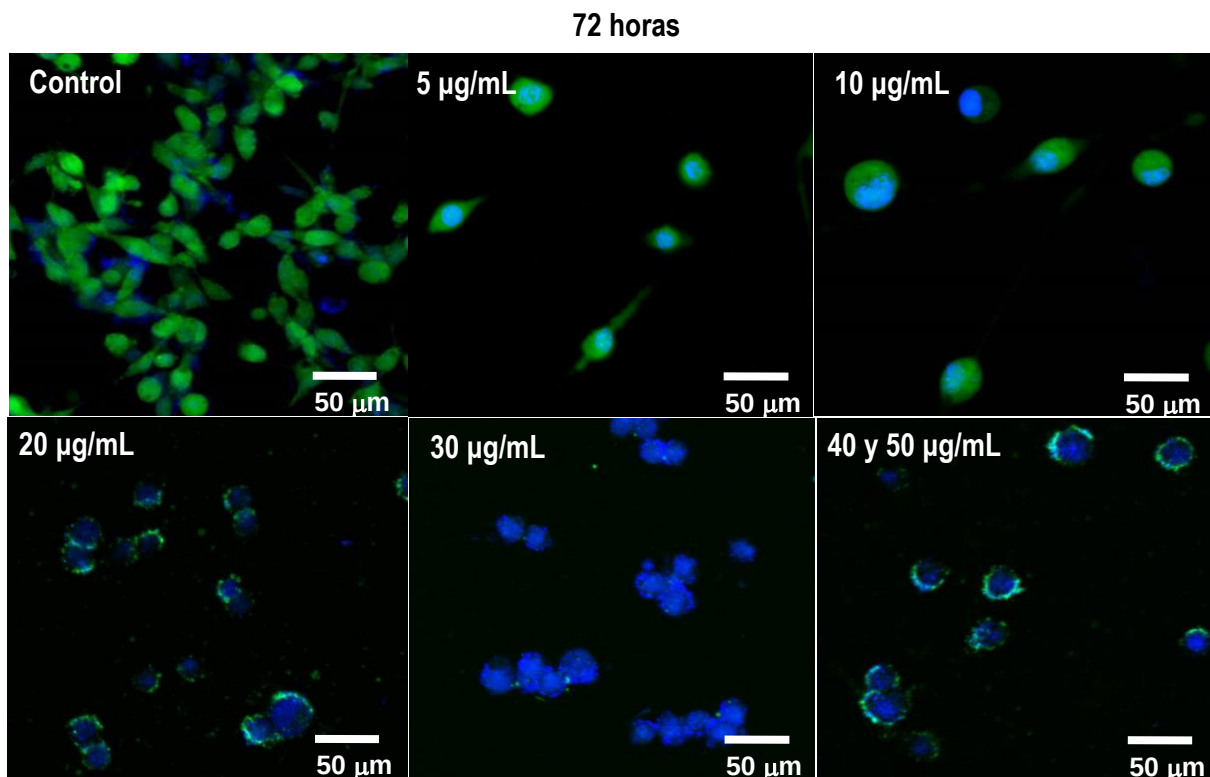


Figura 32. Evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 expuestas a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en polvo durante 72 horas.

3.4.2 Evaluación de la actividad de superóxido dismutasa

El sistema antioxidante de las células mantiene un balance entre la generación de especies de oxígeno reactivas y la actividad de enzimas antioxidantes. Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes en células expuestas a nanopartículas con respecto a la actividad basal de la línea celular contribuye a esclarecer si las células se encuentran en condiciones de estrés oxidativo y cuáles son las respuestas celulares a nivel del sistema antioxidante.

Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD)

La Figura 33 presenta la actividad de SOD con relación a la viabilidad del cultivo celular expuesta a cada tratamiento con ZnO NPs en suspensión y polvo, durante 24, 48 y 72 horas.

En el caso de las células expuestas por 24 horas a las ZnO NPs en suspensión (Figura 33 a), la actividad de SOD a partir de los 5 µg/mL de ZnO NPs, es igual a la de las células control sin tratamiento. En las demás concentraciones, de manera general, la actividad de SOD aumenta linealmente en relación a la

concentración de nanopartículas. Después de que las células HT-29 han sido expuestas a las diferentes concentraciones de ZnO NPs por 48 horas, la actividad de SOD es similar al control a 5 $\mu\text{g/mL}$. A 10 $\mu\text{g/mL}$, la actividad de SOD aumenta con respecto al control y es muy similar a la actividad registrada en 40 $\mu\text{g/mL}$. De la misma manera, los valores obtenidos son similares entre las concentraciones de 20, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$, aunque son menores que los observados a 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente, después de las 72 horas de exposición celular a esta presentación de las ZnO NPs, la actividad de SOD en todas las concentraciones fluctúa en niveles menores al control, exceptuando a las concentraciones de 5 y 40 $\mu\text{g/mL}$ en las cuales la actividad de SOD se asemeja a la del control.

Por otra parte, en las células de colon que han sido incubadas con las ZnO NPs en polvo (Figura 33 b), la actividad de SOD en el control es mucho mayor que en todos los tratamientos evaluados a las 24 horas de exposición. Luego de las 48 horas de exposición a las ZnO NPs, la actividad de SOD en las células HT-29 es similar al control, excepto en las concentraciones de 30 y 40 $\mu\text{g/mL}$. En cambio, a las 72 horas de exposición a las nanopartículas, la actividad de SOD en todas las concentraciones es mayor a la del control, con un nivel máximo inducido por una concentración de ZnO NPs de 10 $\mu\text{g/mL}$.

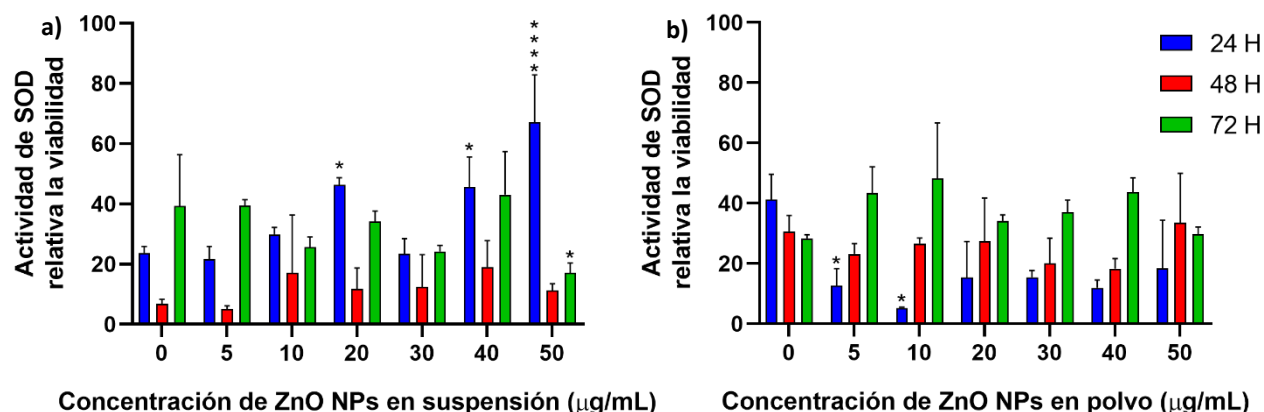


Figura 33. Actividad enzimática de superóxido dismutasa en la línea celular HT-29 expuesta a las concentraciones seleccionadas de ZnO NPs en suspensión (a) y polvo (b) durante 24, 48 y 72 horas. Se realizó ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 en la cual las diferencias significativas representan * $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

A fin de corroborar las especificaciones del proveedor acerca de las ZnO NPs utilizadas en los ensayos de esta investigación, se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas con las que se trabajó. Ambas formulaciones de nanopartículas se analizaron por espectroscopia UV-vis, y se comprobó que presentaban una banda de absorción máxima a 365 nm para las ZnO NPs en suspensión y a 375 nm para las ZnO NPs en polvo, las cuales son características de este material, según lo reportado por Abdulhadi *et al* y Bulcha *et al*, respectivamente (Abdulhadi *et al.*, 2021; Bulcha *et al.*, 2021). Ambos datos sugieren que las nanopartículas utilizadas efectivamente son de ZnO.

Las ZnO NPs se analizaron por TEM con el propósito de evaluar su morfología y tamaño, debido a que estos son dos factores clave en la citotoxicidad de los nanomateriales. Las imágenes obtenidas por TEM muestran que, en promedio, las ZnO NPs en suspensión tienen un tamaño mayor que las ZnO NPs en polvo, aunque en ambas formulaciones las nanopartículas tienden a estar juntas y formar agregados que alteran su tamaño original. Estas imágenes concuerdan con las reportadas por Subramaniam *et al* en 2019 y Tsymbalyuk *et al* en 2021, quienes también observaron la tendencia de las ZnO NPs a agregarse, y evidencian que los tamaños de las ZnO NPs en suspensión son más heterogéneos que los de la presentación en polvo (Subramaniam *et al.*, 2019; Tsymbalyuk *et al.*, 2021).

Por otra parte, para conocer más sobre la estabilidad y el tamaño en solución de las ZnO NPs, se realizaron mediciones por la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), con la cual es posible determinar la distribución de tamaños de las nanopartículas, considerando su radio hidrodinámico, y estimar su estabilidad tomando como referencia el potencial zeta promedio de la muestra. Dicho potencial depende de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas y del medio en que se encuentran, por lo tanto, esta medición se realizó en agua desionizada, para determinar el potencial zeta *per se* de las ZnO NPs, en DMEM sin suplementar, para estimar la interacción de las ZnO NPs con los iones provenientes de las sales del medio de cultivo, y en DMEM con SFB para conocer la interacción de las ZnO NPs con las proteínas del medio de cultivo. Adicionalmente, se consideró que el tiempo de exposición es un parámetro importante en la interacción entre las ZnO NPs y otros componentes del medio, motivo por el cual las mediciones se realizaron a 0 y 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂ (Lowry *et al.*, 2016).

Las mediciones de tamaño realizadas por DLS consideran el radio hidrodinámico de las nanopartículas, que se define como el límite hipotético dentro del cual las nanopartículas y sus iones asociados forman una entidad, por lo que los tamaños encontrados son mayores a los reportados por TEM. Para todos los dispersantes, se encontró que de 0 a 24 horas existe un incremento en el tamaño de ambas presentaciones de ZnO NPs.

Por otra parte, los valores de potencial zeta de ambas presentaciones de nanopartículas en agua desionizada disminuyen de 0 a 24 horas, lo cual implica una reducción de la estabilidad de las nanopartículas. Cuando se encuentran en DMEM sin SFB, ambas formulaciones de ZnO NPs aumentan su tamaño y potencial zeta de 0 a 24 horas, observación que se asocia a la elevada fuerza iónica del medio de cultivo celular. Los valores indican que las ZnO NPs interaccionan con las sales del medio aumentando el radio hidrodinámico y la estabilidad de las nanopartículas por el incremento de la superficie en que estas interactúan entre sí o con otras superficies. Finalmente, en el caso de las ZnO NPs en DMEM con SFB el tamaño y la estabilidad también aumentan en todos los casos, de nuevo por la fuerza iónica del medio y, en adición, por la alta proporción de proteínas del suero fetal bovino, gracias a las cuales es posible la formación de una corona proteica alrededor de las nanopartículas. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Peng *et al* en 2015, quienes puntualizan que la fuerza iónica del medio afecta la dispersión y distribución de tamaños de las ZnO NPs y que la presencia de polímeros o materia orgánica puede estabilizar a este tipo de nanopartículas (Peng et al., 2015).

Los valores obtenidos con todos los medios dispersantes evaluados tanto a 0 como a 24 horas concuerdan con la aglomeración observada a partir de las imágenes de TEM ya que todos los valores de potencial zeta obtenidos son menores de ± 30 mV, límite en el que habitualmente se considera que las nanopartículas son moderadamente estables ante la agregación (Lowry et al., 2016; Marsalek, 2014). En comparación, los valores de potencial zeta de las ZnO NPs en suspensión mostraron ser más estables que las ZnO NPs en polvo.

4.2 Evaluaciones de biocompatibilidad

Tras los ensayos de caracterización de las nanopartículas, se evaluaron los efectos de la exposición de la línea celular HT-29 a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de cada formulación de ZnO NPs. Se observa que durante las primeras 24 horas de exposición, las células pueden seguir proliferando en presencia de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs en suspensión. A una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ de esta

formulación de las nanopartículas, se presenta una ligera disminución en el porcentaje de células viables, el cual permanece igual en todas las concentraciones restantes. Esta tendencia se presenta nuevamente a 48 horas, periodo tras el cual la proliferación celular se detiene y, aunque la viabilidad celular es igual a la reportada a 24 horas por exposición a 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, la disminución en la viabilidad a partir de los 20 $\mu\text{g/mL}$ es más pronunciada en esta ventana de tiempo. En cambio, a 72 horas la viabilidad celular es menor que en los tiempos anteriores en todas las concentraciones evaluadas, lo cual indica que, a pesar de que aparentemente la viabilidad permanece idéntica a partir de los 20 $\mu\text{g/mL}$, se presenta un proceso celular que previene el desarrollo normal de las células, evita su proliferación y podría estar conduciéndolas a la activación de mecanismos de muerte celular.

Estas observaciones se presentaron de forma muy similar para el caso de las ZnO NPs en polvo, con la diferencia de que la proliferación entre las 24 y las 48 horas únicamente se da a 5 $\mu\text{g/mL}$ y la caída de la viabilidad se presenta a partir de los 10 $\mu\text{g/mL}$. Para esta formulación de ZnO NPs las disminuciones en la viabilidad que se presentan son menores que en la formulación en suspensión, sin embargo, se requiere una concentración menor de nanopartículas para provocar la paralización de la viabilidad celular y, por lo tanto, comenzar el bloqueo del desarrollo celular normal, lo cual sugiere que esta formulación de nanopartículas podría ser más citotóxica.

Por otra parte, en ninguna de las evaluaciones anteriormente descritas fue posible alcanzar el 50% de la viabilidad del cultivo celular por lo que no se obtuvieron datos suficientes para establecer una IC_{50} . Mu *et al*, en 2014, y Senapati & Kumar, en 2018, encontraron valores de viabilidad celular semejantes a los registrados en esta investigación para las concentraciones de ZnO NPs evaluadas a 24 horas, pero estos autores reportaron una tendencia distinta en el decremento progresivo de la viabilidad con respecto al tiempo (Mu *et al.*, 2014; Senapati and Kumar, 2018).

Respecto al potencial citotóxico de las ZnO NPs, muchas investigaciones sugieren que éste proviene de la liberación de iones Zn^{2+} al medio mientras que otros lo atribuyen a su internalización en forma de nanopartículas o a un efecto combinado de ambos factores.

A fin de evaluar las variaciones en la citotoxicidad de las ZnO NPs en ausencia de los iones Zn^{2+} , se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad adicionando EDTA como agente quelante de estos iones metálicos. En general, para ambas formulaciones de nanopartículas, se expone que las células pueden seguir proliferando a pesar de que la concentración de ZnO NPs aumente, lo cual indica que, de acuerdo con lo reportado con diversos autores, la toxicidad de la nanopartículas proviene principalmente de los iones

metálicos (Król et al., 2017; Mittag et al., 2021; Wang et al., 2016). Esta toxicidad también está íntimamente relacionada con la capacidad de disolución de las nanopartículas en el medio dispersante en que se encuentren.

Al respecto, Mu *et al* y Senapati *et al*, reportan que la cinética de disolución afecta el potencial citotóxico de las ZnO NPs y que esta característica puede depender de la morfología, el tamaño, la aglomeración hidrodinámica, el recubrimiento de las nanopartículas y el pH de células y organelos. También puntualizan que en el medio de cultivo DMEM puede obtenerse una disolución completa de este tipo de nanopartículas (Mu et al., 2014; Senapati and Kumar, 2018).

McCracken *et al* coinciden en que la toxicidad de las ZnO NPs proviene de la liberación de iones dentro y fuera de las células pues, al aumentar su disponibilidad, estos interactúan con diversos componentes celulares cruciales para el correcto funcionamiento de las células (McCracken et al., 2016). Sin embargo, la leve citotoxicidad reflejada en las gráficas de la Figura 13 puede deberse a la internalización en forma de nanopartícula que no puede ser descartada, de acuerdo con los reportes de otros autores (Jeon et al., 2020; Liu et al., 2016; Mu et al., 2014; Senapati and Kumar, 2018).

Además, cabe señalar que, a pesar de que ambas formulaciones de las nanopartículas queladas con EDTA permiten la proliferación celular, la viabilidad de las células expuestas a las ZnO NPs en polvo aumenta en mayor medida que en las células expuestas a ZnO NPs en suspensión. Esta diferencia podría indicar que la quelación de los iones Zn^{2+} tiene un impacto mayor en la toxicidad de la formulación en polvo de las ZnO NPs.

Como otro indicador de la biocompatibilidad de las ZnO NPs, se evaluó su hemocompatibilidad. Estudios como el de Behera y Awasthi indican que las ZnO NPs son hemocompatibles aún a concentraciones mayores a los 50 $\mu\text{g/mL}$. Contrario a esto, los resultados de la Figura 15 indican que todas las concentraciones evaluadas de ambas presentaciones de ZnO NPs son hemolíticas. Mahalakshmi *et al* reportaron porcentajes similares a los de esta investigación a partir de los 25 $\mu\text{g/mL}$ y sugieren que las propiedades hemolíticas de estas nanopartículas podrían atribuirse a sus características fisicoquímicas. Asimismo, añadieron que este estudio debe realizarse tanto *in vitro* como *in vivo* antes del uso de las ZnO NPs. Sobre esto, Mittag *et al* observaron que en experimentos *in vivo* con este tipo de nanopartículas se han encontrado daños y alteraciones en los eritrocitos (Behera and Awasthi, 2021; Mahalakshmi et al., 2020; Mittag et al., 2021).

Por otra parte, debido a que la morfología celular está íntimamente relacionada con la estabilidad del citoesqueleto y la función de las células, se obtuvo evidencia cualitativa acerca de la aparente viabilidad de las células expuestas a las concentraciones mayores a 20 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs en suspensión y polvo, respectivamente. Bai *et al* también observaron los cambios morfológicos evidenciados en este trabajo en las figuras 15 y 16. En sus ensayos con ZnO NPs en la línea celular HT-29 evaluada por microscopía óptica invertida encontraron características de apoptosis como contracción de las células, formación de cuerpos apoptóticos y disminución de población celular. Sus imágenes son cualitativamente muy similares a las obtenidas en esta investigación, ambos estudios revelaron que a concentraciones crecientes de ZnO NPs las células se aprecian dañadas y con evidentes alteraciones morfológicas (Bai Aswathanarayan et al., 2017).

Entonces, si la viabilidad del cultivo parece mantenerse en todas las concentraciones y tiempos evaluados, pero la evidencia cualitativa de los cambios morfológicos sugiere lo contrario, resultan necesarios otro tipo de análisis para determinar si las células se han comprometido a la muerte celular o se encuentran arrestadas en alguna fase del ciclo celular.

En múltiples artículos de investigación se ha registrado que las ZnO NPs ocasionan un proceso de estrés oxidativo que conduce a la activación de mecanismos de apoptosis y finalmente a la muerte celular. Los resultados de este trabajo de investigación confirmaron que, en general, para los tres tiempos evaluados en ambas formulaciones de las nanopartículas existe un pequeño porcentaje de células, que aumenta con relación a la concentración, atravesando un proceso de apoptosis temprana, un fenómeno celular reversible, lo cual significa que las células podrían no estar aún comprometidas a la muerte celular. Este porcentaje es menor al 20% en todos los casos, mientras que el porcentaje de necrosis y apoptosis tardía es casi nulo.

En otras palabras, la fracción mayoritaria de la población celular no se encuentra atravesando ningún proceso de muerte celular. Esta proporción en los eventos de muerte celular dentro del cultivo es muy similar a lo reportado por Shawki *et al* en 2022, quienes también encontraron un porcentaje mayoritario de células normales al estudiar la línea HT-29 en presencia de ZnO NPs (Shawki et al., 2022). Este hallazgo podría significar que el proceso de muerte que se presenta en el cultivo celular no es ninguno de los anteriormente mencionados. Sin embargo, al relacionarlo con los resultados de los ensayos de viabilidad, se vuelve evidente que las células no atraviesan un proceso de muerte sino un evento paralizante de su proliferación y desarrollo normal: el arresto del ciclo celular.

4.3 Evaluaciones de arresto celular e internalización de las nanopartículas

A partir de los análisis de ciclo celular por citometría de flujo se encontró que las células HT-29 sufren un arresto en la fase del ciclo celular G0/G1 ocasionada por la exposición a ambas formulaciones de las ZnO NPs. La detención del ciclo se presenta desde la concentración menor hasta la concentración mayor de nanopartículas en todos los tiempos evaluados. Esta observación difiere con lo reportado en el cultivo control, donde la fase mayoritaria es G2/M, en concordancia con lo estandarizado para el ciclo de una célula sana (Pozarowski and Darzynkiewicz, 2004).

La fase G1 corresponde a un periodo en el que la célula se encuentra en crecimiento y preparación para la replicación del material genético, proceso que no llevará a cabo a no ser que reciba la señalización adecuada, proporcionada por mitógenos y factores de crecimiento, y atraviese satisfactoriamente el punto de control G1/S. Las células detenidas en esta fase pueden entrar a una etapa de reposo prolongada indefinidamente denominada G0 en la cual mantienen tasas reducidas de síntesis de proteínas y detienen por completo la proliferación celular, aunque se mantienen metabólicamente activas (Cooper, 2000).

Así, el arresto identificado desde las 24 horas explica los resultados de los ensayos de viabilidad celular. Al continuar siendo metabólicamente activas, las células aún son capaces de llevar a cabo la reducción de la resazurina, utilizada como un indicador de viabilidad, pero no cumplen el desarrollo de sus funciones con normalidad. Contrario a estas observaciones, Setyawati *et al*, Patel *et al* y Almanghadim *et al*, entre otros, han reportado que las ZnO NPs provocan el arresto del ciclo celular en la fase G2/M como consecuencia de una respuesta a las condiciones de estrés oxidativo desencadenadas por el aumento en la producción de ROS (Almanghadim *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2016b; Setyawati *et al.*, 2015).

Como seguimiento de la determinación del origen de estos efectos tóxicos ocasionados por las nanopartículas, se llevó a cabo el análisis de la internalización de las ZnO NPs comparando la complejidad de las células con un cultivo control. En general, se encontró que los cambios en la complejidad celular son mínimos debido a que, como se puntualizó en los ensayos de viabilidad celular con quelación de iones, se especula que la citotoxicidad proviene primordialmente de los iones Zn^{2+} . Sin embargo, como advierten Mu *et al*, Jeon *et al*, y Liu *et al*, no debe descartarse el impacto de los efectos de las ZnO NPs en su forma de nanopartícula (Jeon *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2016; Mu *et al.*, 2014).

Al respecto, Mittag *et al* sugieren dos factores importantes que intervienen en la internalización de las nanopartículas y que pueden estar influyendo los resultados aquí presentados. El primer factor es el

tiempo de exposición, mismo que participa en el incremento de la complejidad celular como se observó en las células HT-29 expuestas a 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs en suspensión a las 72 horas. El otro factor es la concentración de nanopartículas a la que son expuestas las células, el cual actúa en el incremento en la complejidad celular a las concentraciones mayores de ZnO NPs en polvo desde las 24 horas (Mittag et al., 2021).

En adición, el arresto del ciclo celular que se presenta desde las 24 horas podría estar asociado con la poca internalización debido a que, como indican Kim *et al* y Patel *et al*, la internalización de las nanopartículas está relacionada con la fase del ciclo que atraviesen las células. La fase en la que se presenta mayor captación de nanopartículas es G2/M seguida de S y G0/G1 (Kim et al., 2012). En los estudios de Patel *et al*, las células en fase G0/G1 mostraron una captación de ZnO NPs reducida, en comparación con células en otras fases del ciclo (Patel et al., 2016a).

4.4 Determinación de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas

Baek *et al*, Bai *et al*, Keerthana *et al*, Krol *et al*, Mittag *et al*, Mu *et al*, Shawki *et al* y Subramaniam *et al*, por mencionar algunos de entre muchos autores con resultados similares, reportan que las ZnO NPs aumentan la producción de ROS de manera dependiente de la concentración de nanopartículas lo cual provoca condiciones de estrés oxidativo con consecuentes daños a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que ocasionan alteraciones de la membrana plasmática y el material genético y finalmente derivan en apoptosis (Baek et al., 2011; Bai Aswathanarayan et al., 2017; Keerthana and Kumar, 2020; Król et al., 2017; Mittag et al., 2021; Mu et al., 2014; Shawki et al., 2022; Subramaniam et al., 2019). A raíz de estos reportes, se realizaron determinaciones cuantitativas y cualitativas de la producción de ROS en las células de colon HT-29 expuestas a ambas presentaciones de las nanopartículas de ZnO, con el propósito de evaluar si el mecanismo de citotoxicidad anteriormente mencionado es la razón de los efectos observados en los ensayos previos.

Contrario a lo esperado, de acuerdo con la revisión bibliográfica, los datos obtenidos por fluorimetría evidencian un decremento en la producción de ROS con respecto al control. En general, los niveles de ROS disminuyen conforme la concentración de ZnO NPs aumenta. Esta tendencia es igual para ambas formulaciones de ZnO NPs y se presenta en todos los tiempos evaluados. Sin embargo, la generación de especies de oxígeno reactivas aumenta de las 24 a las 72 horas, lo cual indica que la permanencia de las ZnO NPs en el cultivo es un factor que desencadena condiciones de estrés celular.

De la misma manera a lo expuesto en los ensayos de viabilidad, se realizó una comparación de los efectos de las ZnO NPs al incubarse con EDTA como agente quelante de iones divalentes. Se evaluó la generación de ROS ocasionada por la exposición de las células HT-29 a nanopartículas de ZnO queladas con EDTA. Se observa que, para ambas formulaciones de ZnO NPs, la producción de ROS a una concentración de 5 µg/mL es menor al control, pero, a partir de los 10 µg/mL la producción de ROS aumenta ligeramente en función de la concentración. La diferencia entre esta observación y la tendencia en la producción de ROS por exposición a las ZnO NPs sin EDTA, refuerza la idea de que los iones Zn^{2+} son la principal fuente de citotoxicidad de las ZnO NPs y retoma la posibilidad de que cierta proporción de la generación de ROS esté relacionada con la internalización, aunque mínima, del ZnO en su forma de nanopartícula, lo cual se encuentra ligado al aumento en la concentración, como se mencionó en el apartado 4.3 (Król et al., 2017; Mittag et al., 2021; Wang et al., 2016).

A continuación, se analizó la relación entre los resultados cuantitativos de producción de ROS, con y sin EDTA, y los porcentajes de células viables descritos en las figuras 13 y 14, respectivamente.

El comportamiento de la relación entre la producción de ROS y el porcentaje de células viables evidencia un vínculo inverso entre estas variables lo que representa otro indicio de las condiciones de estrés oxidativo que pueden estarse suscitando en el cultivo y que están relacionadas al arresto celular anteriormente registrado. En general, se observa que, en las concentraciones menores de ZnO NPs en suspensión, 5 y 10 µg/mL, durante 24 horas una cantidad mayor al control de células viables produce una cantidad menor de especies de oxígeno reactivas. De 20 µg/mL en adelante, la viabilidad se estabiliza y la producción de ROS, que va al alza conforme pasa el tiempo, es ocasionada por la misma cantidad de células, por lo cual la relación ROS/células viables va en aumento.

La misma tendencia se presenta a 48 horas, con excepción de en las concentraciones de 30 y 40 µg/mL en las cuales la producción de ROS baja posiblemente por la intervención del mecanismo antioxidante de las células. Además, debido a que en este tiempo la viabilidad es menor, la relación ROS/células viables es mayor al compararla con la presentada a 24 horas.

Conforme avanzan las horas de exposición a las nanopartículas, la relación inversa entre la viabilidad y la producción de ROS sugiere que las células atraviesan un proceso de estrés oxidativo, particularmente a las 72 horas. En esta ventana de tiempo, la viabilidad es menor y la producción de ROS es mayor, la tendencia es la misma que en los tiempos anteriores para las concentraciones de 5 a 20 µg/mL y después, para las concentraciones de 30 a 50 µg/mL la producción de ROS incrementa con respecto a los otros tiempos y se

presenta un aumento abrupto en la relación ROS/células viables que evidencia estrés oxidativo en las células.

En este escenario se repite para la formulación en polvo de las nanopartículas. Sin embargo, en este caso, la relación ROS/células viables disminuye en vez de aumentar de 24 a 48 horas. De 24 a 48 horas la viabilidad del cultivo disminuye, pero también lo hace la producción de ROS por lo que la relación entre estos factores mantiene el mismo comportamiento. A 72 horas, la viabilidad se estabiliza y la producción de ROS es más elevada que en cualquiera de los otros tiempos y, nuevamente para las concentraciones de 30 a 50 $\mu\text{g/mL}$, se presenta un aumento, aunque menos abrupto que para las ZnO NPs en suspensión, en la relación ROS/células viables que evidencia estrés oxidativo en las células.

En el caso de la relación ROS/células viables correspondiente a los ensayos con nanopartículas de ZnO, previamente tratadas con EDTA, los resultados son casi idénticos a los de la producción de ROS con EDTA, debido a que cuando las ZnO NPs son incubadas con EDTA la ausencia de iones Zn^{2+} en el medio ocasiona la persistencia en la viabilidad en todas las concentraciones.

Por otra parte, la evidencia cualitativa de producción de ROS apoya el análisis de la evidencia cuantitativa. En todas las series de imágenes correspondientes a este ensayo (Figura 29 a Figura 32) se observa que hay un punto máximo de producción de ROS, no mayor al control, a partir de los 10 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO NPs, tras el cual la fluorescencia que funge como marcaje de ROS comienza a disminuir. En este caso también puede apreciarse que la fluorescencia correspondiente a las ROS es ligeramente más intensa a las 72 horas. Además, con estas imágenes obtenidas por microscopia confocal pueden respaldarse las observaciones acerca de la pérdida total en la morfología celular relacionada con el aumento en la concentración de ambas presentaciones de ZnO NPs.

A fin de contrastar los resultados de la producción de especies reactivas de oxígeno con la respuesta del sistema antioxidante de las células y determinar si la línea celular HT-29 tiene la capacidad de contener el estrés oxidativo, se llevó a cabo el análisis de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa como un indicador del estado del sistema antioxidante de las células por la exposición a las ZnO NPs.

Gran parte de los reportes acerca de citotoxicidad de las ZnO NPs proponen que como consecuencia de las condiciones de estrés oxidativo que éstas ocasionan, se presenta una disminución de la actividad de SOD que conlleva un desbalance entre el sistema antioxidante de las células y la producción de ROS. Un

ejemplo de esto, es el trabajo de Song *et al*, quienes reportaron una disminución de la actividad de SOD inversamente proporcional al aumento en la producción de ROS (Song et al., 2014).

Se aprecia que en las células expuestas a las ZnO NPs en suspensión durante 24 horas, la actividad de SOD sube progresivamente conforme aumenta la concentración de nanopartículas. Esto indica que en este periodo la actividad de esta enzima parece contener la sobreproducción de ROS. A 48 horas, la fluctuación de la actividad de SOD concuerda con la fluctuación en la producción de ROS, mientras que a 72 horas la actividad de SOD es mayor que a 48 horas y corresponde a menos células viables. La oscilación en la actividad de SOD a través del tiempo, en relación con los porcentajes de viabilidad y producción de ROS, refleja que la actividad de esta enzima es insuficiente para contener las condiciones de estrés oxidativo.

De manera similar, el comportamiento en la actividad de SOD en las células expuestas a las ZnO NPs en polvo por 24 horas fluctúa con respecto al cambio en los niveles de producción de ROS en cada concentración. La producción de ROS ocasionada por las ZnO NPs en polvo en esta ventana de tiempo es mayor que la producción de ROS correspondiente a la formulación en suspensión, pero la actividad de SOD desencadenada por la exposición a las nanopartículas en polvo es menor. En otras palabras, si las ZnO NPs en polvo ocasionan niveles mayores de ROS que las ZnO NPs en suspensión, la diferencia entre los niveles de actividad enzimática podría indicar que, en el caso de las ZnO NPs en polvo, la actividad de SOD es insuficiente para prevenir el estrés oxidativo.

Asimismo, se observa que a 48 horas la producción de ROS se mantiene igual que a 24 horas para todas las concentraciones, pero la actividad de SOD se acrecienta también en todas las concentraciones, observación que refleja que la actividad enzimática aumenta para balancear los niveles de ROS con el sistema antioxidante de las células. De la misma forma, a 72 horas, la actividad de esta enzima incrementa en las concentraciones en las que aumenta la producción de ROS y disminuye cuando la producción de ROS se hace menor. Sin embargo, no se debe dejar de lado que, aunque este patrón sugiere que para esta formulación la enzima SOD es capaz de contener el estrés oxidativo, la viabilidad de las células es menor conforme avanza el tiempo, es decir, que una menor cantidad de células produjo el aumento de ROS reportado a las 72 horas.

Con base en estas observaciones puede puntualizarse que el sistema antioxidante de las células es capaz de balancear la producción de ROS derivada de la exposición a ambas formulaciones de ZnO NPs dentro de las primeras 48 horas, pero a las 72 horas se vuelven evidentes las condiciones de estrés oxidativo.

4.5 Propuesta de mecanismo de citotoxicidad de las ZnO NPs

Aunque el zinc es indispensable en los procesos biológicos, altas concentraciones de este ion pueden resultar fatales para las células. Se ha esclarecido que los iones Zn^{2+} son cruciales en la citotoxicidad de las ZnO NPs y que ocasionan la activación de diversos mecanismos de estrés celular (Keerthana and Kumar, 2020). Sin embargo, aún hay cierta incertidumbre alrededor de su efecto puesto que éste depende de varios criterios como el tiempo de exposición, el organismo de prueba y su acción conjunta con el ZnO en forma de nanopartícula, cuya toxicidad a su vez se ve influenciada por la morfología, tamaño, recubrimiento y la cinética de disolución que presenten en el medio dispersante (Mu et al., 2014; Peng et al., 2015).

Además del estrés oxidativo derivado de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, existen otros mecanismos activados por eventos celulares como la desestabilización lisosomal y la disfunción mitocondrial por la elevada disponibilidad de los iones Zn^{2+} (McCracken et al., 2016). De acuerdo con Liu *et al*, el retículo endoplasmático y las mitocondrias pueden secuestrar a las ZnO NPs y a los iones Zn^{2+} desencadenando disfunciones en dichos organelos, como la reducción del potencial de la membrana mitocondrial, en el caso de las mitocondrias. Además, los iones Zn^{2+} pueden invadir el núcleo celular causando genotoxicidad (Liu et al., 2016).

Con base en la bibliografía consultada en este proyecto, se propone que es probable que se presente una elevada liberación de iones Zn^{2+} al colocar las ZnO NPs en medio de cultivo DMEM, de acuerdo a las concentraciones, parámetros y resultados reportados por Mu *et al* y Senapati *et al*. (Mu et al., 2014; Senapati and Kumar, 2018). Asimismo, es posible que los iones Zn^{2+} sean transportados al interior de las células por la familia de transportadores de zinc, ZIP, o por varios canales transportadores de metales como Zrt e Irt. Adicionalmente, se especula que una fracción de las ZnO NPs pueden estar siendo internalizadas por endocitosis y que el endosoma formado por este proceso puede fusionarse con un lisosoma para formar un endolisosoma cuyo ambiente ácido favorecerá la liberación de iones Zn^{2+} dentro de las células (Liu et al., 2016; Mittag et al., 2021)

La acumulación de los iones en el interior de las células podría promover la formación de complejos Zn-biomoléculas gracias a la cual pueden presentarse alteraciones en el DNA y, posiblemente, en otras estructuras celulares importantes como la membrana plasmática (Ma and Yang, 2016). También es posible que se presente una invasión del núcleo celular que favorezca la aparición de fallas irremediables en el material genético (Liu et al., 2016). En este caso, se especula que, debido a daños en el DNA, los iones Zn^{2+}

detienen la progresión del ciclo celular en el punto de control de la fase G0/G1, mediado por el factor de transcripción p53, popularmente conocido como “el guardián del DNA”. La transición entre G0/G1 y S corresponde al punto de control en el que las células confirman que el ambiente interno y externo sea favorable para comprometerse a la replicación del DNA. Es en este punto entonces que las células censan las condiciones de estrés y la acumulación de iones dentro y fuera de la membrana plasmática y deciden no comprometerse a continuar con el ciclo. La detención en esta fase busca la reparación del material genético con el fin de evitar errores de transcripción durante la fase S. Sin embargo, el arresto prolongado del ciclo celular junto con la incapacidad de reparar los daños en el DNA, eventualmente conducirá a la muerte celular (Almanghadim et al., 2021; Cooper, 2000; Ma and Yang, 2016).

En adición, las evaluaciones de producción de especies de oxígeno reactivas y de la actividad enzimática de SOD evidenciaron que a 72 horas se presentan condiciones de estrés oxidativo, de acuerdo con el mecanismo de citotoxicidad generalmente reportado. Sin embargo, en otros estudios, como el de Patel *et al*, el arresto en el ciclo celular se presenta en la fase G2/M y es derivado de la sobreproducción de ROS que se presenta a partir de las 24 horas, contrario a lo registrado en esta investigación (Patel et al., 2016a). Se propone que esta discrepancia puede estar relacionada a que el arresto celular ocurre desde las 24 horas mientras que las condiciones de estrés oxidativo se presentan hasta las 72 horas. En otras palabras, las células detienen el ciclo celular en G0/G1 porque las condiciones tanto internas como externas no son favorables para la división, pero el sistema antioxidante logra contener el estrés oxidativo hasta las 72 horas de exposición a las nanopartículas. Acerca de este hallazgo, Abbasi-Oshaghi *et al* informan que el ion Zn^{2+} , disponible en altas cantidades, es un componente básico de SOD en eucariontes, incluyendo el humano, y contribuye al incremento de su actividad (Abbasi-Oshaghi et al., 2018).

Ahora bien, con respecto a las diferencias entre los efectos ocasionados por las ZnO NPs en suspensión y en polvo, de manera general, se aprecia que, a pesar de que los resultados de citotoxicidad son muy similares, se requiere una concentración menor de la formulación en polvo para desencadenar el mecanismo de citotoxicidad anteriormente descrito y la producción de ROS que se asocia a la exposición de las células a estas nanopartículas es mayor. Este mismo efecto ha sido previamente reportado por nuestro grupo de investigación en células de hígado AML-12 y células de riñón MDCK-1 expuestas a ambos tipos de ZnO NPs (Geraldo León, 2021; Mavil Guerrero, 2022). Se considera que esta variación en la toxicidad puede estar vinculada con las diferencias en la cinética de disolución de las nanopartículas en el medio de cultivo y con la formulación de origen de las nanopartículas, debido a que es probable que las nanopartículas que se encuentran en suspensión hayan alcanzado el equilibrio en la solución en que fueron adquiridas del proveedor y, en cambio, se presente una primera liberación de iones Zn^{2+} cuando

las ZnO NPs en polvo son hidratadas (Chung et al., 2009). Sin embargo, lo anteriormente propuesto requiere de experimentación más detallada para corroborarse.

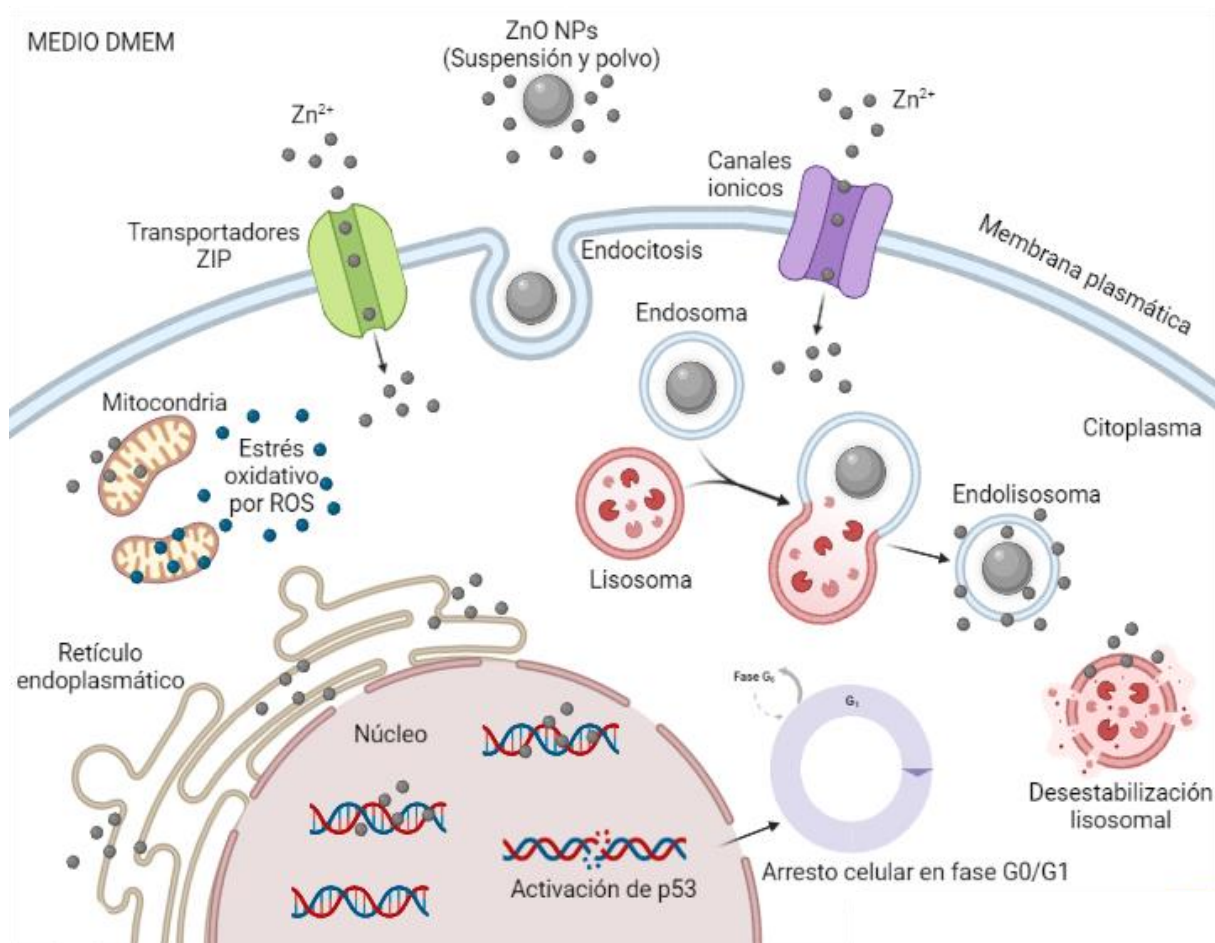


Figura 34. Mecanismo de citotoxicidad de las ZnO NPs en la línea celular de cáncer de colon, HT-29, propuesto con base en el análisis integral de todos los hallazgos de esta investigación.

Capítulo 5. Conclusiones

El tamaño promedio de las ZnO NPs en suspensión (101 nm) es mayor que el de las ZnO NPs en polvo (70 nm) y, para ambas formulaciones, existe una tendencia a la agregación que puede afectar la forma en que éstas interaccionan con las células y los otros componentes del medio de cultivo.

Es importante considerar que la evaluación de la citotoxicidad de una sustancia debe ser un análisis integral de las funciones vitales de las células y no limitarse a los ensayos de viabilidad celular. Así, a través de un análisis más detallado se determinó que ambas formulaciones de ZnO NPs son tóxicas, a pesar de que no inducen reducciones importantes de viabilidad en los ensayos de citotoxicidad ni desencadenan la activación de muerte celular por apoptosis. La toxicidad de las ZnO NPs se ve reflejada en el arresto del ciclo celular durante la fase G0/G1.

Adicionalmente, la exposición de la línea celular HT-29 a las ZnO NPs, tanto en suspensión como en polvo, ocasiona cambios morfológicos que van desde la contracción de las prolongaciones de la membrana plasmática hasta la pérdida total de la morfología celular típica. Las dos formulaciones resultan hemolíticas al ser evaluadas en eritrocitos.

La toxicidad de las dos formulaciones de ZnO NPs proviene de los iones Zn^{2+} que éstas liberan al medio de cultivo y, en menor medida, de la mínima internalización de las nanopartículas que no debe ser descartada. Para ambas presentaciones de ZnO NPs la toxicidad depende de la concentración y el tiempo de exposición.

Ambas formulaciones de ZnO NPs originan condiciones de estrés oxidativo a partir de las 72 horas. Antes de esta ventana de tiempo, la actividad de la enzima SOD parece ser capaz de mantener el balance entre el sistema antioxidante de las células y la producción de ROS. Aunque resulta menor al control en todas las concentraciones, la producción de ROS ocasionada por la formulación en polvo es mayor a todos los tiempos evaluados.

Se sugiere que la formulación de origen de las nanopartículas impacta en su toxicidad por lo que son necesarios estudios más detallados acerca de la cinética de disolución de las nanopartículas en el medio de cultivo, así como de las vías de transporte de los iones Zn^{2+} hacia el interior de las células y de los mecanismos moleculares activados por la interacción de estos iones divalentes con los componentes celulares.

Literatura citada

- Abbasi-Oshaghi, E., Mirzaei, F., and Mirzaei, A. 2018. Effects of ZnO nanoparticles on intestinal function and structure in normal/high fat diet-fed rats and Caco-2 cells. *Nanomedicine*, 13(21). doi: 10.2217/nnm-2018-0202
- Abdulhadi, A. S., Gouda, G. A., Hamed, A. M., Abu-Saied, M. A., and El-Mottaleb, M. A. 2021. Synthesis of ZnO nanopowders using polyethyleneglycol by the controlled microwave method. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences. Assiut. Assiut University, Faculty of Pharmacy*, 0. doi: 10.21608/BFSA.2021.95752.1184
- Alger, H., Momcilovic, D., Carlander, D., and Duncan, T. V. 2014. Methods to Evaluate Uptake of Engineered Nanomaterials by the Alimentary Tract. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Blackwell Publishing Inc., 13(4), 705–729. doi: 10.1111/1541-4337.12077
- Algin Yapar, E. and Inal, O. 2012. Nanomaterials and Cosmetics. *J. Fac. Pharm. Istanbul*, 42(1), 43–70. Retrieved May 12, 2021, from https://www.researchgate.net/publication/287472449_Nanomaterials_and_Cosmetics
- Almanghadim, H. G., Nourollahzadeh, Z., Khademi, N. S., Tezerjani, M. D., Sehrig, F. Z., Estelami, N., Shirvaliloo, M., Sheervalilou, R., and Sargazi, S. 2021. Application of nanoparticles in cancer therapy with an emphasis on cell cycle. *Cell Biology International*. John Wiley & Sons, Ltd, 45(10), 1989–1998. doi: 10.1002/CBIN.11658
- Baek, M., Kim, M. K., Cho, H. J., Lee, J. A., Yu, J., Chung, H. E., and Choi, S. J. 2011. Factors influencing the cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles: particle size and surface charge. *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 304(1), 012-044. doi: 10.1088/1742-6596/304/1/012044
- Bai Aswathanarayan, J., Rai Vittal, R., and Muddegowda, U. 2017. Anticancer activity of metal nanoparticles and their peptide conjugates against human colon adenorectal carcinoma cells. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1373655>. Taylor & Francis, 46(7), 1444–1451. doi: 10.1080/21691401.2017.1373655
- Behera, A. and Awasthi, S. 2021. Anticancer, Antimicrobial and Hemolytic Assessment of Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized from Lagerstroemia indica. *BioNanoScience*. Springer, 11(4), 1030–1048. doi: 10.1007/S12668-021-00889-4/FIGURES/22
- Bouwmeester, H., van der Zande, M., and Jepson, M. A. 2018. Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* (Vol. 10, Issue 1). Wiley-Blackwell. doi: 10.1002/wnan.1481
- Bulcha, B., Leta Tesfaye, J., Anatol, D., Shanmugam, R., Dwarampudi, L. P., Nagaprasad, N., Bhargavi, V. L. N., and Krishnaraj, R. 2021. Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles by Hydrothermal Methods and Spectroscopic Investigation of Ultraviolet Radiation Protective Properties. *Journal of Nanomaterials*. Hindawi Limited, 2021. doi: 10.1155/2021/8617290
- Cell Death and Apoptosis | School of Life Sciences. n.d. Retrieved June 20, 2022, from <https://www.lifesci.dundee.ac.uk/technologies/flow-cytometry-cell-sorting/techniques/cell-death-and-apoptosis>

- Chung, S. J., Leonard, J. P., Nettleship, I., Lee, J. K., Soong, Y., Martello, D. V., and Chyu, M. K. 2009. Characterization of ZnO nanoparticle suspension in water: Effectiveness of ultrasonic dispersion. *Powder Technology*. Elsevier, 194(1–2), 75–80. doi: 10.1016/J.POWTEC.2009.03.025
- Cooper, G. M. 2000. *The Eukaryotic Cell Cycle*. Sinauer Associates. Retrieved July 1, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
- García-Gallegos, J. C. 2015. Efecto de la Ingesta de Nanoestructuras en el Organismo. *Tendencias de Innovación En La Ingeniería de Alimentos*, 255–287. doi: 10.3926/oms.290
- Geraldo León, J. A. 2021. Efecto de la exposición aguda y subcrónica a nanopartículas de óxidos metálicos en el sistema antioxidante de células hepáticas.
- Ghafari, J., Moghadasi, N., and Omari Shekaftik, S. 2020. Oxidative stress induced by occupational exposure to nanomaterials: A systematic review. *Industrial Health*, 58(6), 492–502. doi: 10.2486/indhealth.2020-0073
- Ghebretatios, M., Schaly, S., and Prakash, S. 2021. Nanoparticles in the Food Industry and Their Impact on Human Gut Microbiome and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 22(4), 1942. doi: 10.3390/ijms22041942
- Huang, X. and Tang, M. 2021. Review of gut nanotoxicology in mammals: Exposure, transformation, distribution and toxicity. *Science of The Total Environment*. Elsevier B.V., 773, 145078. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145078
- Jeon, Y.-R., Yu, J., and Choi, S.-J. 2020. Fate Determination of ZnO in Commercial Foods and Human Intestinal Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 21(2), 433. doi: 10.3390/ijms21020433
- Keerthana, S. and Kumar, A. 2020. Potential risks and benefits of zinc oxide nanoparticles: a systematic review. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1726282>. Taylor & Francis, 50(1), 47–71. doi: 10.1080/10408444.2020.1726282
- Kim, J. A., Åberg, C., Salvati, A., and Dawson, K. A. 2012. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group, 7(1), 62–68. doi: 10.1038/nnano.2011.191
- Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., and Buszewski, B. 2017. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V., 249, 37–52. doi: 10.1016/j.cis.2017.07.033
- Lamas, B., Martins Breyner, N., and Houdeau, E. 2020. Impacts of foodborne inorganic nanoparticles on the gut microbiota-immune axis: Potential consequences for host health. In *Particle and Fibre Toxicology* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. doi: 10.1186/s12989-020-00349-z
- Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A., and Rothen-Rutishauser, B. 2019. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. In *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society. doi: 10.1021/acs.est.8b05512

- Liu, J., Feng, X., Wei, L., Chen, L., Song, B., and Shao, L. 2016. The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. *Critical Reviews in Toxicology*. Taylor and Francis Ltd, 46(4), 348–384. doi: 10.3109/10408444.2015.1137864
- Lowry, G. V., Hill, R. J., Harper, S., Rawle, A. F., Hendren, C. O., Klaessig, F., Nobbmann, U., Sayre, P., and Rumble, J. 2016. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*. Royal Society of Chemistry, 3(5), 953–965. doi: 10.1039/c6en00136j
- Lukas, F. and Berlin, K. 2021. A journey through the “nano” world-an analytical and toxicological challenge.
- Ma, D. D. and Yang, W. X. 2016. Engineered nanoparticles induce cell apoptosis: potential for cancer therapy. *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 7(26), 40882. doi: 10.18632/ONCOTARGET.8553
- Mahalakshmi, S., Hema, N., and Vijaya, P. P. 2020. In Vitro Biocompatibility and Antimicrobial activities of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) Prepared by Chemical and Green Synthetic Route—A Comparative Study. *BioNanoScience*. Springer, 10(1), 112–121. doi: 10.1007/S12668-019-00698-W/TABLES/2
- Marsalek, R. 2014. Particle Size and Zeta Potential of ZnO. *APCBEE Procedia*. No longer published by Elsevier, 9, 13–17. doi: 10.1016/J.APCBEE.2014.01.003
- Mavil Guerrero, E. 2022. Comparación del efecto citotóxico de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre en células del sistema excretor.
- McCracken, C., Dutta, P. K., and Waldman, W. J. 2016. Critical assessment of toxicological effects of ingested nanoparticles. *Environmental Science: Nano*. Royal Society of Chemistry, 3(2), 256–282. doi: 10.1039/C5EN00242G
- Mittag, A., Hoera, C., Kämpfe, A., Westermann, M., Kuckelkorn, J., Schneider, T., and Gleis, M. 2021. Cellular Uptake and Toxicological Effects of Differently Sized Zinc Oxide Nanoparticles in Intestinal Cells. *Toxics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 9(5), 96. doi: 10.3390/toxics9050096
- Moreno-Olivas, F., Tako, E., and Mahler, G. J. 2018. Retracted Article: ZnO nanoparticles affect intestinal function in an in vitro model. *Food & Function*. Royal Society of Chemistry, 9(3), 1475–1491. doi: 10.1039/C7FO02038D
- Mu, Q., David, C. A., Galceran, J., Rey-Castro, C., Krzemiński, Ł., Wallace, R., Bamiduro, F., Milne, S. J., Hondow, N. S., Brydson, R., Vizcay-Barrena, G., Routledge, M. N., Jeuken, L. J. C., and Brown, A. P. 2014. Systematic investigation of the physicochemical factors that contribute to the toxicity of ZnO nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*. American Chemical Society, 27(4), 558–567. doi: 10.1021/TX4004243/SUPPL_FILE/TX4004243_SI_001.PDF
- Olejnik, M., Kersting, M., Rosenkranz, N., Loza, K., Breisch, M., Rostek, A., Prymak, O., Schürmeyer, L., Westphal, G., Köller, M., Bünger, J., Eppler, M., and Sengstock, C. 2020. Cell-biological effects of zinc oxide spheres and rods from the nano- to the microscale at sub-toxic levels. *Cell Biology and Toxicology*. Springer Science and Business Media B.V., 1–21. doi: 10.1007/s10565-020-09571-z
- Patel, P., Kansara, K., Senapati, V. A., Shanker, R., Dhawan, A., and Kumar, A. 2016a. Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Mutagenesis*. Oxford University Press, 31(4), 481–490. doi: 10.1093/mutage/gew014

- Patel, P., Kansara, K., Senapati, V. A., Shanker, R., Dhawan, A., and Kumar, A. 2016b. Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Mutagenesis*. Oxford Academic, 31(4), 481–490. doi: 10.1093/MUTAGE/GEW014
- Peng, Y. H., Tso, C. ping, Tsai, Y. chun, Zhuang, C. ming, and Shih, Y. hsin. 2015. The effect of electrolytes on the aggregation kinetics of three different ZnO nanoparticles in water. *Science of The Total Environment*. Elsevier, 530–531, 183–190. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2015.05.059
- Peters, R., Kramer, E., Oomen, A. G., Herrera Rivera, Z. E., Oegema, G., Tromp, P. C., Fokkink, R., Rietveld, A., Marvin, H. J. P., Weigel, S., Peijnenburg, A. A. C. M., and Bouwmeester, H. 2012. Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive. *ACS Nano*. ACS Nano, 6(3), 2441–2451. doi: 10.1021/nn204728k
- Pica Granados, Y., Ronco, A., and Díaz Báez, M. C. 2004. Ensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer. In *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Retrieved April 13, 2020, from <https://www.idrc.ca/sites/default/files/openbooks/147-7/index.html>
- Pozarowski, P. and Darzynkiewicz, Z. 2004. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). Humana Press, 281, 301–311. doi: 10.1385/1-59259-811-0:301/FIGURES/3
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., and Hübner, H. 2017. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, 1601, 1–17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Senapati, V. A. and Kumar, A. 2018. ZnO nanoparticles dissolution, penetration and toxicity in human epidermal cells. Influence of pH. *Environmental Chemistry Letters*. Springer Verlag, 16(3), 1129–1135. doi: 10.1007/S10311-018-0736-5/FIGURES/4
- Setyawati, M. I., Tay, C. Y., and Leong, D. T. 2015. Mechanistic Investigation of the Biological Effects of SiO₂, TiO₂, and ZnO Nanoparticles on Intestinal Cells. *Small*. Wiley-VCH Verlag, 11(28), 3458–3468. doi: 10.1002/smll.201403232
- Shawki, M. M., Sadieque, A. El, Elabd, S., and Moustafa, M. E. 2022. Synergetic Effect of Tumor Treating Fields and Zinc Oxide Nanoparticles on Cell Apoptosis and Genotoxicity of Three Different Human Cancer Cell Lines. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 4384. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 27(14), 4384. doi: 10.3390/MOLECULES27144384
- Sheerar, D. 2017. Cell Cycle Analysis. *Tissue Culture*. doi: 10.1016/b978-0-12-427150-0.50104-2
- Sieg, H., Kästner, C., Krause, B., Meyer, T., Burel, A., Böhmert, L., Lichtenstein, D., Jungnickel, H., Tentschert, J., Laux, P., Braeuning, A., Estrela-Lopis, I., Gauffre, F., Fessard, V., Meijer, J., Luch, A., Thünemann, A. F., and Lampen, A. 2017. Impact of an Artificial Digestion Procedure on Aluminum-Containing Nanomaterials. *Langmuir*. American Chemical Society, 33(40), 10726–10735. doi: 10.1021/acs.langmuir.7b02729
- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W., and Tang, L. 2010. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*. Part Fibre Toxicol, 7. doi: 10.1186/1743-8977-7-22

- Sohal, I. S., O'Fallon, K. S., Gaines, P., Demokritou, P., and Bello, D. 2018. Ingested engineered nanomaterials: State of science in nanotoxicity testing and future research needs. In *Particle and Fibre Toxicology* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. doi: 10.1186/s12989-018-0265-1
- Song, Y., Guan, R., Lyu, F., Kang, T., Wu, Y., and Chen, X. 2014. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Elsevier B.V., 769, 113–118. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.08.001
- Subramaniam, V. D., Ramachndran, M., Marotta, F., Banerjee, A., Sun, X. F., and Pathak, S. 2019. Comparative study on anti-proliferative potentials of zinc oxide and aluminium oxide nanoparticles in colon cancer cells. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*. Mattioli 1885, 90(2), 241. doi: 10.23750/ABM.V90I2.6939
- Szakal, C., Tsytsikova, L., Carlander, D., and Duncan, T. V. 2014. Measurement methods for the oral uptake of engineered nanomaterials from human dietary sources: Summary and outlook. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 13, Issue 4). Blackwell Publishing Inc. doi: 10.1111/1541-4337.12080
- Tsymbalyuk, O., Davydovska, T., Lisnyak, V., Veselsky, S., Zaderko, A., Voiteshenko, I., Naumenko, A., and Skryshevsky, V. 2021. ZnO and TiO₂ Nanocolloids: State of Mechanisms that Regulating the Motility of the Gastrointestinal Tract and the Hepatobiliary System. *ACS Omega*. American Chemical Society, 6(37), 23960–23976. doi: 10.1021/ACSOMEGA.1C02981/SUPPL_FILE/AO1C02981_SI_001.PDF
- Wang, D., Lin, Z., Wang, T., Yao, Z., Qin, M., Zheng, S., and Lu, W. 2016. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 308, 328–334. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.01.066
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., and Von Goetz, N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society, 46(4), 2242–2250. doi: 10.1021/es204168d

Anexos

Preparación de medios y soluciones para cultivo celular

Medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Para preparar el medio de cultivo utilizado para la línea celular HT-29, se disolvieron 13.5 g de DMEM (Sigma Aldrich-Cat. D7777) en 1 L de agua destilada estéril. Se añadieron 1.5 g de bicarbonato de sodio, 10 mL (1% v/v) de L-Glutamina (Biowest Cat. X0550-100), 10 mL (1% v/v) de una solución de penicilina y estreptomicina (Biowest Cat. S165H-500) y 100 mL (10% v/v) de Suero Fetal Bovino. La mezcla se esterilizó mediante filtración a través de un filtro con tamaño de poro de 0.22 μm y el volumen final se distribuyó en frascos pequeños a fin de almacenarse a 4°C hasta su uso.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Para preparar la solución amortiguadora de fosfatos utilizada durante el cultivo celular, se disolvieron 8 g de NaCl [137 mM], 0.2 g de KCl [2.7 mM], 1.44 g de Na₂HPO₄ [10 mM] y 0.24 g de KH₂PO₄ [2 mM] en 1 L de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4 y la mezcla se esterilizó por autoclave, se dividió y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Medio de criopreservación

Se preparó una mezcla con 50 % (v/v) de Suero Fetal Bovino, 40 % (v/v) de DMEM suplementado y 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). La siguiente tabla será llenada por el personal que revisa el formato de tesis. Para que se pueda agendar la fecha de defensa es necesario que se cumplan con todos los puntos listados y las observaciones realizadas.