

EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO  
DE ZINC EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA



**JOVANNA VANESSA RAMOS ANGULO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA FACULTAD DE  
CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2022**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE  
ZINC EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA”**

**Trabajo de grado para optar por el título de Magister en Biología**

**JOVANNA VANESSA RAMOS ANGULO**

**Directora**

**ROSA AMALIA DUEÑAS CUELLAR, PhD**

**Co-directora:**

**VICTORIA EUGENIA NIÑO CASTAÑO, PhD**

**Asesora**

**SOFIA ISABEL FREYRE BERNAL, MsC**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA FACULTAD DE  
CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2022**

Nota de Aceptación

Aprobado

Directora Rosa Amalia Dueñas Cuellar

Rosa Amalia Dueñas Cuellar PhD

Co-Directora Victoria Niño

Victoria Eugenia Niño Castaño PhD

PAOLIN R. CÁCERES

Jurado \_\_\_\_\_

Paolin Rocio Cáceres Vélez PhD

Jorge Enrique Rodríguez Páez

Jurado \_\_\_\_\_

Jorge Enrique Rodríguez Páez PhD

Fecha de sustentación: Popayán, 19 de octubre del 2022.

**ACTA DE DEFENSA TRABAJO DE GRADO  
MAESTRIA EN BIOLOGIA**

Los jurados del Trabajo de Grado Titulado:

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE  
ZINC EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA”**

Bajo la dirección de:  
**Dra. Rosa Amalia Dueñas Cuellar**

**HACEN CONSTAR:**  
Que siendo las 9:00 am del día diecinueve (19) del mes de  
octubre de 2022, la maestrante:

**Jovanna Vanessa Ramos Angulo**  
Identificada con cédula No. 1061736551

Obtuvo el concepto de:  
NO APROBADO ( ) APROBADO (X) EXCELENTE ( ) SOBRESALIENTE CUM LAUDE ( )

Actuando como jurados:



**Dra. Paolin Rocio Cáceres Vélez**  
Jurado Externo Nacional



**Dr. Jorge Enrique Rodríguez Páez**  
Jurado Interno



**Dra. Nilza Velasco Palomino**  
Coordinadora del Programa Maestría en Biología

Para constancia, se firma en Popayán ciudad universitaria, el día diecinueve (19) del mes de  
octubre de dos mil veintidós (2022)



*Por una universidad de excelencia y solidaridad*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios, por darme la sabiduría e inteligencia para poder enfrentar los desafíos de esta nueva etapa de formación y darme las herramientas para poder culminar este proceso. A mi familia y su nueva integrante por su amor y apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.*

*A las los donantes de las muestras que participaron en este proyecto de investigación, quienes voluntariamente me brindaron su ayuda y generosidad.*

*A el Dr. Jorge Rodríguez y a su grupo de investigación CYTEMAC por compartir sus conocimientos y ser una guía constante en el desarrollo del proyecto de investigación.*

*A Gloria Ávila y Mirtha, por su valiosa colaboración, por extender sus brazos para llenarme de cariño, pero también de conocimiento para culminar exitosamente este proceso de formación.*

*A Juliana Fernández e Ingrid Reyes, por su colaboración, cariño e interés durante mi formación académica.*

*A mis directoras la Dra. Rosa Amalia Dueñas Cuellar y Victoria Eugenia Niño Castaño, por dirigir mi trabajo de grado, sus importantes aportes, dedicación y apoyo en el fortalecimiento de mi formación académica y por su gran calidad humana.*

*A mi Asesora MsC. Sofía Isabel Freyre Bernal, por ser una gran educadora, dispuesta a colaborar en cualquier momento y por darme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica para hacer de lo complejo algo fascinante.*

*A la Dra. Luz Stella Hoyos, por su gran cariño, apoyo, por su calidez como docente, sus valiosos aportes, enseñanzas y su colaboración*

*A la Universidad del Cauca y todos los profesores que con sus cariño y amplio conocimiento participaron en mi proceso de formación no solo académica y científicamente, sino que se comprometieron con mi influir en mi vida de una manera integral para asumir los crecientes desafíos en la vida.*

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
3. JUSTIFICACIÓN .....	16
4. OBJETIVOS .....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. MARCO TEÓRICO.....	20
5.1 MÉTODO DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC .....	20
5.2 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC .....	21
5.3 INGRESO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC AL ORGANISMO	22
5.4 MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD ASOCIADOS A LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC. ....	23
5.5 MECANISMO DE GENOTOXICIDAD DE LA NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC .....	25
5.6 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD .....	27
5.7 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.....	28
5.7.1 Prueba de citotoxicidad por Resazurina.....	28
5.7.2 Prueba de detección de citotoxicidad de .....	29
5.7.3 Prueba de detección de apoptosis. ....	31
5.8 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD .....	32
5.8.1 Prueba de Micronúcleos.....	33
6. ANTEDECENTES .....	33
7. METODOLOGÍA.....	38
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
7.2 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE OXIDO DE ZINC .....	38
7.3 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.....	38
7.4 AISLAMIENTO Y TRATAMIENTO DE CMSP .....	39
7.5 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD POR RESAZURINA .....	40
7.6 PRUEBA DE DETECCIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LDH .....	40
7.8 PRUEBA DE APOPTOSIS .....	41
7.9 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN CMSP .....	42

7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
8. RESULTADOS.....	44
8.1 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD .....	44
8.2 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD.....	49
9. DISCUSIÓN.....	50
10.CONCLUSIONES.....	54
11.RECOMENDACIONES.....	55
12.BIBLIOGRAFÍA.....	56

## TABLA DE FIGURAS

1. **Figura 1.** Diagrama de la obtención de las NPs-ZnO por el método Pechini.**19**
2. **Figura 2.** Gráfica sobre las estructuras cristalinas de las NPs-ZnO.....**20**
3. **Figura 3.** Efectos citotóxicos de las NPs.....**25**
4. **Figura 4.** Esquema representativo de la reducción que experimenta la resazurina en presencia de células viables.....**27**
5. **Figura 5.** Esquema representativo del principio biológico de la Prueba de Detección de Citotoxicidad de LDH.....**28**
6. **Figura 6.** Mecanismo de detección de Apoptosis por Citometría de flujo Anexina V FITC con 7AAD.....**30**
7. **Figura 7.** Prueba de citotoxicidad por Rezasurina en CMSP tratadas con NPs-ZnO.....**42**
8. **Figura 8.** Gráfica de la Concentración Citotóxica 50 (CC50).....**43**
9. **Figura 9.** Liberación de LDH de CMSP expuestas a NPs-ZnO.....**44**
10. **Figura 10.** Gráfica representativos de citometría de flujo de la cuantificación de las diferentes subpoblaciones celulares conforme a la marcación con Anexina V-FITC y 7AAD.....**45**
11. **Figura 11.** Procesos de muerte celular de CMSP expuestas a las NPs-ZnO.....**46**
12. **Figura 12.** Efecto genotóxico de CMSP tratadas con NPs-ZnO.....**47**



## RESUMEN

Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) son conocidas por una amplia gama de aplicaciones industriales y biomédicas. Sin embargo, aspectos como el efecto tóxico de estas NPs en el entorno biológico/fisiológico y sus consecuencias a corto, mediano y largo plazo, no han sido dilucidadas claramente, por tanto, se ha convertido en un problema de salud pública. En consecuencia, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto citotóxico y genotóxico ejercido por las NPs-ZnO en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), encontrando que una vez transcurridas 24 horas de tratamiento disminuye la viabilidad celular y la capacidad metabólica mitocondrial de las células expuestas a concentraciones de 250; 125 y 62,5 µg/mL, concentraciones a las cuales también se pudo identificar una alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática, evidenciado en la liberación de la enzima citoplasmática LDH en un 83%, 71% y 70% respectivamente. Así mismo, se encontró un aumento en la población de células doble positivas (Anexina +/ 7AAD +) o células apoptóticas tardías cuando las CMSP fueron tratados con concentraciones de 250; 125; 62,5; 31,2 y 15,6 µg/mL del nanomaterial. De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio el daño ejercido por las NPs sintetizadas es principalmente citotóxico, puesto que el daño genotóxico hallado no fue significativo.

**Palabras claves:** nanopartículas de Oxido de Zinc, linfocitos, citotoxicidad, genotoxicidad.

## ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles (NPs-ZnO) are known for a wide range of industrial and biomedical applications. However, aspects such as the toxic effect of these NPs on the biological/physiological environment and their consequences in the short, medium and long term have not been clearly elucidated becoming a public health concern. Therefore, this study aims to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects exerted by ZnO-NPs on peripheral blood mononuclear cells (CMSP). Results show that at 24 hours of treatment, the cell viability and mitochondrial metabolic capacity decreased. Cells exposed to 250; 125 and 62.5 µg/mL of NPs-ZnO displayed alterations in the cell membrane permeability, corroborated by the release of the cytoplasmic enzyme LDH (83%, 71%, and 70%, respectively). Similarly, an increase in the population of double positive cells (Annexin +/ 7AAD +) or late apoptotic cells was observed when PBL were exposed to 250; 125; 62.5; 31.2 and 15.6 µg/ mL of NPs-ZnO. Thus, NPs-ZnO are mainly cytotoxic, since the genotoxic damage observed was not significant.

Key Words: Zinc Oxide Nanoparticles, Lymphocytes, Cytotoxicity, Genotoxicity.

## 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología representa uno de los campos más innovadores y ambiciosos de la ciencia moderna y el desarrollo científico, lo que la convierte en uno de los pilares de la economía Global (Invernizzi et al., 2014; Keller et al., 2013). Las nanopartículas (NPs) son estructuras de materia a escala atómica y molecular, que tienen un tamaño menor o igual a 100nm, en todas las direcciones geométricas y debido a su alto valor de superficie específica exhiben una alta reactividad superficial, presentando propiedades físicas y químicas con relación al material del que provienen (Ashokkumar & Muthusamy, 2022).

Estos nanomateriales poseen características como la conductividad térmica (Toapanta-ramos et al., 2020), la respuesta óptica (Pratap & Soni, 2021), y la reactividad catalítica (Bazhukova et al., 2019); atributos asociados a su morfología, tamaño, características de superficie y estructura interna (Agarwal et al., 2017; Izak-Nau et al., 2015; Rodriguez-Hernandez et al., 2018; Sanità et al., 2020).

Estos rasgos les han permitido a los nanomateriales ser considerados compuestos revolucionarios en la industria desempeñando un papel protagónico en diferentes áreas como la medicina (Stueber et al., 2021), la odontología (Curylofo-Zotti et al., 2021), la farmacología (Yafout et al., 2021), la biotecnología (Shoeb et al., 2021), óptica (Rueda et al., 2022), catálisis (Suchomel et al., 2018), microelectrónica (Gautam et al., 2021), producción y almacenamiento de energía (Kumar et al., 2022), industria alimentaria (Geng et al., 2019), productos de cuidado personal (pastas dentales, bloqueadores solares, cosméticos) (Xin et al., 2021). Dado que el campo de la nanotecnología está siempre en búsqueda de mejorar el producto final para conseguir aplicaciones en un mayor número de áreas, se ha favorecido la ampliación de procesos de fabricación, distribución e implementación de nanomateriales, específicamente NPs (Foladori, 2016; Medina et al., 2015; Shabbir et al., 2021).

En consecuencia, entidades al cuidado de la salud a nivel mundial y nacional como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) organización encargada de realizar la Gestión de riesgos y armonizar la reglamentación de la biotecnología; la Agencia internacional del Cáncer (IARC), el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia y el Consejo Nacional Asesor de Nanociencia y Nanotecnología adscrito a la Red Colombiana de Nanociencia y Nanotecnología, están interesados en caracterizar y regular la generación de compuestos nuevos con base a las NPs, midiendo el impacto que pueden tener en la salud humana y en el ecosistema, así como la preparación de recomendaciones que sirvan de apoyo a las tareas de elaboración y adopción de definiciones,

normatividad y aspectos relacionados con la nanociencia y nanotecnología (Camacho et al., 2016; OECD, 2014).

En respuesta a lo anterior y considerando las potenciales aplicaciones de las NPs, a nivel internacional existen gran cantidad de estudios que han demostrado los efectos tóxicos de distintos tipos, tamaños y formas de NPs sobre diferentes tipos de células y organismos. Así, por ejemplo, el estudio de Wang y colaboradores (2008) encontró que el tamaño de las NPs de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  influye en la bioacumulación, demostrado en un modelo *in vivo* en ratones CD-ICR, los cuales tuvieron una mayor distribución en el cerebro de NPs de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  de menor tamaño (21 nm) comparado con las NPs de mayor tamaño (280nm), causando daño celular por estrés oxidativo en el tejido.

Por otro lado, el tipo de recubrimiento de las NPs influye en la capacidad citotóxica, como en el estudio de Lankoff y colaboradores (2013) donde probaron la actividad tóxica de NPs de  $\text{SiO}_2$  y NPs  $\text{SiO}_2$  con recubrimiento minopropilo/vinilo ( $\text{SiO}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ), ambas con tamaño de 10 a 50 nm y de forma esférica, demostrando que las NPs modificadas en la superficie fueron internalizadas por linfocitos sin causar daños citotóxicos y genotóxicos (viabilidad celular, apoptosis/necrosis, daño oxidativo del ADN, cromosoma aberraciones). Por el contrario, las NPs de  $\text{SiO}_2$  sin modificación de su superficie afectaron significativamente la proliferación de los linfocitos y progresión del ciclo celular a altas concentraciones (100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

En lo relacionado a estudios *in vitro*, de manera general se conoce que las concentraciones de uso de las NPs también influyen en la toxicidad de las mismas. Por lo tanto, la exposición a altas concentraciones, pueden alterar la conformación de los liposomas mediante la interacción electrostática y modificación de la permeabilidad, así como, la despolarización de la membrana celular (Márquez et al., 2018); Además, propician reducción en los niveles de enzimas del metabolismo e incluso incrementan, de manera importante, los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ershova et al., 2016; Setyawati et al., 2014). También, altas concentraciones de NPs causan alteraciones morfológicas de las células y apoptosis (Lankoff et al., 2013; Mittal & Pandey, 2014).

En este sentido, este estudio tuvo como propósito realizar la evaluación del efecto tóxico de las NPs-ZnO usando como sistema biológico células mononucleares de sangre periférica humana, estableciendo que en ciertas concentraciones de NPs-ZnO, se puede evidenciar una afectación en la permeabilidad de la membrana plasmática, en la disminución de la viabilidad y proliferación celular y en la inducción de apoptosis. Por último, no se encontró que estas NPs-ZnO causaran un efecto genotóxico.

Lo anterior permitió describir la posible interacción de las NPs-ZnO con células en suspensión, conocimiento que se convierte en línea de base para el análisis de la capacidad tóxica de estas NPs en otro tipo de modelos biológicos.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se estima que anualmente cerca de 390.000 toneladas de NPs de Óxido de Zinc (NPs-ZnO), uno de los nanomateriales mayormente fabricados y comercializados son liberados al medio ambiente, generando una acumulación de alrededor del 28% en suelos, 7% en cuerpos de agua y en la atmósfera aproximadamente el 1,5% (Medina et al., 2015). Estos nanomateriales son ampliamente usados en productos electrónicos, agroindustriales, cosméticos y medicamentos (Rahman, 2016; Sabir et al., 2014; Sliwinska et al., 2015), lo que ocasiona que existan varias formas de contacto con el cuerpo (vía cutánea, oral, o respiratoria), y distribución a diferentes tejidos del organismo, comportándose como una unidad en términos de transporte y funcionalidad (Foladori, 2016; Sliwinska et al., 2015; Zhou et al., 2013), aspectos que le permiten interactuar con diferentes tipos de células y ser consideradas como contaminantes y un posible problema de salud pública y ambiental (Camacho et al., 2016; Rodriguez-Hernandez et al., 2018).

La interacción de las NPs-ZnO con los sistemas biológicos es favorecida por las características fisicoquímicas que poseen, debido a su alto valor de superficie específica y alta relación átomos superficiales/átomos en el volumen, lo que les genera una alta reactividad superficial (Mohammadinejad et al., 2019), así como diferentes estructuras químicas y formas de cristalización (wurtzita, blenda), características que están determinadas por las condiciones establecidas en los procesos de síntesis, lo que puede generar variabilidad en la morfología (nanoesferas, nanobarras, rosetones o nanotubos) y el tamaño de las NPs-ZnO (Peñaloza et al., 2018; Salas et al., 2016), entre otras características.

Estos aspectos inciden en gran medida en la naturaleza bioreactiva de estos compuestos, lo que influye en una mayor interacción con las biomoléculas y estructuras celulares, que a la vez puede aumentar la posibilidad de inducción de daño citotóxico, genotóxico, inflamación y acumulación en órganos vitales (Ghosh et al., 2016; Medina et al., 2018; Mihai et al., 2015; Salianni et al., 2016). En consecuencia, no solo existe variabilidad de las NPs-ZnO de tipo experimental, dependiendo de la forma como han sido obtenidas y que diversifican sus propiedades, sino que como se ha demostrado, la variedad de las mismas puede causar daños patológicos a nivel de pulmón y el sistema cardiovascular desarrollando complicaciones como trombosis cardiovascular, arterotrombosis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar y cáncer (Medina et al., 2018; Seaton et al., 2010; Shabbir et al., 2021; S. Singh, 2019; Zeng et al., 2015)

Considerando lo mencionado, en la literatura es posible encontrar diferentes reportes relacionados con las características fisicoquímicas de las NPs y cómo algunas de ellas ejercen su toxicidad. Así, por ejemplo, el tamaño y el área de superficie de las NPs, determinan el modo de interacción de las mismas con los sistemas biológicos. Esta interacción, afecta la cinética de su distribución y acumulación en el organismo. De esta manera el tamaño de las NPs (de 1 a 100 nm) son comparables con el tamaño de los glóbulos de proteína (2 a 10 nm), el diámetro de la hélice del ADN (2 nm) y el grosor de las membranas celulares (10 nm), lo que les permite entrar en las células y organelos celulares generando toxicidad (Sukhanova et al., 2018).

Por otro lado, la toxicidad de las NPs depende en gran medida de su forma (esféricas, elipsoidales, cilíndrica, en láminas, cúbicas y barras), debido a que esta influye en la capacidad de internalización en las células, y en la capacidad de dañar físicamente la membrana celular. Por ejemplo, las NPs esféricas son más propensas a la endocitosis que los nanotubos y las nanofibras. En el caso de los nanotubos, estos tienen la capacidad de bloquear de manera más efectiva los canales de calcio (Champion & Mitragotri, 2006). De igual manera, las NPs de hidroxiapatita con diferentes formas (en forma de aguja, placa, barra y esférica) en células BEAS-2B cultivadas ha demostrado que la forma de placa y aguja causan la muerte de una mayor proporción de células que las NPs esféricas y en forma de varilla (Zhao et al., 2013).

Otro aspecto a considerar relacionado con la toxicidad de las NPs, es la composición química. Se ha demostrado que se puede producir la degradación de las NPs, lo que depende de las condiciones ambientales, por ejemplo, el pH o la fuerza iónica. Algunos iones metálicos, como Ag y Cd, son tóxicos y, por lo tanto, causan daño a las células. Otros iones metálicos, como Fe y Zn, son biológicamente útiles, pero, en altas concentraciones, podrían dañar las vías celulares y, por lo tanto, causar alta toxicidad (Soenen et al., 2015).

Otro aspecto de la composición química es la estructura cristalina, la cual influye en la toxicidad, en este sentido, se ha demostrado que las NPs con una estructura cristalina tipo rutilo (cristales de  $\text{TiO}_2$  en forma de prisma) causan daño oxidativo del ADN, peroxidación lipídica y formación de micronúcleos, lo que indica una segregación cromosómica anormal durante la mitosis, mientras que las NPs con cristales tipo anatasa (cristales octaédricos de  $\text{TiO}_2$ ) del mismo tamaño no son tóxicos. Cabe señalar que la estructura cristalina de las NPs puede variar según el entorno, por ejemplo, tras la interacción con agua, fluidos biológicos u otros medios de dispersión (Soenen et al., 2015).

Por último, la carga superficial de las NPs puede influenciar la absorción intracelular de las NPs y la capacidad de dirigirse a células específicas. Por lo

tanto, NPs cargadas positivamente entran fácilmente a las células, a diferencia de las NPs neutrales y cargadas negativamente. La comparación de los efectos citotóxicos de las NPs de poliestireno cargadas negativa y positivamente en células HeLa y NIH/3T3 ha demostrado que estas últimas NPs son más tóxicas. Esto no solo se debe a que las NPs cargadas positivamente penetran con mayor eficacia a través de la membrana, sino también a que se unen más fuertemente al ADN cargado negativamente, causando daño celular y, como resultado, la prolongación de la fase G0/G1 del ciclo celular (Hühn et al., 2013).

Una vez revisada la literatura científica existente, es posible inferir que la respuesta biológica (daño a nivel citológico o genético) del modelo objeto de estudio expuesto a las NPs-ZnO, está determinado directamente por las condiciones intrínsecas del nanomaterial, las cuales están estrechamente ligadas al método de síntesis y que define, en gran parte, sus características fisicoquímicas, además de las concentraciones analizadas.

Es así como el Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Materiales Cerámicos (CYTEMAC) de la Universidad del Cauca. Ha sintetizado NPs-ZnO esféricas por el método de Pechini, las cuales se han caracterizado biológicamente desde diferentes áreas, demostrado que las NPs-ZnO presentan actividad antifúngica (Arciniegas-Grijalba et al., 2019) y antibacteriana (Benitez-Salazar et al., 2021), sin embargo, se desconoce el potencial tóxico de estas nanopartículas en células humanas. Por lo tanto, en esta investigación se consideró pertinente responder a la pregunta ¿Pueden las nanopartículas de ZnO esféricas, obtenidas por el método Pechini, causar efectos tóxicos sobre células mononucleares de sangre periférica de humanos?

### 3. JUSTIFICACIÓN

La creciente incorporación de nanomateriales y específicamente NPs, en infinidad de productos que hacen parte de la vida cotidiana, así como su administración en los diferentes ecosistemas hace necesaria la evaluación de los posibles riesgos de las NPs sobre la salud y bienestar, de los seres vivos y el ambiente. Dado que cada NPs tiene sus características intrínsecas asociadas al tamaño, la forma, composición química (pureza, cristalinidad, propiedades eléctricas), estructura superficial (reactividad, grupos superficiales orgánicos o inorgánicos, recubrimientos), hace necesario su evaluación referente a los posibles efectos adversos que pueden tener sobre los efectos biológicos, lo que suscita inquietud sobre su amplia fabricación y usabilidad (Nel et al., 2006; Erazo et al., 2019; OECD, 2014; Scherzad et al., 2017).

En Colombia ya se están produciendo avances en investigación, transferencia tecnológica y desarrollos en nanotecnología. Sin embargo, no se han realizado tareas de construcción o adopción de una definición sobre el riesgo de uso y peligrosidad de los nanomateriales que pueda servir como soporte para definir los lineamientos que permitan elaborar una legislación sobre el uso seguro de estos nanomateriales. En respuesta a esta necesidad no solo nacional sino internacional, la caracterización de diversas NPs, el Grupo de investigación CYTEMAC de la Universidad del Cauca (Colombia), ha venido trabajando en la síntesis y caracterización fisicoquímica de NPs (Ávila et al., 2004; López & Rodríguez-Páez, 2017).

Adicionalmente, recientemente reportó la actividad de las NPs-ZnO sintetizadas por diferentes métodos en su laboratorio, entre ellos el método de Pechini, (técnica de vía húmeda, que permite obtener óxidos de interés industrial, redistribuyendo uniformemente los cationes a nivel atómico a través de la estructura polimérica a bajas temperaturas (Mosquera et al., 2008; Puente-Urbina et al., 2012)), sobre distintos modelos biológicos experimentales (Arciniegas-Grijalba et al., 2019; Benitez-Salazar et al., 2021; Erazo et al., 2019; Medina et al., 2018; Mosquera-Sánchez et al., 2020).

Hasta el momento, estas NPs de forma esferoidal con un tamaño de ~40 nm han sido evaluadas en *Colletotrichum sp.*, un hongo del Café, que ocasiona la necrosis de tallos, ramas y frutos, donde se observó un efecto nanofungicida (Arciniegas-Grijalba et al., 2019). De igual manera fue evaluada en bacterias como *Escherichia coli*, encontrándose una eficiente actividad antimicrobiana (Benitez-Salazar et al., 2021). Por lo tanto, considerando los potenciales usos de las NPs-ZnO, es muy probable que las mismas entren en contacto con diversos sistemas biológicos, en consecuencia, es necesario conocer su potencial tóxico para poder establecer o brindar lineamientos para su uso.



En este sentido, estudios como el presente que tienen como objetivo describir y cuantificar el daño celular generado en la mitocondria, membrana celular y núcleo celular, por exposición a las NPs-ZnO, son de gran relevancia puesto que no solo abordan una potencial problemática nacional (Camacho et al., 2016; Rodriguez-Hernandez et al., 2018), sino que están en concordancia con los objetivos planteados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) organización encargada de realizar la Gestión de riesgos; Armonización de la reglamentación de la biotecnología; Inocuidad de nuevos alimentos y accidentes químicos; aspectos claves en la caracterización y control del uso de los nanomateriales, como una estrategia para el desarrollo de nuevas alternativas biotecnológicas.

El uso de CMSP en la determinación del efecto de las NPs-ZnO, confiere una fortaleza al desarrollo del estudio, esto debido a que son células fáciles de obtener y útiles para evaluar los efectos de agentes químicos, físicos o biológicos sobre moléculas blanco como el ADN y proteínas, mediante la cuantificación *in vitro* del daño citotóxico o genotóxico (Nersesyan et al., 2016). La respuesta biológica de las CMSP expuestas a las NPs, se evaluó teniendo en cuenta el principio biológico de pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad implementadas en el estudio; utilizando esta metodología se analizaron organelos celulares claves que permitieran inferir cuales eran los efectos tóxicos generados por las NPs-ZnO en este tipo de células.

Fue por ello que se estableció como prioridad evaluar la integridad de la membrana celular, mediante la liberación de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH), puesto a que se ha demostrado que esta prueba sirve como indicador de la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, así como, el proceso de inestabilidad celular temprano capaz de inducir una cascada enzimática que puede terminar en muerte celular (Fu et al., 2017; Shah et al., 2014). De igual manera, se determinó la capacidad metabólica celular mediante el estudio de la mitocondria con la implementación de la prueba de Rezasurina con el uso del kit de Alamar Blue, la cual está contemplada como una alternativa para estudiar la afectación de la viabilidad celular e indicar el desarrollo de eventos tempranos de muerte celular inducidos por daño mitocondrial (Yao et al., 2012).

Adicionalmente, la inducción de muerte celular por las NPs-ZnO sobre CMSP humanos, mediante la marcación con Anexina V FITC y 7AA D, que permite evaluar apoptosis y necrosis por Citometría de flujo (Zembruski et al., 2012). Finalmente, este estudio abordó la identificación del daño genotóxico mediante la evaluación de la frecuencia de Micronúcleos (MN), debido a que es considerado un biomarcador sensible, validado como predictor del riesgo a desarrollar cáncer entre otras enfermedades por exposición a agentes tóxicos en CMSP (Bonassi et al., 2011; Kirsch-Volders et al., 2018; Torres-Bugarín et al., 2015).

En consideración a lo anterior, la implementación de varias pruebas de citotoxicidad y la medición del daño genotóxico, permitió el análisis y comprensión del efecto biológico de las NPs-ZnO de forma esférica, sintetizadas por el método Pechini sobre CMSP tratadas. Esto permitió determinar las concentraciones a las cuales estas NPs presentaban una actividad tóxica apreciable sobre células humanas. En consecuencia, este estudio abordó pertinentemente una problemática actual, generando conocimiento de base para la caracterización biológica de las NPs-ZnO objeto de estudio, permitiendo la determinación de las concentraciones a las cuales estas NPs alteran la función biológica normal de las células expuestas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de Nanopartículas de Óxido de Zinc en células mononucleares de sangre periférica.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analizar la citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica tratados con nanopartículas de Óxido de Zinc.

Describir procesos de muerte en células mononucleares de sangre periférica tratados con nanopartículas de Óxido de Zinc.

Cuantificar el efecto genotóxico en células mononucleares periférica tratados con nanopartículas de Óxido de Zinc.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 MÉTODO DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC

Durante la última década, se han desarrollado nuevas rutas de síntesis de NPs que permiten el control preciso de la morfología y el tamaño de las mismas (Guerrero et al., 2013; Salas et al., 2016). Estos procesos pueden realizarse utilizando diferentes medios: líquido (método húmedo), sólido, o gaseoso, debido a ventajas como bajo costo, mayor seguridad y mecanismos ecológicamente amigables, sin embargo, varias de las rutas que involucran reacciones químicas complejas, contaminantes y son las más utilizadas en la síntesis de nanomateriales.

Dentro de los métodos de síntesis por ruta química utilizados para la producción de NPs-ZnO se encuentra el método de Pechini, también conocido como método complejo polimérico, el cual permite obtener nanopartículas de óxidos metálicos de una forma simple y controlada, con características fisicoquímicas únicas, a partir de reacciones de poliesterificación de complejos metálicos ácidos (Doria et al., 2011).

Los quelatos que se forman al interior del sistema, por las reacciones entre el precursor del catión, el ácido cítrico y el polialcohol, al ser calentados en presencia de un alcohol polihidroxílico (etilenglicol) producen una reacción de poliesterificación la cual favorece una distribución más uniforme de los cationes a nivel atómico, generando un polímero en forma de resina homogénea.

Los parámetros de síntesis más relevantes en este proceso son: la relación molar precursor/agente, quelante/solvente, temperatura y tiempo de reacción, pH y velocidad de agitación (Guerrero et al., 2013). Finalmente, la descomposición de la resina, para la obtención del polvo cerámico, requiere de la eliminación por calentamiento de una gran cantidad de materia orgánica (Mosquera et al., 2014).



**Figura 1.** Diagrama de la obtención de las NPs-ZnO por el método Pechini. En el método precursor polimérico o método Pechini se emplean las propiedades que presentan ciertos ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos, para formar quelatos con diversos cationes. Los precursores de estos cationes pueden ser de cloruros, carbonatos, hidróxido, nitratos o acetato. Cuando se mezclan los quelatos con un polihidroxiálcohol, como el etilenglicol y se calienta el sistema, estos se poliesterifican formando una resina. La descomposición de la resina, para la obtención del polvo cerámico, requiere de la eliminación por calentamiento de una gran cantidad de materia. Las NPs sintetizadas se caracterizaron fisicoquímicamente mediante el análisis de DTA/TGA, espectroscopia infrarrojo (IR), difracción de rayos X (XRD), espectroscopia raman y microscopía electrónica de barrido. Tomado y modificado de (Benitez-Salazar et al., 2021).

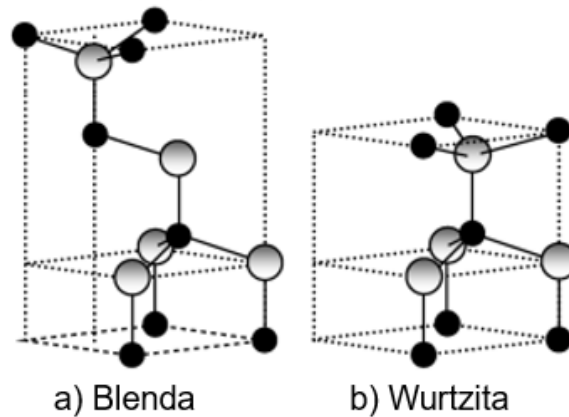
## 5.2 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC

Las NPs-ZnO sintetizadas por el método de Pechini, presentan una estructura tipo wurtzita, asociada a un sistema cristalino hexagonal y normalmente con una forma esférica, aunque también pueden tener una forma tubular, elipsoidal y de nanocápsula, con un tamaño que oscila entre 20-60nm. Al tener un tamaño tan pequeño, estas presentan mayor superficie específica y por ello una gran cantidad de centros activos lo que las hace más reactivas (Eastlake et al., 2016; Madelein et al., 2018; Sapsford et al., 2013). Adicionalmente, las NPs-ZnO por tener una naturaleza de semiconductor tipo n, tiene la facultad de interactuar eléctricamente con la membrana de células y proteínas, permitiendo que estas ejerzan efecto tóxico sobre las células (Patiño-Portela et al., 2021).

Estas NPs han sido usadas, principalmente, como aditivos de dispersión de luz ultravioleta en cosméticos, como protectores solares, productos desinfectantes, cremas dentales y como rellenos en materiales o dispositivos médicos (Cioffi & Rai, 2012; Serpone et al., 2007). Características como durabilidad, alta selectividad y biocompatibilidad (Salas et al., 2016), han permitido que sean usadas en la fabricación de caucho, producción de celdas solares, pantallas LCD, pigmentos (como blanqueador), fibras químicas, productos electrónicos y textiles (Song et al., 2010).

Por otro lado, las NPs-ZnO, han generado gran interés considerando el desarrollo de nuevos enfoques para el suministro de medicamentos o como nanoplataformas

multifuncionales para “bombardear” células malignas desde el medio extracelular a través de la liberación de ROS (Ostrovsky et al., 2009).



**Figura 2.** Gráfica sobre las estructuras cristalinas de las NPs-ZnO. a) Blenda de zinc cúbica y b) wurtzita hexagonal. Esferas grises y negras sombreadas representan átomos de Zn y O, respectivamente.

### 5.3 INGRESO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC AL ORGANISMO

Las NPs-ZnO pueden ingresar al organismo, principalmente, por contacto dérmico, inhalación e ingestión (Iavicoli et al., 2017). En un entorno laboral, la exposición humana puede ocurrir en cualquier momento incluida la síntesis, fabricación, utilización y eliminación de las nanopartículas. Dado el tamaño de las NPs-ZnO y su capacidad para ingresar rápidamente al organismo es posible encontrar varios mecanismos de ingreso directo a las células; entre ellos el ingreso en forma de ion libre de  $Zn^{2+}$  y en como nanopartícula (S. Singh, 2019).

Existen numerosas investigaciones que demuestran que las NPs-ZnO ingresan a las células en forma de ion libre de  $Zn^{2+}$ , debido a que en el medio extracelular las NPs-ZnO se pueden disolver y disociar. Posteriormente, los iones de  $Zn^{2+}$  pueden ser absorbidos por la célula a través de transporte pasivo sobre la membrana plasmática, un paso crítico en el desarrollo de toxicidad celular (Deng et al., 2009; Mihai et al., 2015; Wang et al., 2017).

Factores como el pH actúan como un condicionador esencial en la disolución y disociación de las NPs-ZnO en iones  $Zn^{2+}$  en el medio intracelular, lo que aumenta la concentración y favorece la absorción y la toxicidad de las NPs en las células expuestas (Müller et al., 2010; Osmond & McCall, 2010). La liberación de iones  $Zn^{2+}$  por parte de las NPs-ZnO es influenciada por unos parámetros fundamentales los cuales son: a) La porosidad, concentración, tamaño y

morfología de la partícula b) el pH intracelular c) presencia de rayos UV, d) tiempo de exposición, e) presencia de diferentes componentes como proteínas, organelos celulares etc., f) fuerza iónica del medio (Pasquet et al., 2014; S. Singh, 2019).

El ingreso de NPs de más de 500nm, a la célula está limitada debido a que estas son interceptadas por fagocitos (monocitos, macrófagos y neutrófilos), células inmunitarias que puede destruir microorganismos, ingerir material extraño y eliminar células muertas. No obstante, las NPs con un tamaño menor 100nm pueden ingresar células, por medio de un proceso celular llamado endocitosis, el cual consiste en la incorporación de moléculas grandes o pequeñas al interior de la célula por medio de una vesícula de membrana, con la finalidad de regular la interacción de las células con agentes extraños que puedan alterar la composición de los lípidos y proteínas de la membrana plasmática (Deng et al., 2009; Liu et al., 2017; Mihai et al., 2015).

Por último, la vesícula formada es fusionada al lisosoma donde se procede a la degradación de la NPs. Sin embargo, el pH ácido al interior del lisosoma acelera la producción de iones libres de  $Zn^{2+}$ , los cuales son liberados y establecen una vía esencial de toxicidad representada como "Impacto del caballo de Troya mejorado con lisosoma" (Li et al., 2011; Sabella et al., 2014).

La endocitosis de NPs-ZnO es un proceso de transporte dinámico que incluye varias rutas, entre ellas el ingreso de las NPs-ZnO por endocitosis mediada por un receptor, donde el receptor de membrana es una lipoproteína de baja densidad (LDL), que de manera selectiva y orientado por el tamaño, la forma, y la afinidad con las NPs, permite el ingreso de estos nanomateriales al medio. Otro mecanismo de ingreso de las NPs es una vía endocítica, dependiente de clatrina e independiente de caveola, y que resulta definida por el tamaño de las NPs en la encapsulación y el transporte de las mismas (Singh et al., 2009).

La aglomeración de las NPs también es un factor que determina el ingreso de los mismos a la célula expuesta. En esta condición también es posible el ingreso de las NPs a través de un medio del transporte pasivo, el cual depende de la permeabilidad de la membrana celular y, por lo tanto, de la organización y las características de los lípidos y proteínas de la membrana (Condello et al., 2016; Scherzad et al., 2017).

#### **5.4 MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD ASOCIADOS A LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC.**

En diversos estudios se ha mostrado que las NPs- ZnO una vez ingresan al organismo tienen diferentes formas de interactuar con las células expuestas causando daños mecánicos que han propiciado cambios en la morfología celular,

distorsión de las membranas, complicación o derrame de estructuras intracelulares (Babele et al., 2018; Li et al., 2011; Zhang et al., 2016), así como la generación de daño mitocondrial (Kao et al., 2012) y salida del contenido celular (Peng et al., 2011).

Así mismo existen estudios que revelan que en algunas células expuestas a las NPs-ZnO, se ha presentado un aumento y acumulación citosólica de la concentración de  $Zn^{+2}$ , evento que favoreció el aumento de estos iones en la mitocondria generando la despolarización de la membrana mitocondrial, activando la vía intrínseca de la apoptosis. De igual manera, se ha registrado que la exposición a estas NPs puede generar cambios en la disposición de los lípidos y las proteínas de la membrana celular, lo que podría favorecer el ingreso de las NPs-ZnO a la célula y su interacción con los diferentes organelos celulares, dentro de los cuales es posible identificar la mitocondria.

Considerando que la muerte celular programada va acompañada de la interrupción de funciones metabólicas, el deterioro de la señalización mitocondrial se encuentra estrechamente conectado con los procesos de desarrollo y la homeostasis tisular (Elmore, 2007; Sharma et al., 2012). Sin embargo, la amplia gama de funciones mitocondriales en las células se centra en un número relativamente pequeño de proteínas en la mitocondria, algunas de las cuales ejercen funciones tanto metabólicas como promueve que se discutirán en las siguientes secciones (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017).

Las NPs-ZnO podrían ejercer su actividad tóxica en células expuestas mediante la activación, principalmente, de la vía intrínseca de apoptosis. Los factores que dan lugar a la iniciación de la vía intrínseca o mitocondrial corresponden a estímulos internos, tales como el daño genético irreparable, la hipoxia, altas concentraciones de calcio citosólico y el estrés oxidativo, lo cual incide directamente en la alteración de la permeabilidad e interrupción del potencial transmembrana mitocondrial. Esta acción daría lugar a la liberación de moléculas pro-apoptóticas, tales como el Citocromo-C (presente en la membrana mitocondrial), hacia el citoplasma, lo que activa la cascada de Caspasas, este paso es determinante en la despolarización de membrana mitocondrial en células tratadas con NPs-ZnO (Babele et al., 2018; Sharma et al., 2012).

La actividad catalítica de las caspasas aceleran el deterioro celular y es responsable de muchos de los cambios morfológicos y bioquímicos que experimentan las células en el proceso de apoptosis, en el que se incluye la fragmentación del ADN (Nagata, 2005), la exposición de la Fosfatidilserina y la formación de cuerpos apoptóticos (Sebbagh et al., 2001). La caspasa 3 favorece la fragmentación del ADN al catalizar la inactivación proteolítica de la subunidad alfa del factor de fragmentación del ADN (ICAD), como una consecuencia de la



puesta en marcha de la vía intrínseca de la apoptosis. Existe evidencia experimental reciente que demuestra que la CASP3 promueve la exposición de la Fosfatidiserina activando proteínas implicadas en la externalización de esta estructura celular (Suzuki et al., 2014).

La apoptosis inducida por NPs-ZnO activa las vías MAPK debido al aumento de ROS causadas por el ingreso de la NPs al interior de la célula. Esta vía de señalización dependiente de la Proteinkinasa, proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), es una ruta altamente conservada que constituye una cascada molecular importante en la regulación de varias actividades importantes como la funcionalidad, diferenciación, proliferación y migración celular. Su activación transmite señales desde distintos tipos de receptores de membrana hasta activar factores de transcripción nuclear (Zafon & Obiols, 2009).

Una pequeña proteína de unión a Guanosintrifosfato (GTP), denominada RAS, es la molécula que actúa como transductor inicial y común de la señal iniciada tras la activación de los receptores de membrana. RAS se comporta como un interruptor bimodal, con dos estados conformacionales, uno activo y otro inactivo. La conformación activa produce la activación de la MAP-cinasa-cinasa-cinasa, conocida también como RAF. A su vez, RAF activa, mediante fosforilación, la MAP-cinasa-cinasa o MEK. Finalmente, MEK activa la MAP-cinasa o ERK. Por lo tanto, la estructura básica de MAPK está formada por un módulo de tres cinasas (RAF, MEK y ERK) dependiente de la proteinkinasa que se activan de manera secuencial. Mientras que RAF y MEK son de localización citoplásmica, ERK tiene la capacidad de trasladarse al núcleo, y ahí puede fosforilar directamente un gran número de factores de transcripción como C-JUN o C-MYC.

Se ha encontrado que las NPs-ZnO ejercen su actividad tóxica en sistemas biológicos principalmente mediante la generación de iones libres de  $Zn^{2+}$  y el daño mecánico causado directamente por las NPs a las células, eventos relacionados con la producción de ROS y con el aumento del estrés oxidativo (Singh, 2019). El incremento de iones libres de  $Zn^{2+}$ , podría ocasionar daño mitocondrial y alteración de la homeostasis celular del zinc, provocando daño celular. La presencia de estos iones en el entorno celular demuestra un gran obstáculo del transporte dinámico de membrana, y causa daño al ADN e interrupción de la actividad catalítica celular, evento importante en la nanotoxicidad de las NPs -ZnO (Li et al., 2011; Song et al., 2010).

## **5.5 MECANISMO DE GENOTOXICIDAD DE LA NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC**

Las NPs -ZnO que entran a la célula pueden atravesar los poros de la membrana nuclear e interactuar directamente con el ADN organizado en la cromatina o con

los cromosomas dependiendo de la fase del ciclo celular. En la interfase, las NPs pueden unirse a proteínas encargadas del proceso de replicación del ADN y la transcripción del ADN en ARN (Magdolenova et al., 2014). Estudios sugieren que, durante la mitosis, las NPs interactúan con los cromosomas provocando efectos clastogénicos o aneugénicos generando roturas en los mismos.

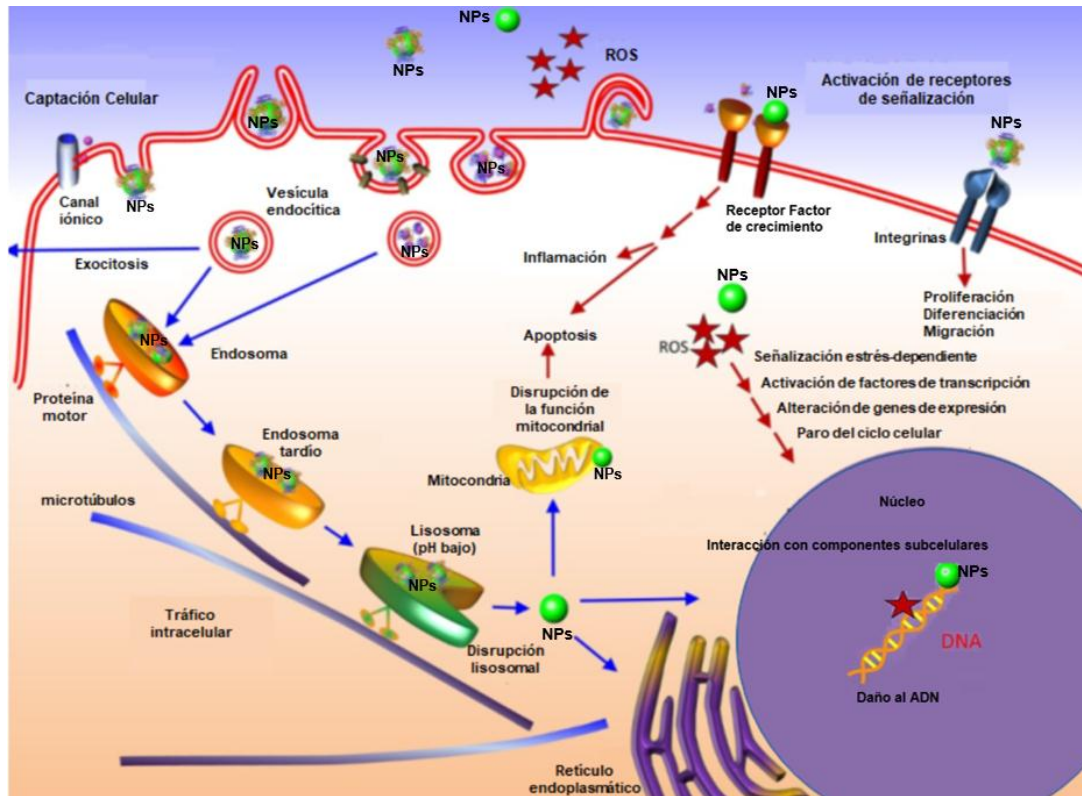
Otro efecto aneugénico, causado por estos compuestos, es la alteración del huso mitótico, centriolos o sus proteínas asociadas (Aula et al., 2014; Efthimiou et al., 2020; Gümüs et al., 2014). El daño del Huso mitótico, provoca la pérdida o ganancia de cromosomas y/o fragmentos de cromosomas en células hijas (Huang et al., 2009). Las NPs podrían interferir con componentes celulares como las mitocondrias y causar daños que afecten a sus funciones, tales como la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial e interrupción de la síntesis de Adenosin trifosfato (ATP) (Asharani et al., 2009; Hudecová et al., 2012).

Las NPs-ZnO pueden generar ROS en las células lo que podría ocasionar daño oxidativo indirecto al ADN a través de los radicales libres generados por la disolución y disociación del nanomaterial en su ingreso al organismo (Singh, 2019). Las ROS puede atacar el ADN causando lesiones o modificación (oxidación) de bases nitrogenadas, dando lugar al aumento de mutaciones por apareamiento incorrecto en la replicación, roturas de cadena sencilla o doble, aductos de ADN voluminosos, enlaces cruzados o cambios estructurales del ADN (Magdolenova et al., 2014). Una vez se supera el límite de protección antioxidante de la célula, se genera una creación de citoquinas incendiarias que provocan inflamación (Khanna et al., 2015). Esta inflamación ocasiona una perturbación mitocondrial (Lai et al., 2015) debido al daño en la membrana, a los componentes celulares al ADN y al incremento de LDH proveniente de los procesos de necrosis o apoptosis (Ghosh et al., 2016).

En la Figura 3 se resumen las diferentes formas de interacción que presentan las NPs con los sistemas biológicos donde se observa que las NPs, una vez entran en contacto con la célula desencadenan una serie de eventos como el aumento de la producción de ROS, la cual conduce a la activación de las vías de señalización celular dependientes del estrés, el daño directo de los orgánulos celulares como mitocondrias e incluso puede generar la fragmentación del ADN en el núcleo, evento que resulta en la detención del ciclo celular, desarrollo de la respuesta inflamatoria y apoptosis.

De igual manera, es posible observar que las NPs pueden interactuar con receptores celulares unidos a la membrana, por ejemplo, receptores del factor de crecimiento e integrinas, que inducen la proliferación, apoptosis, diferenciación y migración. Después del ingreso de las NPs a través de vías endocíticas, estas se

transportan a lo largo de la red endolisosomal dentro de vesículas con la ayuda de proteínas motoras y estructuras del citoesqueleto. Para acceder a estructuras específicas en el citoplasma o núcleo celular.



**Figura 3.** Efectos citotóxicos de las NPs. La figura representa de manera resumida las posibles interacciones de las NPs-ZnO con diferentes tipos de células. Tomado y modificado de Shang y colaboradores 2014.

## 5.6 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

La selección de modelos celulares apropiados para la detección de agentes tóxicos *in vitro*, es importante, puesto que permite explorar la posibilidad de extrapolar los resultados a poblaciones humanas. Las células humanas tienen una alta relevancia clínica (Dusinska et al., 2017) y en particular las células de la sangre proporcionan información sobre la respuesta general del cuerpo a, por ejemplo, nanomateriales, contaminantes industriales o ambientales (Dusinska & Collins, 2008).

Una de las ventajas de usar células sanguíneas humanas como modelo experimental en pruebas *in vitro*, radica en su fácil acceso y evaluación, características que comparada con líneas celulares continuas, tienen una respuesta cualitativamente diferente y semejante a la respuesta del organismo *in vivo* (Oostingh et al., 2011). En consecuencia, hay pruebas clínicas y preclínicas sólidas de que los linfocitos son células clave en el desarrollo de alternativas biomédicas, como la inmunoterapia, para el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Lambin et al., 2020).

## **5.7 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD**

Los métodos de análisis de toxicidad y viabilidad celular son utilizados como una medida para detectar los mecanismos celulares resultantes de la interacción de agentes tóxicos con la célula. Los métodos más comunes se basan en la absorción o exclusión de colorantes como el azul de tripan o la eosina, sin embargo, estos métodos tienen varias desventajas, como la dificultad para procesar grandes cantidades de muestras, y deficiencia en la cuantificación y diferenciación entre las células apoptóticas de las células necróticas.

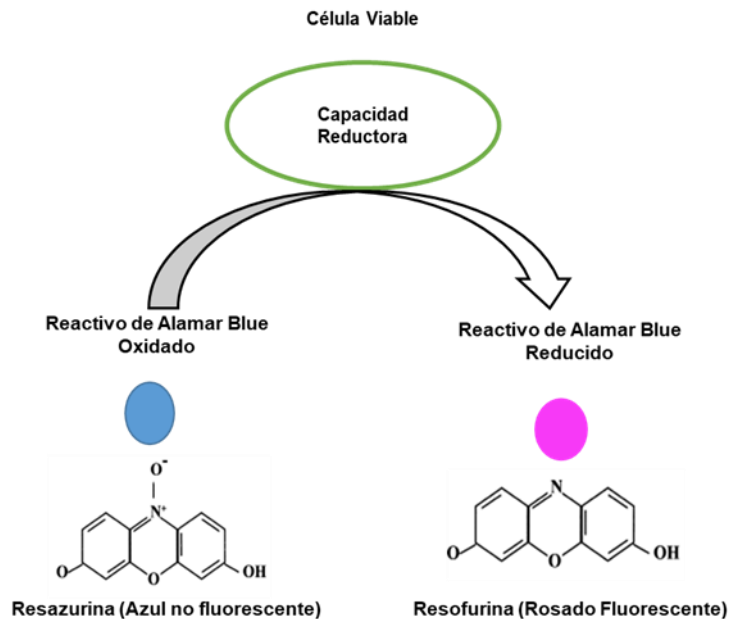
En respuesta a las exigentes necesidades de investigación en esta temática se han desarrollado varios métodos sensibles y confiables entre los que se destacan los ensayos de citotoxicidad de LDH, Prueba de Rezasurina o la evaluación de apoptosis por Anexina V con 7AAD, los cuales son considerados ensayos prácticos, universalmente validados y accesibles tecnológicamente.

**5.7.1 Prueba de citotoxicidad por Resazurina.** La prueba de Resazurina con el reactivo de Alamar Blue, ha sido uno de los bioensayos más usados en estudios de viabilidad celular y citotoxicidad, debido que permite monitorear la integridad de las células (O'Brien et al., 2000), evaluar la función y control del ciclo celular (Yao et al., 2012), y medir la respuesta biológica expresada en diferentes tipos de células por exposición a agentes tóxicos. La Resazurina es un compuesto soluble en agua, estable en medio de cultivo, no tóxico, permeable a las membranas celulares, de color azul no fluorescente, altamente dicromático basado en el índice de Dicromaticidad de Kreft (Kreft & Kreft, 2009).

La Resazurina actúa como un aceptor de electrones intermedio en la cadena de flujo de electrones de la mitocondria, sin generar interferencia en el flujo normal de electrones. Adicionalmente, puede ser reducida tanto por Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato (NADPH), Flavina Adenina Dinucleótido (FADH), Flavín Mononucleótido (FMNH), Nicotin Adenin dinucleótido (NADH), como por los citocromos.

Por tanto, el colorante funciona como un indicador de aceptación de electrones de manera que es posible observar un cambio de estado oxidado, azul no fluorescente a estado reducido, rosado fluorescente (Page et al., 1993). Además de las reductasas mitocondriales hay otras enzimas como las Diasforasas, Dihidrolipoamina, Deshidrogenasa, Quinona Oxidoreductasa (Belinsky & Jaiswal, 1993) y la Flavin Reductasa las cuales se encuentran en el citoplasma y que pueden reducir la Resazurina, sin embargo, sólo la mitocondria tiene la capacidad de metabolizar el reactivo.

La metabolización o reducción de la Resazurina se interpreta como la presencia de células viables, sin ningún tipo de alteración del metabolismo celular (Trudeau et al., 2005). Tal como lo indica la figura 3, en condiciones normales la célula tiene la capacidad de llevar a cabo una reacción de óxido-reducción para convertir la Resazurina a Resofurina como indicador de la actividad metabólica normal de las células.



**Figura 4.** Esquema representativo de la reducción que experimenta la resazurina en presencia de células viables. Los cambios de estado oxidado a estado reducido pueden ser medidos flexiblemente de manera cuantitativa, colorimétrica y/o con lecturas fluorimétricas, o cualitativas indicando un cambio de color visible en términos de presencia o ausencia de viabilidad celular. Tomado y modificado del manual del reactivo para Ensayo de Viabilidad Alamar Blue™, Thermo Scientific

**5.7.2 Prueba de detección de citotoxicidad de Lactato Deshidrogenasa.** La determinación de la actividad de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa tiene gran variedad de aplicaciones, entre ellas la identificación de procesos de daño celular en un medio de cultivo tras la interacción de las células con un agente

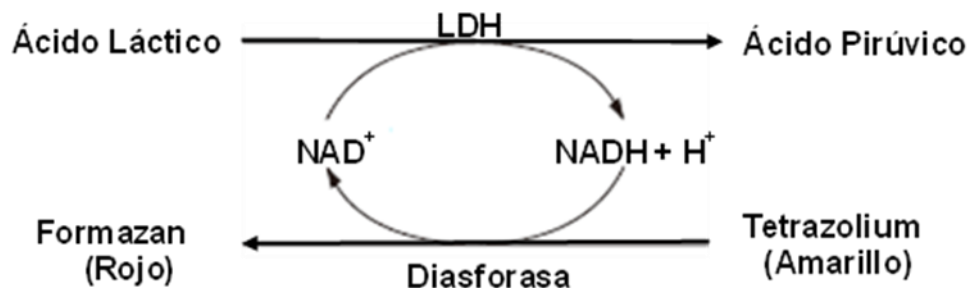
tóxico de tipo químico, físico o biológico. La actividad de la LDH, es utilizada como un indicador de la integridad de la membrana celular y como una medida sensible de medición de la citotoxicidad celular (Fu et al., 2017).

La Prueba de detección de Citotoxicidad de LDH es una reacción enzimática la cual permite obtener información sobre la integridad y el funcionamiento de las mitocondrias como una unidad funcional clave en el proceso de generación de energía celular. En condiciones normales, las mitocondrias metabolizan una molécula de glucosa hasta 32 unidades de ATP; sin embargo, si las condiciones mitocondriales son alteradas o hay baja presencia de oxígeno, la célula omite el metabolismo mitocondrial y lleva a cabo la transformación de piruvato a lactato en el citoplasma celular por acción de la enzima LDH y obtiene 2 unidades de ATP.

Por lo tanto, si un agente tóxico altera la capacidad metabólica mitocondrial de la célula, la ruta bioquímica dominante es la catalizada por la enzima LDH y se incrementa su concentración citoplasmática; este comportamiento es un indicador de muerte celular ya que LDH al ser soluble se libera al medio extracelular a través de la membrana celular dañada (Shah et al., 2014).

El Kit de detección de LDH, proporciona en sus reactivos, las moléculas necesarias para llevar a cabo una reacción química inversa. Es así como, al adicionar Ácido Láctico al cultivo de células expuestas a algún agente agresor, donde ha ocurrido liberación de LDH, las moléculas de  $\text{NAD}^+$  pasan de un estado reducido a oxidado  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , en presencia del colorante Tretazolium, quien su vez es catalizado por la enzima Diasforasa.

En este proceso ocurre la transformación de Ácido Láctico a Piruvato, dejando como testigo de la reacción química, el viraje de color amarillo (Tretazolium) a un color rojo, producto de la generación del Formazan (Figura 4). Dicho cambio es la evidencia del mecanismo de acción de cualquier agente que entre en contacto con la célula causando alteración de la permeabilidad de la membrana, falta de oxígeno, fallas en el metabolismo mitocondrial o daños en la mitocondria.



**Figura 5.** Esquema representativo del principio biológico de la Prueba de Detección de Citotoxicidad de LDH. La conversión del ácido láctico catalizado por la enzima de LDH es una reacción enzimática de óxido-reducción que es revelada cualitativamente por el cambio de color de amarillo a rojo. Modificada del manual de uso TaKaRa LDH Cytotoxicity Detection Kit.

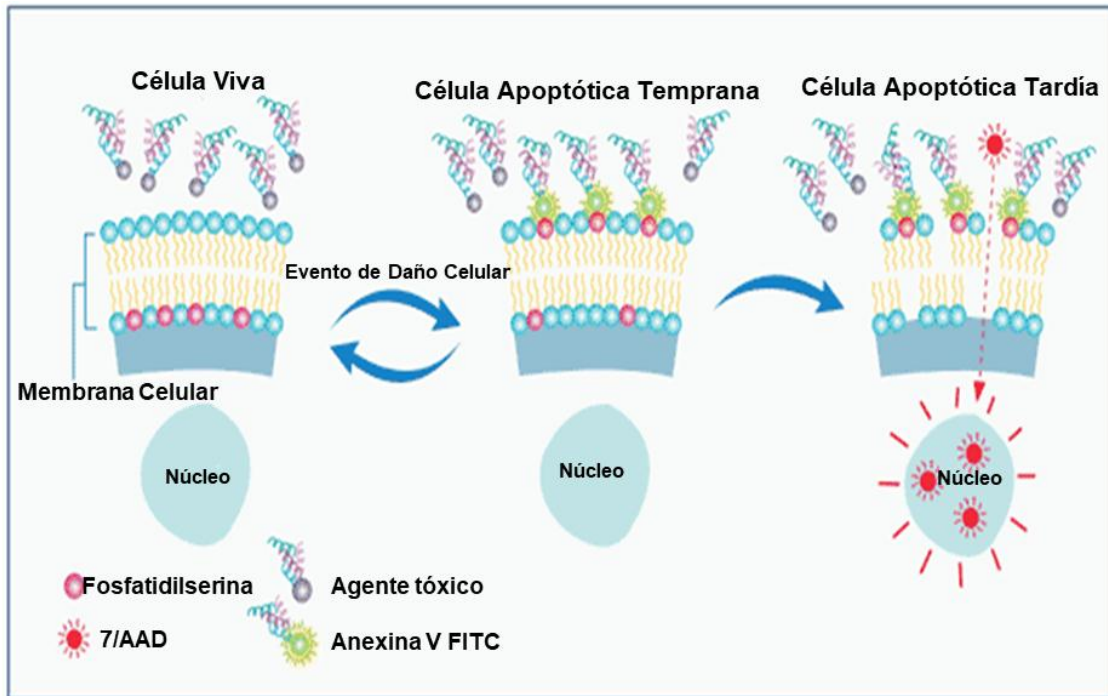
**5.7.3 Prueba de detección de apoptosis.** El mantenimiento de la viabilidad y el funcionamiento normal de las células se debe a una serie de señales bioquímicas que les permite responder a los cambios en el entorno. La pérdida de estas señales o la inducción de las mismas por condiciones ambientales específicas, generalmente culmina en apoptosis o muerte celular, un fenómeno normal en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Esta respuesta apoptótica empieza con una fase inicial donde están involucrados los receptores específicos de la superficie celular que propician cascadas de transducción de señales (Ashkenazi & Dixit, 1998; Sebbagh et al., 2001; Suzuki et al., 2014).

Dependiendo del tipo de célula, es posible evidenciar todos o solo un subconjunto de estos cambios. Específicamente, la Anexina V pertenece a una familia de proteínas que se unen tanto al calcio como a los fosfolípidos, así como a fosfolípidos cargados negativamente en niveles fisiológicos de Calcio, con una alta afinidad por la Fosfatidilserina (Meers & Mealy, 1993). En las células normales, la Fosfatidilserina se encuentra predominantemente en la capa interna de la membrana plasmática. Las células apoptóticas pierden esta asimetría de fosfolípidos, lo que lleva a la exposición de Fosfatidilserina en su superficie. Dicha exposición facilita el reconocimiento y fagocitosis por macrófagos (Koopman et al., 1994).

Este evento relativamente temprano en células que han sido inducidas a sufrir apoptosis y que muestran condensación nuclear antes de exhibir daño de la membrana, es posible identificarlo mediante el marcaje con un fluorocromo con Anexina V (Figura 6). Esta proteína utilizada en Citometría de flujo para identificar de la translocación de la Fosfatidilserina en la superficie externa de las membranas celulares de células apoptóticas.

Teniendo en cuenta que el proceso apoptótico una vez que inicia se encuentra en constante cambio, existen otros indicadores como la 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), un colorante fluorescente no permeable, considerado como un agente de unión al ADN. Este se intercala entre las bases nitrogenadas de citosina (C) y guanina (G) produciendo aductos altamente fluorescentes que identifican las células como "no viables"; en efecto, una intensidad alta de fluorescencia puede identificar células apoptóticas tardías o necróticas y muertas (Figura 6) (Philpott et al., 1996; Zembruski et al., 2012).

Adicionalmente, este método permite inferir el estado avanzado de apoptosis de las células puesto que demuestra que las membranas plasmáticas están dañadas o altamente permeables, por lo tanto, permiten el ingreso del colorante al núcleo; además, evidencia la alteración del metabolismo celular y la activación de la respuesta enzimática de apoptosis.



**Figura 6.** Mecanismo de detección de Apoptosis por Citometría de flujo Anexina V FITC con 7AAD. Una célula en condiciones normales es altamente selectiva, pero agentes tóxicos puede alterar la permeabilidad y polaridad de la membrana celular como evidencia de un proceso celular apoptótico temprano el cual se evidencia con la exposición de la Fosfatidilserina a la cual se adhiere la Anexina V. El deterioro de la membrana celular como parte del proceso de apoptosis tardía permite el ingreso de moléculas como 7AAD las cuales se intercalan en la cadena de ADN, como indicador de este evento. Tomado y modificado del catálogo Novus Biologicals a Biotechne Brand (Brand, 2020).

## 5.8 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad hace referencia a todos los daños que pueden causar agentes de tipo físico, químico y biológico, al ADN de células expuestas. Existen varias alternativas que pueden ser empleadas para identificar el efecto genotóxico producido en CMSP, por ejemplo, el biomarcador de Micronúcleos el cual es clasificado como un biomarcador de efecto debido a que refleja alteraciones en un organismo de tipo fisiológico o bioquímico y que permite medir y predecir los



posibles problemas de salud por exposición a agentes genotóxicos (Au et al., 1991; Manno et al., 2010).

**5.8.1 Prueba de Micronúcleos.** El biomarcador de micronúcleos (Mn), en las células humanas, se ha convertido en una de las pruebas citogenéticas estándar para la evaluación genotóxica de diferentes compuestos *in vitro* (Kirsch-Volders et al., 2014). Los Mn permiten evaluar la rotura cromosómica, la pérdida cromosómica, la no disyunción, la necrosis, la apoptosis y la citostasis (Fenech, 2000, 2006). En combinación con el uso de sondas centroméricas o anticuerpos de cinetocoro, también es posible distinguir entre la rotura y pérdida de cromosomas, como el mecanismo de formación de Mn y medir la mala distribución de cromosomas entre los dos núcleos en células binucleadas (Fenech et al., 2016; Kirsch-Volders et al., 2018).

Los mecanismos que dan lugar a la de formación de Mn son la hipometilación de satélites centroméricos y secuencias paracentroméricas, defectos de cinetocoro, huso disfuncional y mutaciones en genes del punto de control de anafase. La hipometilación de las regiones centroméricas y paracentroméricas: repeticiones de satélites y la pérdida de metilación alarga las regiones repetidas disminuyendo la tensión en los cinetocoros y creando así conexiones incorrectas entre los microtúbulos del huso mitótico y los cromosomas (Bonassi et al., 2011; Luzhna et al., 2013).

El biomarcador de Mn en CMSP, es un biomarcador citogenético validado como predictor de riesgo de cáncer (Bonassi et al., 2011; Kirsch-Volders et al., 2018). Los Mn se forman durante la anafase y corresponden a cuerpos de cromatina, con un diámetro que oscila entre 1/3 y 1/16 en relación al núcleo principal, que quedan rezagados en el citoplasma de las células hijas, convirtiéndose en uno o varios núcleos secundarios (Holland et al., 2008; Schmid, 1975). El registro de Mn en células humanas y / o de mamíferos cultivadas, está restringida a las células que han pasado por un ciclo de división celular. Estas células se reconocen por su apariencia binucleada (BN) después de la inhibición de la citocinesis. Esta prueba es una alternativa eficaz, sencilla y económica para detectar la pérdida de material genético.

## 6. ANTECEDENTES

Las NPs-ZnO han demostrado su gran potencial de aplicabilidad, siendo de interés su caracterización toxicológica considerando su potencial de uso como una herramienta biotecnológica en diferentes campos. En coherencia con lo mencionado, las NPs-ZnO sintetizadas por el Grupo de investigación CYTEMAC han sido evaluadas previamente usando como modelo biológico ratones *Mus*

*musculus*, hongos patógenos del café (*Coffea arabica*) como *M. citricolor* y en la bacteria *Escherichia coli*, para evaluar la actividad biológica de la misma.

De esta manera, los ratones *Mus musculus* fueron expuestos a una dosis de 50 mg de NPs-ZnO por Kg de peso corporal, mediante suspensiones de las NPs esféricas caracterizadas por tener un tamaño promedio ~ 50 nm en agua ingerida por los animales cada dos días durante un período de 14 días. En este periodo de tiempo los ratones expuestos a las NPs-ZnO bajaron de peso gradualmente, presentando un alto porcentaje de variación de peso corporal de 21,4% comparado con el control que fue solamente de 0,141%.

Así mismo, se encontró que las NPs-ZnO se acumularon en riñones en 17,05 ppm de Zinc (Zn) proveniente de la disociación de las NPs, correspondiente a 7 veces más que el grupo control, no obstante, las biopsias realizadas a este órgano no mostraron cambios patológicos en la estructura de las nefronas (unidades básicas de la fisiología renal). Por otro lado, reportan que la acumulación de Zn iónico en el hígado fue menor que en los riñones con un valor de 16,68 ppm, causando esteatosis, patología caracterizada por la acumulación de grasa en los hepatocitos, aspecto que demuestra la toxicidad de las NPs-ZnO (Medina et al., 2018).

Como parte de la evaluación de perfil toxicológico de las NPs-ZnO, anteriormente mencionadas, se demostró su capacidad antifúngica con una inhibición del crecimiento de las estructuras vegetativas y reproductivas del hongo *M. citricolor* a una concentración de 9 mmol·L<sup>-1</sup> del 92,3%. Se evidenció que la inhibición del crecimiento de los hongos y las afectaciones micro y ultraestructurales se relacionan con la alta relación de átomos superficiales/átomos en el volumen de las NPs (relacionada con el alto valor de la superficie específica) y las características fisicoquímicas de superficie que podrían producir directa o indirectamente especies ROS, que afectan las proteínas de la pared celular causando disfunción celular observada (Arciniegas-Grijalba et al., 2019).

El último estudio realizado, para evaluar el efecto antifúngico de esta nanopartícula, reporta que el área de crecimiento del hongo expuesta a la acción de concentraciones de 15 mmol/L, 12 mmol/L y 9 mmol/L NPs-ZnO, un porcentaje de inhibición del crecimiento de hongos; este porcentaje de inhibición fúngica fue significativamente alta, aproximadamente el 96% para la concentración de 15 mmol/L, la cual pasado un tiempo de 6 días, provocó pérdida en la continuidad de algunas hifas, favoreciendo la formación de estructuras de apariencia compacta (similar a las vacuolas) dentro de la hifa, además de disminuir el espacio citoplasmático (Mosquera-Sánchez et al., 2020).

El estudio más reciente realizado con las NPs-ZnO objeto de estudio, consistió en la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las NPs utilizando la bacteria *Escherichia coli*, una enterobacteria gram negativa, presente en aguas

contaminadas y que afecta la salud humana al ser ingerida.  $4 \times 10^5$  UFC/mL de la cepa de *E. coli* fueron tratadas con concentraciones de 500  $\mu\text{g/mL}$  en dilución seriada hasta 2  $\mu\text{g/mL}$ , durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Los resultados evidencian una respuesta concentración-dependiente, tal que la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue 62,5  $\mu\text{g/mL}$  de NPs-ZnO. Por otro lado, en las bajas concentraciones no se observó ningún tipo de inhibición importante del crecimiento (Benitez-Salazar et al., 2021).

Estudios realizados sobre la evaluación biológica de otros tipos de NPs-ZnO realizadas por varios investigadores ha demostrado el potencial tóxico de estas NPs en CMSP expuestos. Estos reportes indican la disminución significativa de viabilidad celular de las CMSP humanos tratados con una concentración igual o superior de 0.5  $\mu\text{M}$  de NPs-ZnO producidas comercialmente, con forma hexagonal y un tamaño medio de partícula de 40nm (CAS No. 1314-13-2) (Sliwinska et al., 2015). Adicionalmente, otro estudio reporta que existe un efecto tóxico significativo inducido por NPs-ZnO esféricas, con un tamaño de  $30 \pm 10$  nm, en CMSP en fase proliferativa expuestos a una concentración mayor a 40  $\mu\text{g/mL}$  (Bhattacharya et al., 2014).

Autores como Shalini y colaboradores (2018), muestran mediante el ensayo de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol que se presentó una disminución en la viabilidad celular dependiente de las concentraciones de NPs-ZnO usadas para tratar los CMSP (1000, 500, 200, 100, 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Estas NPs presentaron una forma esférica y tamaño de 187nm obtenidas mediante procesos de filtración, Sin embargo, en este estudio la prueba de detección de citotoxicidad de LDH no mostró una liberación significativa de esta enzima citoplasmática a concentraciones de 50 y 25  $\mu\text{g/mL}$ , en comparación con las células no tratadas. No obstante, se encontró que los niveles de ROS en CMSP tratados con concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de NPs-ZnO aumentaron significativamente  $p < 0.01$  con relación a las células tratadas.

Un estudio realizado en la India en el año 2009, sobre el daño que inducen las NPs-ZnO a CMSP, reveló que, al utilizar Citometría de flujo con Rodamina, las CMSP tratadas con 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$  de NPs-ZnO, con un tamaño de 19,82 nm, presentaban una disminución significativa en los valores de potencial de la membrana mitocondrial con un valor de 17% a 41%, respectivamente, comparado con el control no tratado. La interrupción del potencial de membrana de la mitocondria a menudo precede a la degradación del ADN nuclear. Estos resultados sugieren que una baja concentración de NPs-ZnO puede conducir a la disfunción mitocondrial como consecuencia de esta alteración (Musarrat et al., 2009).

Estos resultados coinciden con los encontrados por Andersson-Willman y colaboradores (2012) quienes para comprobar el efecto de las NPs-ZnO fabricadas comercialmente, con un tamaño de  $10 \pm 2$  nm sobre la viabilidad de las

CMSP, realizaron un ensayo de PI / Anexina V que no mostró se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el aumento de células apoptóticas a 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$ ; además, hubo un aumento significativo en la cantidad de células necróticas, a las mismas después de 24 horas de exposición de las CMSP.

Branica y colaboradores (2016) reportan el efecto de NPs-ZnO en CMSP, los resultados permitieron determinar que hubo un aumento significativo del número de células apoptóticas después de tratar estas células, durante 14 días, con concentraciones de 7,5 y 5  $\mu\text{g/mL}$  de NPs-ZnO de tamaño  $<35$  nm de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) Estudios que tenían como objetivo caracterizar el perfil tóxico de estas NPs mostraron, mediante la evaluación simultánea de la prueba de LDH y MTT, que la citotoxicidad era concentración-dependiente en CMSP que fueron tratados con 50, 20 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , señalando que el porcentaje de supervivencia de las células fue de 33%, 54% y 78%, respectivamente.

Las NPs-ZnO evaluadas en este estudio fueron nanoesferas que presentaban un tamaño de 48nm. El porcentaje de liberación de LDH fue estadísticamente significativo a las mismas concentraciones, al comparar el control no tratado ( $p<0.005$ ). En contraste con las pruebas realizadas, también se valoró la morfología celular de las CMSP, a las 48 horas de tratamiento y se encontró que estaban hinchados y que su morfología se modificó ligeramente en comparación con el control (Aula et al., 2014).

Mediante la implementación del Ensayo Cometa, para identificar el daño primario al ADN causado por las NPs-ZnO, varios autores reportan que al exponer CMSP a concentraciones de 5 y 7,5  $\mu\text{g/mL}$  tanto el tamaño del cometa,  $39.4\pm 26.3$ ;  $38.4\pm 21.9$ , como la intensidad del cometa,  $17.7\pm 27.4$ ;  $10.7\pm 16.4$  aumentaron significativamente (Branica et al., 2016). Recientemente, Shalini y colaboradores (2018) mostraron que las NPs-ZnO inducían daños en el ADN de una manera dependiente de la concentración, para esta evaluación se utilizaron concentraciones de 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $p<0.01$ ); los valores medios del porcentaje de ADN en la cola del cometa aumentaron linealmente con la dosis y específicamente a 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p<0.01$ ); el porcentaje de ADN en la cola fue igual al del control positivo (células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Otros resultados del ensayo cometa en CMSP expuestos a NPs-ZnO con concentraciones crecientes (1,000, 800, 400, 200, 100, 10  $\mu\text{g/mL}$ ), durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$ , evidenciaron la formación de roturas de cadena sencilla en el ADN, lo que indicaba un aumento de daño genotóxico dependiente de la dosis de las NPs en la longitud de la cola del cometa, en comparación con el control no tratado ( $p<0.05$ ). El porcentaje del daño del ADN notado a 1,000  $\mu\text{g/mL}$  se encontró que era similar ( $63.14 \pm 2.08$ ) al daño causado por Metilmetano sulfonato (MMS/65  $\mu\text{M}$ ) ( $63.62 \pm 1.48$ ) usado como control positivo en el experimento. El daño identificado en el ADN sugiere el posible papel de ROS inducidos por la presencia

de las NPs-ZnO, ya que se sabe que la presencia de las NPs produce radicales libres, los cuales son causantes de varios daños celulares (Musarrat et al., 2009).

Los biomarcadores validados como predictores del riesgo a desarrollar problemas de salud a corto o largo plazo también han sido usados por varios autores para evaluar el efecto de las NPs-ZnO sobre sistemas biológicos. Estos estudios reportan que la formación de Mn aumenta significativamente en CMSP tratados con 22 µg/mL NPs ( $p=0.003$ ), lo cual podría estar relacionado con la intensidad de la fragmentación de ADN en estas células, a una concentración de 20 µg/mL ( $p<0.05$ ) (Aula et al., 2014). Otra investigación indica un aumento en la frecuencia de células binucleadas con Mn en todos los grupos de tratamiento (20, 15, 10, 5, 2, 1 µg/mL) en comparación con el control no tratado. Sin embargo, este incremento fue significativo sólo para las concentraciones de 10 µg/mL ( $p<0.001$ ) y 15 µg/mL ( $p<0.05$ ), aumento dependiente de la dosis (Gümüs et al., 2014).

Otro trabajo realizado indica que la frecuencia de Mn en CMSP expuestos a las concentraciones de 20, 10, 5, 0,5, µg/mL de NPs-ZnO, no aumentó significativamente, pero se observó que, a concentraciones más altas, como 20 µg/mL, se evidenciaba un incremento la misma. Mientras que las células expuestas a concentraciones de 20 y 10 µg/mL de NPs-ZnO con un tamaño 18,3 nm y forma hexagonal, presentaron un efecto citotóxico alterando la proliferación celular normal de las células objeto de estudio (Efthimiou et al., 2020).

Otros tipos de metodologías utilizadas para analizar Alteraciones Cromosómicas (AC) y el Índice Mitótico (IM) mostraron que NPs-ZnO con morfología hexagonal y tamaño de 50 nm inducen un aumento significativo en la frecuencia de células anormales en las concentraciones (20, 15, 10, 5, 2, 1 µg/mL). Específicamente, 2 y 15 µg/mL en 24 horas de exposición, se presentó un aumento significativo de las AC para todas las concentraciones de trabajo definidas en el estudio excepto para las concentraciones de 2 y 15 µg/mL, en comparación con el control negativo.

Para el período de tratamiento de 48 h, las NPs-ZnO indujeron un incremento no significativo en la frecuencia de células anormales, efecto que no se evidenció en las CMSP expuestas a la concentración de 10 µg/mL. Además, se observó un aumento no significativo de AC en las concentraciones de trabajo a excepción de las concentraciones de 10 y 5 µg/mL. Mientras el aumento en la frecuencia de células anormales fue ligeramente dependiente de la concentración, no hubo dependencia del biomarcador de AC a las 24 y 48 horas de tratamiento respecto a la concentración.

Los resultados anteriores indican que a diferencia de otros estudios, que la exposición a altas concentraciones de las NPs-ZnO propiciaron menos anomalías celulares en un tiempo de 48 horas de tratamiento, lo cual podría

indicar que no siempre el aumento de concentraciones incrementaría los efectos genotóxicos de este nanomaterial (Gümüs et al., 2014).

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se realizó un estudio experimental *in vitro*, en donde se evaluó la toxicidad de las NPs-ZnO en CMSP, provenientes de 3 donantes masculinos sanos. Se determinó este número de participantes para la realización de cada prueba de citotoxicidad y genotoxicidad conforme a las recomendaciones para evaluación y caracterización de agentes con potencial tóxico de la OECD (OECD, 2014, 2018).

Todas las pruebas *in vitro* fueron realizadas mediante 3 experimentos independientes cada uno por triplicado.

### **7.2 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE OXIDO DE ZINC**

Las nanopartículas de óxido de zinc fueron donadas por el Grupo de Investigación Ciencia y Tecnología de Materiales Cerámicos (CYTEMAC), quienes las sintetizaron mediante el método de Pechini o método del precursor polimérico (Guerrero et al., 2013; Salas et al., 2016) y las caracterizaron fisicoquímicamente utilizando diferentes técnicas convencionales. Los resultados indicaron que las características más relevantes eran: un tamaño de cristalito del ZnO sintetizado inferior a 100 nm, aproximadamente 33,20 nm, morfología esférica y estructura cristalina tipo wurtzita (Benitez-Salazar et al., 2021).

### **7.3 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA**

La sangre fue extraída, por punción intravenosa en vacutainers heparinizados, de tres donantes varones saludables, con edades entre 18 y 30 años quienes accedieron libremente a donar sangre, durante todo el proyecto y firmaron el consentimiento informado y confidencialidad de los datos. Al momento de la recolección de la muestra de sangre los donantes de sangre manifestaron no estar expuestos a radiaciones o productos químicos, ni presentar antecedentes clínicos de malignidad, malformaciones genéticas, enfermedades crónicas y enfermedades infecciosas. La sangre obtenida se usó como fuente de CMSP para el establecimiento de las pruebas de detección de citotoxicidad (LDH, Resazurina y Apoptosis por Citometría de Flujo y genotoxicidad (Micronúcleos)).

## 7.4 AISLAMIENTO Y TRATAMIENTO DE CMSP

El aislamiento de CMSP fue realizada mediante el protocolo de extracción por gradiente de densidad con Ficoll-histopaque (Lonza 17-829E). Para ello, se diluyó la muestra de sangre extraída con Buffer fosfato salino (PBS) (GIBCO 70011), en relación 1:1, dilución que fue vertida en Ficoll-histopaque (Lonza 17-829E), en relación 1:3, para posteriormente centrifugarlas (2250rpm durante 30 minutos a T° ambiente). Se retiró la capa leucocitaria, la cual fue trasferida a un tubo falcón de 15 mL diferente y se procedió a realizar dos lavados con PBS 1X (GIBCO 7001). Las CMSP obtenidos en el proceso fueron resuspendidos en Medio RPMI 1640 (Lonza, 12-702F) suplementado para realizar el conteo y viabilidad celular por el método de exclusión de azul de Tripan.

Para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de las CMSP expuestas a las NPs-ZnO, fueron tomados como referentes otros trabajos realizados con NPs, se realizó un proceso de estandarización para determinar la cantidad de células necesarias para el establecimiento de los cultivos, así como las concentraciones de trabajo de las NPs, puesto que de acuerdo a la caracterización del nanomaterial mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), estas partículas se aglomeran conformando barras o láminas de tamaño micrométrico.

Teniendo en cuenta lo anterior, y que los equipos usados (espectrofotómetro, citómetro de flujo) para realizar la lectura de los resultados son diseñados para el análisis de absorbancias y fluorescencias, estos aglomerados podrían interferir en la lectura de los resultados generando falsos positivos; se procedió a realizar una dilución seriada partiendo de una solución de NPs-ZnO con concentración de 1 mg/mL hasta 1 µg/mL, con el objetivo de evaluar tanto la dispersión de las NPs, como la posible aglomeración de las mismas en el medio de cultivo.

De igual manera, se desarrolló el protocolo de dispersión de las NPs-ZnO para dilución y establecimiento de las concentraciones de las soluciones de trabajo. Las NPs-ZnO fueron diluidas en Medio RPMI 1640 (Lonza, 12-702F), para establecer una solución Stock, la cual se sonicó durante 30 minutos a 37°C. A partir de la solución Stock, se establecieron concentraciones de trabajo las cuales fueron sonicadas durante 10 minutos a 37°C, vorteadas y aplicadas a las CMSP.

Una vez fue realizado el protocolo de dispersión de las NPs, se definieron como soluciones óptimas de trabajo las concentraciones de 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,2 µg/mL; 15,6 µg/mL; 7,8 µg/mL; 3,9 µg/mL; 2 µg/mL y 1 µg/mL. Posteriormente, se procedió a establecer la Concentración Citotóxica 50 (CC50) por medio de la prueba de citotoxicidad por Resazurina, con el objetivo de establecer las concentraciones de tratamiento para la totalidad de pruebas objeto de estudio.

## 7.5 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD POR RESAZURINA

Una vez realizado el aislamiento de CMSP, se establecieron cultivos de 150.000 células en 100 µL de medio RPMI-1640 (Lonza, 12-702F) suplementado al 10% de SBF (Gibco 16000-044), los cuáles se trataron con 100 µL de tratamiento (concentración: 250 µg/mL; 125 µg/mL ; 62,5 µg/mL ; 31,2 µg/mL; 15,6 µg/mL; 7,8 µg/mL; 3,9 µg/mL; 2 µg/mL y 1 µg/mL), como controles se utilizará Triton® X-100 (CAS 9036-19-5 Merck) a una concentración de 1X (control positivo), Medio RPMI-1640 (Lonza, 12-702F) suplementado con el 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco 16000-044) (control negativo) y Medio RPMI-1640 (Lonza, 12-702F) suplementado con el 10% de SBF (Gibco 16000-044) (control Background). Todas las condiciones fueron establecidas para su evaluación por triplicado. Una vez se trataron los cultivos se adicionó el reactivo Alamar Blue (Thermo Scientific 88952) en relación 1:10. Después de 24 horas de incubación, en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, se realizó la lectura de la absorbancia en el Espectrofotómetro de microplacas (Multiskan Sky; Thermo Scientific, USA), a las longitudes de onda de 570 y 630 nanómetros.

La interpretación de los resultados se realizó mediante el uso de la fórmula que se detalla a continuación:

$$\text{Porcentaje Reducción Tto y Control} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

Donde:

O1= Coeficiente de extinción molar oxidado a 570nm

O2= Coeficiente de extinción molar de alamar Blue oxidado a 630nm

A1= Absorbancias prueba a 570nm

A2= Absorbancias prueba a 630nm

P1= Absorbancias Control positivo a 570nm

P2= Absorbancias Control positivo a 630nm

## 7.6 PRUEBA DE DETECCIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LDH

La prueba de LDH se realizó una vez se ejecutó el protocolo de aislamiento de CMSP con gradiente de densidad de Ficoll-histopaque (Lonza, 17-829E). Las células extraídas fueron depositadas en un microplato de 96 pozos, fondo plano, para establecer los cultivos celulares que contenían 100.000 células en 100 µL de Medio RPMI-1640 (Lonza, 12-702F) completo, suplementado con el 1% de Suero bovino fetal (SBF) (Gibco 16000-044), a los que se le adicionaron 100 µL de las



soluciones de trabajo (concentraciones: 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,2 µg/mL; 15,6 µg/mL; 7,8 µg/mL; 3,9 µg/mL; 2 µg/mL y 1 µg/mL ), por lo que cada pozo tuvo una concentración reducida a la mitad de NPs-ZnO. Por otro lado, se tomó como control positivo: Triton® X-100 (CAS 9036-19-5 Merck) a una concentración de 1X y como control negativo: Medio RPMI-1640 (Lonza, 12-702F) suplementado con el 1% de SBF (Gibco 16000-044) para un volumen final de 200 µL por pozo.

Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los cultivos fueron incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 24 horas, estos se centrifugaron y se removieron 100 µL de sobrenadante, el cual fue transferido a un microplato de 96 pozos fondo plano. La detección de citotoxicidad de LDH se realizó utilizando el kit (TaKaRa BIO INC), que, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se debe combinar la solución A que contiene el Catalizador (diaforasa/NAD<sup>+</sup>, liofilizado) con la solución B del kit, un colorante que contiene cloruro de yodotetrazolio (INT) y lactato de sodio. La cuantificación de la LDH liberada se realizó en un espectrofotómetro tipo ELISA (STAT FAX 3200; Teherán, Irán) a una longitud de onda de 490 nanómetros.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad como resultado de la actividad tóxica de las NPs-ZnO sobre las CMSP, se evaluó la proporción de liberación de la enzima citoplasmática con relación al control no tratado.

## **7.8 PRUEBA DE APOPTOSIS**

Las CMSP fueron aislados por el método de separación de Ficoll-histopaque (Lonza 17-829E) y se establecieron cultivos con 1.500.000 células en 1 mL de medio RPMI- 1640 (Lonza 12-702F) suplementado al 10% de SBF, los cuales fueron tratados con 1 mL de tratamiento (concentraciones de NPs-ZnO de 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,2 µg/mL; 15,6 µg/mL; 7,8 µg/mL; 3,9 µg/mL; 2 µg/mL y 1 µg/mL , control positivo: peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y control negativo Medio RPMI-1640 (Lonza, 12-702F) suplementado con 10% de SBF (Gibco 16000-044). Los cultivos fueron incubados durante 24 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.

Pasadas las 24 horas de establecimiento de los cultivos, se realizó el protocolo de marcación con el Kit de detección de apoptosis de Anexina V FITC y 7AAD (Biolegend Pharmingen™, Cat. No. 640922) de acuerdo las recomendaciones del fabricante, el cual consistía en el lavado de las células con PBS (GIBCO 7001) constituido con el 1% de SBF (Gibco 16000-044) y la adición a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad por 15 minutos de Anexina V FITC y 7AAD (Biolegend Pharmingen™, Cat. No. 640922). Se establecieron controles de corrida (células no teñidas, células teñidas solamente con Anexina V FITC y células teñidas solamente con 7AAD) para la configuración de la compensación

del equipo y el establecimiento de los cuadrantes donde el eje de la X (FL-1) fue Anexina V y el eje de la Y (FL-3) correspondió a 7AAD, estos parámetros fueron establecidos en el Citómetro de Flujo (BD ACCURI C6, USA).

Se adquirieron 30.000 células o eventos por cada réplica de la concentración establecida en el experimento. La población no tratada se utilizó para definir el nivel basal de células apoptóticas y necróticas, las cuales fueron usadas como un valor de referencia para el resto de concentraciones evaluadas. Las células en apoptosis temprana fueron identificadas como (Anexina<sup>+</sup> V/ 7AAD<sup>-</sup>), la población de células apoptóticas tardías como doble positivas (Anexina<sup>+</sup> V/ 7AAD<sup>+</sup>) y las células necróticas como (Anexina<sup>-</sup> V/ 7AAD<sup>+</sup>).

## **7.9 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN CMSP**

Se estableció la Prueba de Micronúcleos (Mn) con bloqueo de la citocinesis con Cyt-B, (Fenech, 2006) con cultivos celulares con sangre total, por duplicado, los cuales fueron estimulados con Fitohemaglutinina (PHA, Sigma L-8754), utilizando una concentración final en cultivo de 10 µg/mL, en un volumen final de 2 mL. Las células fueron incubadas durante 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el establecimiento de las concentraciones a evaluar en la prueba de genotoxicidad se tuvieron en cuenta estudios previos realizados para evaluar la genotoxicidad inducida en CMSP como parte de la caracterización biológica de las NPs-ZnO objeto de estudio (Fernández-Valenzuela et al., 2020).

Pasadas las 24 horas del establecimiento del cultivo, se trataron las células con NPs-ZnO, previo protocolo de sonicación, con las concentraciones de 31,2 µg/mL, 7,8 µg/mL; 2 µg/mL; y 0,5 µg/mL, las cuales fueron establecidas conforme al valor más cercano a la CC50 obtenida en la prueba de citotoxicidad por Resazurina. Adicionalmente, los controles se establecieron como: control positivo Mitomicina C (Sigma M-0503) a una concentración de 0,13 µg/mL y control negativo células sin tratamiento; las células tratadas fueron incubadas durante 24 horas. Posteriormente, a las 44 horas de estimulación con PHA y de tratamiento de cada concentración de NPs a las células se les adicionó 6 µg/mL de Cyt- B (Sigma C-6762) sin previo lavado, para bloquear la citocinesis y obtener células con apariencia binucleada.

La cosecha de las células se realizó a las 72 horas, donde fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 8 minutos e hipotonizadas con KCl a una concentración de 0,075M. Luego las células fueron fijadas con Carnoy (metanol/ácido acético, 3:1) y centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos, este proceso de fijación se realizó

tres veces para proceder a extender las células fijadas sobre portaobjetos previamente limpios y humidificados (Fenech, 2007).

Las placas fueron teñidas utilizando el método de Giemsa (Sigma G-5637), al 10%, y fijadas permanentemente con Entelan (Sigma-Aldrich 107961). Posteriormente se analizaron a doble ciego en un microscopio óptico de luz (Nikon E100) un total de 2000 células binucleadas por concentración con un aumento de 40X y las células binucleadas con Micronúcleos se confirmaron a 100X. Para el registro de las preparaciones citogenéticas se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones establecidas por el Comité Internacional de Micronúcleos Humanos (Fenech, 2007; Fenech et al., 2003):

<b>Criterios de registro</b>	
<b>Células Binucleadas</b>	Dos núcleos principales dentro de una sola célula.
	Los núcleos son de tamaño similar e igual intensidad de la tinción.
	Los núcleos pueden ser separados o en contacto entre sí.
<b>Micronúcleos</b>	Son de forma redonda u ovalada.
	El diámetro del Mn oscila entre 1/3 y 1/16 de los núcleos principales.
	Igual textura e intensidad de tinción que los núcleos principales.

## 7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

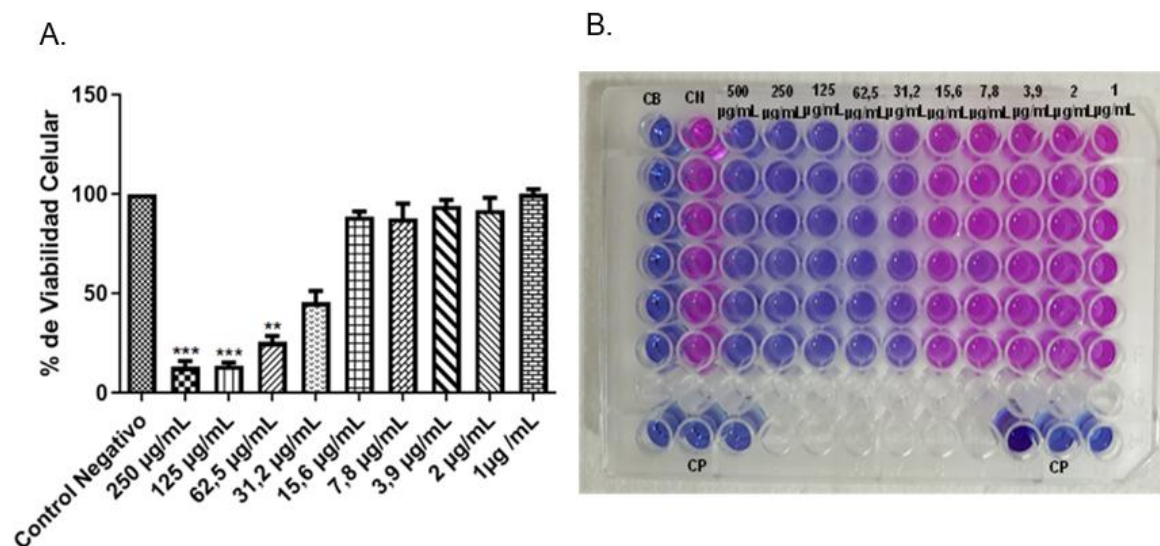
Todos los experimentos con CMSP se realizaron por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de comparaciones múltiples de análisis de varianza (ANOVA) y la comparación entre tratamientos se realizó con la Prueba post-hoc de Dunnett que compara los tratamientos con el control. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p \leq 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron en el programa de GraphPad Prism Software 8 (software GraphPad, San Diego, CA, EE.UU).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

#### 8.1.1 Efecto citotóxico de NPs-ZnO sobre CMSP

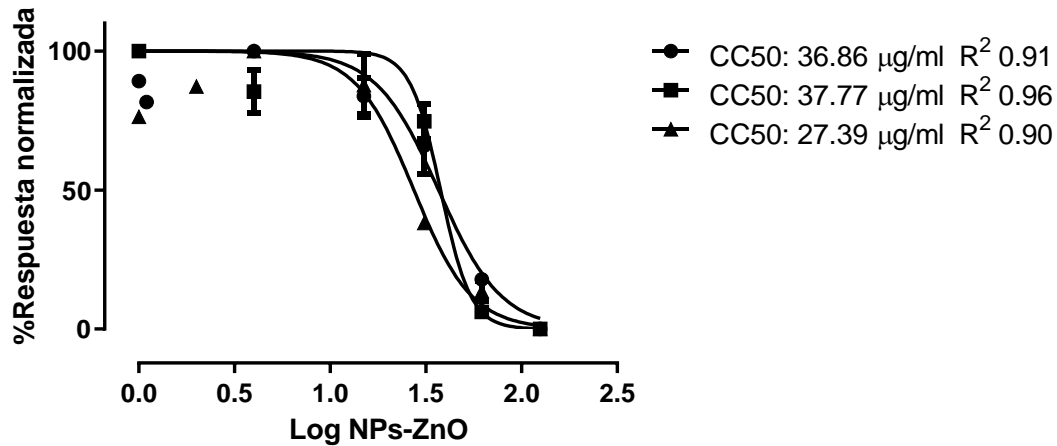
La evaluación del efecto citotóxico de las NPs-ZnO sobre CMSP, mostró que las concentraciones de 250, 125 y 62,5  $\mu\text{g/mL}$  redujeron la viabilidad celular significativamente comparado con el control  $p < 0,05$  (Ver figura 7 A y B). Los resultados obtenidos para cada individuo fueron similares en cuanto a la respuesta celular frente a cada concentración de NPs-ZnO, sin diferencia estadísticamente significativa entre individuos (Figura 7B).



**Figura 7.** Prueba de citotoxicidad por Rezasurina en CMSP tratadas con NPs-ZnO. **A.** Los datos obtenidos se representan en gráfico de barras en términos de media + Error estándar por cada triplicada de cada donante; la significancia estadística se representa en  $p < 0.01^{**}$  y  $p < 0.001^{***}$  con respecto al control negativo, células no tratadas mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la Prueba post-hoc de Dunnett. **B.** Placa de 96 pozos, que representa el cultivo de CMSP de dos individuos líneas A, B, C y líneas D, E, F respectivamente y las líneas H 1, 2 y 3 y H 10, 11 y 12 representan los CP (controles positivos de cada individuo); las columnas representan las diferentes condiciones experimentales: CB (blanco), CN (control negativo) y las 10 diferentes concentraciones de NPs-ZnO; el color rosado: evidencia de CMSP viables y metabólicamente activas; el color Azul: evidencia de CMSP no viables, la capacidad metabólica mitocondrial de las CMSP expuestas disminuye significativamente a concentraciones altas como lo evidencia el cambio de color.

En el cálculo de la CC50 para cada individuo, los resultados mostraron que estos valores de CC50 no representaban una variabilidad mediante la prueba de análisis

de varianza (ANOVA) (figura 8). Dado a que no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa se estableció la CC50 promedio de 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

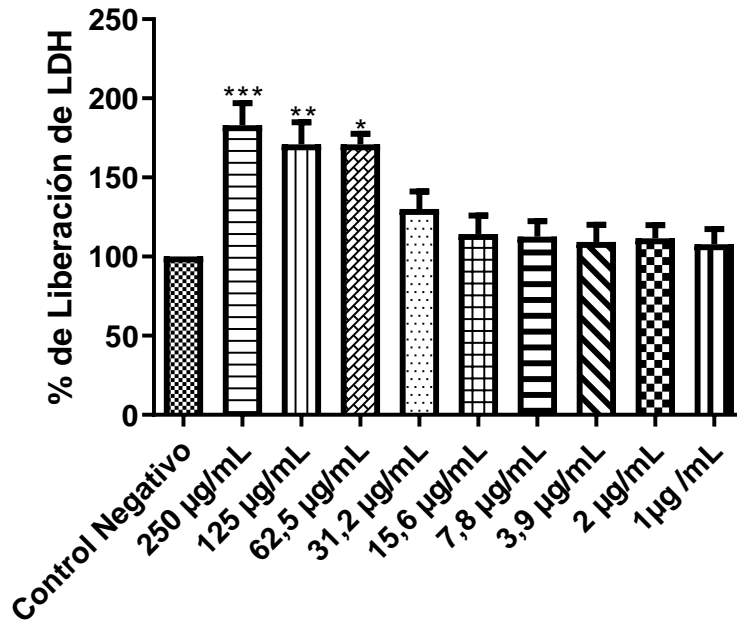


**Figura 8.** Gráfica de la Concentración Citotóxica 50 (CC50). Los datos obtenidos se expresan en términos de media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ), se sugiere 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NPs-ZnO como la concentración CC50 experimental representativa de 3 experimentos independientes, la cual corresponde aproximadamente el 50% de las CMSP viables después de 24 horas de exposición con las NPs.

### 8.1.2 Liberación de Lactato deshidrogenasa como medida de la integridad de la membrana celular

La evaluación del daño citotóxico por exposición a NPs-ZnO de las CMSP se desarrolló por medio de la prueba de citotoxicidad de LDH, prueba que no solo mide la viabilidad celular sino que, además, proporciona información sobre la integridad de la membrana celular mediante la liberación extracelular de la LDH. Como se muestra en la figura 9, el porcentaje de LDH liberada al medio extracelular utilizando las concentraciones 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de ZnO-NPs, fue apreciable con una significancia estadística respecto al porcentaje del control (células no tratadas)  $P < 0.05$ . En el tratamiento con NPs-ZnO en el rango de las concentraciones de 15,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , generó una liberación de LDH pero no hubo diferencia estadística respecto al valor del porcentaje en el control.

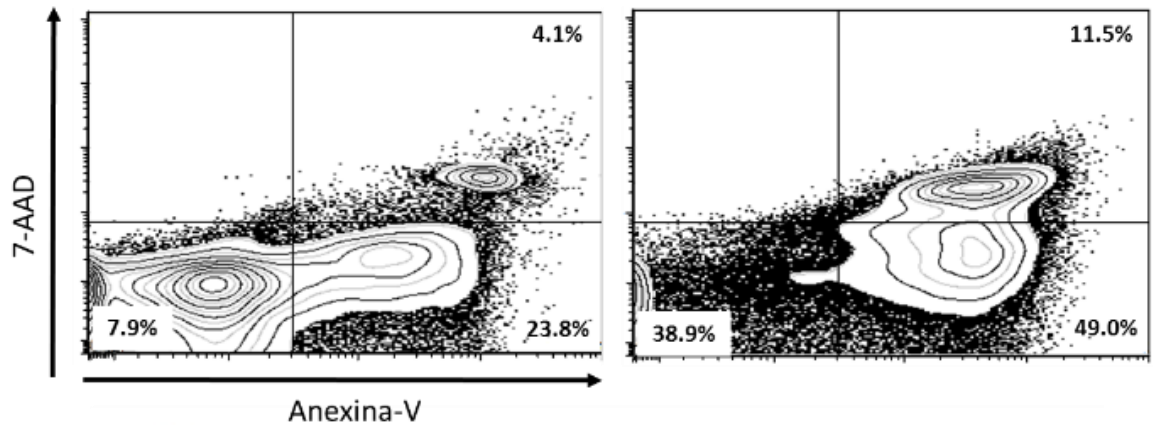
Para identificar diferencias en la respuesta biológica de las CMSP frente a la exposición de las concentraciones evaluadas de NPs-ZnO en cuanto al porcentaje de LDH liberada entre los 3 individuos, se realizó un análisis de varianza con ANOVA de una vía. Los resultados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de liberación de LDH entre cada individuo.



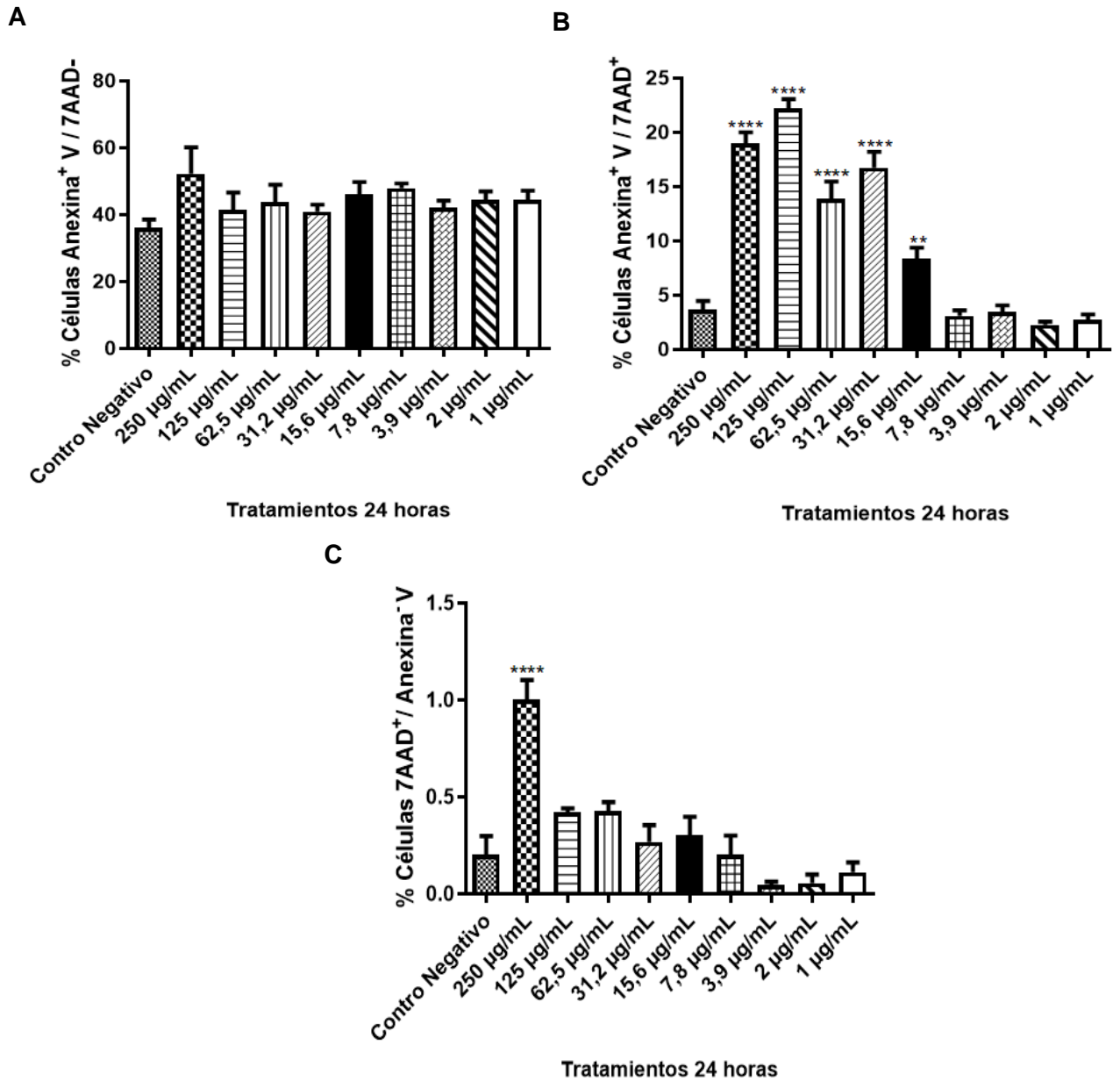
**Figura 9.** Liberación de LDH de CMSP expuestas a NPs-ZnO. Grafica representativa de 3 experimentos independientes del porcentaje de liberación de LDH de CMSP expuestas durante 24 horas a diferentes concentraciones de NPs-ZnO. Los datos corresponden al porcentaje de liberación de LDH respecto al control negativo de las diferentes condiciones experimentales, como una medida para evaluar la integridad de la membrana celular. Los datos son representados en gráficos de barras se expresan en términos de media + Error estándar (n = 3), las diferentes condiciones experimentales fueron comparadas con el control negativo mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la Prueba post-hoc de Dunnett.  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .

### 8.1.3 Inducción de muerte celular en CMSP por NPs-ZnO.

Los procesos de muerte celular de las CMSP, por exposición a NPs-ZnO, fueron evaluados por citometría de flujo (Figura 10). Los datos obtenidos muestran un aumento de CMSP en apoptosis tardías luego de ser tratadas con las concentraciones de 250; 125; 62,5 y 31,2 µg/mL de NPs-ZnO, comparado con el control de células no tratadas. El análisis de las diferentes subpoblaciones de células apoptóticas, en respuesta a las diferentes concentraciones de NPs-ZnO, demostró que el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina<sup>+</sup> V/ 7AAD<sup>-</sup>) no tubo diferencia estadística significativa respecto al control (Figura 11 A). Mientras que el porcentaje de células en apoptósis tardía (Anexina<sup>+</sup> V/ 7AAD<sup>+</sup>) mostro una diferencia con significancia estadística, respecto al control, entre las concentraciones de 250 a 15,6 µg/mL (Figura 11 B). Por último, el porcentaje de células necróticas (Anexina<sup>-</sup> V/ 7AAD<sup>+</sup>) fue mayor en la concentración de 250 µg/mL con diferencia estadísticamente significativa comparado con el control (Figura 11 C).



**Figura 10.** Gráfica representativa de citometría de flujo de la cuantificación de las diferentes subpoblaciones celulares conforme a la marcación con Anexina V-FITC y 7AAD. El gráfico izquierdo representa a células del control negativo (sin tratamiento) y el gráfico derecho representa a las células tratadas con 62,5 µg/mL NPs-ZnO; las células vivas (Anexina<sup>-</sup> V/ 7AAD<sup>-</sup>) se muestran en el cuadrante inferior izquierdo que corresponden al 7,9% y 38,9% respectivamente; las células apoptóticas tempranas (Anexina<sup>+</sup> V/ 7AAD<sup>-</sup>) se muestran en el cuadrante inferior derecho población representada por el 23,8% y 49,0% respectivamente; las células apoptóticas tardías (Anexina<sup>+</sup> V/ 7AAD<sup>+</sup>) se observan en el cuadrante superior derecho con el 4,1% y el 11,5% respectivamente; las células necróticas (Anexina<sup>-</sup> V/ 7AAD<sup>+</sup>) se encuentra en el cuadrante superior izquierdo.



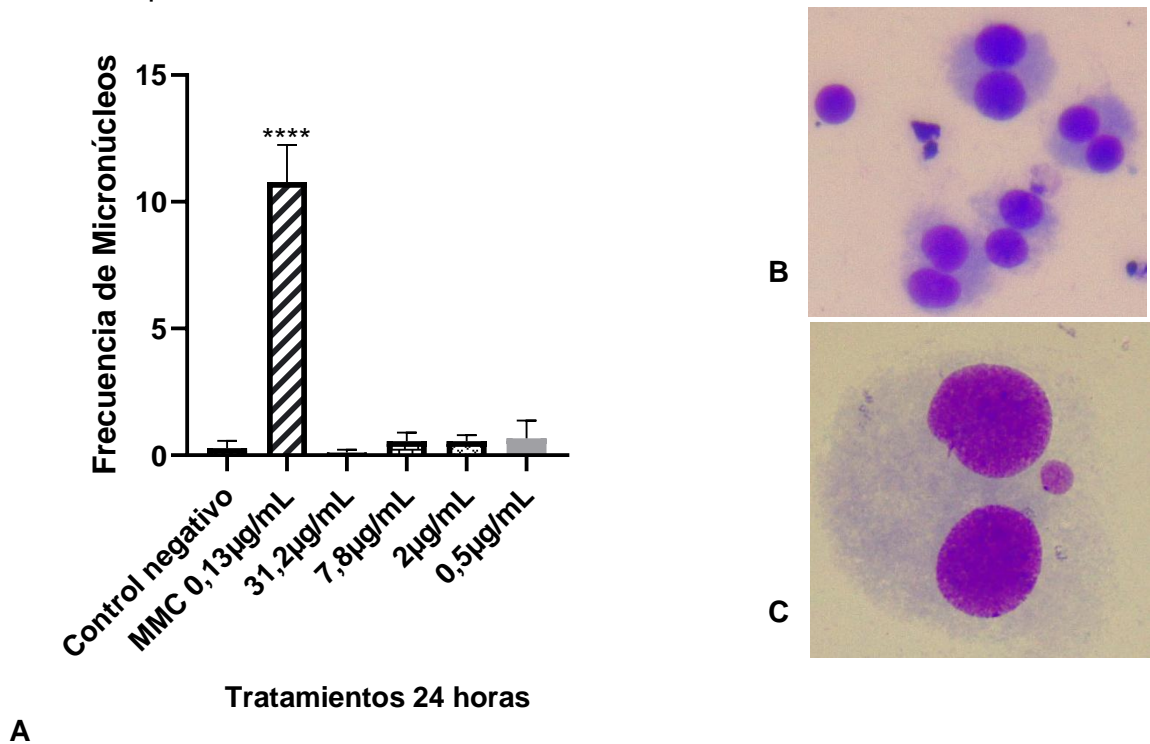
**Figura 11.** Procesos de muerte celular de CMSP expuestas a las NPs-ZnO. Los datos obtenidos se expresan en términos de media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ) y las diferentes condiciones experimentales fueron comparadas con el control negativo mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la Prueba post-hoc de Dunnett.  $p < 0.05^{**}$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ . **A.** Las CMSP tratados con las diferentes concentraciones de NPs-ZnO, evidencian una disminución en la viabilidad celular, evento acompañado de la presencia de células apoptóticas tempranas (Anexina<sup>+</sup> V / 7AAD<sup>-</sup>). **B.** subpoblación de células apoptóticas tardías Anexina<sup>+</sup> V / 7AAD<sup>+</sup>. **C.** subpoblación de células necróticas Anexina<sup>-</sup> V / 7AAD<sup>+</sup>.



## 8.2 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

### 8.2.1 Efecto genotóxico de CMSP tratadas con NPs-ZnO.

La evaluación del daño genotóxico ocasionado por las NPs-ZnO sobre CMSP tratados durante 24 horas, fue determinado mediante la prueba de micronúcleos. Como se muestra en la Figura 10, no hubo diferencia con significancia estadística en la frecuencia de micronúcleos en las células tratadas con las concentraciones de 31,2; 7,8; 2 y 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de NPs-ZnO, considerando la comparación con el control negativo de células no tratadas. Solamente se observaron micronúcleos en el control positivo células tratadas con Mitomicina C.



**Figura 12.** Efecto genotóxico de CMSP tratadas con NPs-ZnO. A. Gráfica representativa del daño genotóxico evaluado mediante la frecuencia de micronúcleos. Los datos obtenidos se expresan en términos de media  $\pm$  E (n = 3), fueron analizados estadísticamente a través de la prueba de ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dunnet. B. Células con apariencia binucleadas por efecto de la citocalasina-B. C. Célula binucleada con un micronúcleo.

## 9. DISCUSIÓN

Existe gran variedad de reportes que han demostrado la utilidad y amplia potencialidad de aplicaciones de diferentes tipos de NPs, con diversos tamaños y formas, así como los efectos negativos que pueden ocasionar al entrar en contacto con varios tipos de células. En general, teniendo en cuenta este comportamiento, se ha propuesto que las NPs pueden ser encapsuladas en vesículas e ingresadas ya sea por mecanismos de transporte activo o pasivo hacia el interior celular. Sin embargo, considerando los diferentes mecanismos a través de los cuales las NPs inducen un efecto al interior de la célula, es necesario tener en cuenta, además, la interacción de éstas con diferentes receptores de membrana puede desencadenar muy diferentes y variadas vías de señalización intracelular (Shang et al., 2014).

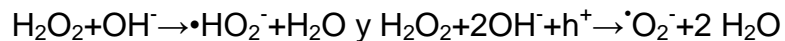
Actualmente se han realizado varios estudios sobre la interacción biológica de las NPs-ZnO con distintos tipos de células entre ellos las CMSP, los cuales describen que estos nanomateriales tienen la capacidad de disminuir la viabilidad celular, dado que NPs con tamaño menor a 100nm tienen la capacidad de ingresar a la célula generando citotoxicidad (Sukhanova et al., 2018). El presente estudio encontró que las NPs-ZnO, con morfología esférica y tamaño de 33,20 nm, ejercen su actividad tóxica sobre CMSP, demostrando una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular a concentraciones de 250, 125 y 62,5 µg/mL después de 24 horas de tratamiento.

De igual manera, el estudio de Sliwinska y colaboradores (2015), reportan que NPs-ZnO con un tamaño medio de partícula de 40nm a concentraciones de 10, 1 y 0.5, µM de NPs-ZnO disminuye significativamente la viabilidad de CMSP después de 24 horas de tratamiento. Adicionalmente, el estudio de Bhattacharya y colaboradores (2014), realizado con NPs-ZnO esféricas con un tamaño de  $30 \pm 10$  nm mostraron una disminución significativa de viabilidad celular de las CMSP expuestas a una concentración mayor a 40 µg/mL. Estos resultados se pueden explicar debido a que las NPs más pequeñas pueden ser más tóxicas que las de mayor tamaño, debido a que poseen un área de superficie alta en relación con su masa total, lo que aumenta la posibilidad de interactuar con biomoléculas circundantes y, como consecuencia, desencadenar respuestas adversas a nivel celular (Rodríguez-Hernández et al., 2018).

De acuerdo a lo reportado en la caracterización fisicoquímica de la nanopartícula usada para el presente estudio, hecha por Benitez-Salazar y colaboradores (2021), el efecto citotóxico ejercido por las nanopartículas sobre las CMSP, se podría explicar considerando las características propias del material, tales como defectos, desorden reticular y áreas ricas en oxígeno en la superficie de estas NPs. Estas características y condiciones de la superficie de las NPs podrían ser responsables de la toxicidad reportada, debido a que, el oxígeno presente en el medio ambiente podría reaccionar con los electrones atrapados en los defectos en

la superficie del ZnO, principalmente vacancias de oxígeno, que propiciaría la formación del radical superoxígeno ( $O_2 + e^- \rightarrow \cdot O_2^-$ ), que en presencia de protones y/o agua, promovería la formación de radicales hidroperoxilo ( $\cdot O_2^- + H^+ \rightarrow \cdot HO_2^-$  y  $\cdot O_2^- + H_2O \rightarrow \cdot HO_2^- + OH^-$ ), los que a su vez a través de diversas reacciones ( $\cdot HO_2^- + H^+ + e^- \rightarrow H_2O_2$  y  $\cdot HO_2^- + \cdot HO_2^- \rightarrow H_2O_2$ ), conducirían a la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y esto podría reaccionar con el radical superoxígeno para formar radicales e iones ( $H_2O_2 + \cdot O_2^- \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$ ).

Por otro lado, los huecos de los electrones, portadores de carga positiva atrapados por los grupos hidroxilo presentes en la superficie de las NPs-ZnO, podrían favorecer el desarrollo de reacciones que, podrían favorecer la producción de ROS, como lo indican las siguientes reacciones:  $H_2O + h^+ \rightarrow \cdot OH + H^+$ ;  $2 H_2O + 2 h^+ \rightarrow H_2O_2 + 2 H^+$  y  $\cdot OH + \cdot OH \rightarrow H_2O_2$ , generando, principalmente, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ) a través de la oxidación del agua presente en el ambiente del ZnO. Adicionalmente, considerando la existencia de grupos hidroxilo ( $OH^-$ ) y el  $H_2O_2$  generados por el desarrollo de reacciones químicas, como las expresadas anteriormente, es posible que también se den las siguientes reacciones:



Dado que los radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el superóxígeno ( $\cdot O_2^-$ ) están cargados negativamente, no podrían penetrar la membrana celular (esta posee una carga negativa), por lo que permanecerían en contacto directo con la superficie externa de las bacterias, y los compuestos tóxicos que penetraría la membrana sería el  $H_2O_2$ , que sería el principal responsable de la muerte de las bacterias reportada (Benitez-Salazar et al., 2021).

Por otro lado, en el estudio de Benitez-Salazar y colaboradores (2021) encontraron que Concentración inhibitoria 50 (IC50) era de 30  $\mu g/mL$  en la cepa de bacterias de *E. coli*. De manera interesante, el presente estudio encontró que la CC50 de estas NPs en CMSP fue de 34  $\mu g/mL$ . Dado que los dos estudios evaluaron la capacidad tóxica de estas NPs y que la síntesis, así como, sus características son de un mismo origen, plantea la posibilidad del uso de estas NPs como un agente antibacterial en modelos biológicos. Puesto que las CMSP son un tipo de células inmunes, que exhiben un gran rango de tolerancia a la toxicidad generada por las NPs-ZnO y/o cualquier agente tóxico, siempre y cuando estos no generen ningún tipo de afectación que comprometa su funcionamiento normal e integridad celular (Hanley et al., 2008; Reddy et al., 2007; Song et al., 2010).

Hasta el momento, con los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las NPs-ZnO interactúa con las CMSP. Así como, se muestra en los ensayos de

Resazurina, método utilizado para determinar la viabilidad y capacidad metabólica mitocondrial de las CMSP tratados con las concentraciones 250; 125 y 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NPs. Esto puede ser explicado, debido a que, las NPs a esas concentraciones puede alterar la fosforilación oxidativa, un proceso en la que una cascada de reacciones redox organizadas en complejos proteicos (I, II, III, IV y V) incrustados en la membrana mitocondrial interna, causan cambios conformacionales en los complejos respiratorios que les permiten bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico conocido como potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ).

En consecuencia, si el potencial transmembrana se afecta por cualquier tipo de daño llevado a cabo en la mitocondria, este activa la vía intrínseca de la apoptosis que repercute directamente en la integridad de la membrana celular, lo que afecta la restructuración de los filamentos del citoesqueleto (Hussain et al., 2005; Reichert & Neupert, 2004; Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017).

Adicionalmente, el presente trabajo encontró que las NPs-ZnO a las concentraciones de 250; 125 y 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  afectaba significativamente ( $p < 0,05$ ) la permeabilidad celular, demostrada mediante el porcentaje de liberación LDH al medio extracelular, el cual corresponde a 83%, 71% y 70% respectivamente. En este sentido Aula y colaboradores (2014) encontraron que las nanoesferas de ZnO con un tamaño de 48nm presentaron una liberación significativa ( $p < 0.005$ ) de LDH a las concentraciones de 50, 20 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por otro lado, el estudio de Shalini y colaboradores (2018), reportaron una disminución de la viabilidad celular de CMSP tratadas con NPs-ZnO esféricas con tamaño de 187nm a las concentraciones de 1000, 500, 200, 100, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sin embargo, no se reportó una la liberación significativa de LDH.

En conclusión, es posible que en el presente trabajo las NPs-ZnO tamaño menor a 100 nm, interactúan con la célula promoviendo una alteración de la membrana celular la cual está relacionada con mecanismos de daño mitocondrial, como lo fue demostrado en el ensayo de Resazurina.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores donde se evidencia una alteración en la funcionalidad de la mitocondria y alteración de la membrana nos plantea la pregunta: ¿es posible que las CMSP expuestos a las diferentes concentraciones de las NPS-ZnO, estén presentado procesos de muerte celular? Para esto se desarrolló la prueba de detección de apoptosis utilizando la citometría de flujo con tinción de FITC Anexina V y 7AAD, con el propósito de identificar la pérdida de señales bioquímicas o la inducción de las mismas como causa de la muerte celular por el efecto de la NPs evaluadas (Ashkenazi & Dixit, 1998; Sebbagh et al., 2001; Suzuki et al., 2014).

El presente estudio demostró que las NPs-ZnO indujeron eventos tempranos de muerte celular en CMSP en todas las concentraciones evaluadas. Así mismo, se observó un incremento significativo ( $p < 0,0001$ ) del porcentaje de células apoptóticas tardías, en las concentraciones de 250; 125; 62,5; 31,2 y 15,6  $\mu\text{g/mL}$ , y un incremento significativo de células necróticas a la concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Este resultado coincide con lo reportado en la literatura, ya que las NPs de menor tamaño tienen la capacidad de interactuar con diferentes organelos como los lisosomas, las mitocondrias, el núcleo celular entre otras, alterando vías metabólicas que pueden desencadenar apoptosis (Medina et al., 2018; B. Wang et al., 2008).

Los resultados en mención, no coinciden con el reportado en el estudio realizado con NPs-ZnO fabricadas comercialmente con un tamaño de  $10 \pm 2$  nm que reporta que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el aumento de CMSP apoptóticas a 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo, si fue encontrado un aumento significativo en la cantidad de células necróticas a las mismas concentraciones después de 24 horas de exposición de las CMSP (Andersson-Willman et al., 2012).

Por último, los resultados obtenidos del ensayo de genotoxicidad a través del biomarcador de Mn en CMSP, se corroboró que aunque las NPs-ZnO son capaces de causar daño citotóxico en células expuestas; estas no llegarían a ocasionar daño de quiebres de cadena sencilla o doble, o problemas en el cinetocoro y el uso mitótico lo que impediría que se realizara correctamente la repartición de cromosomas a los polos opuestos de la célula, ya que se evidenció que los Mn reportados no difirieron estadísticamente de los Mn hallados en las células de control negativo.

Aunque los resultados del presente estudio no muestran genotoxicidad por parte de las NPs-ZnO, otros estudios muestran que este tipo de NPs puede generar Mn. Por ejemplo, el estudio de Gümüs y colaboradores (2014), quienes reportan que la formación de Mn aumentaba significativamente en CMSP tratadas durante un periodo de 48 horas con las concentraciones de 15  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ) y de 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ) de NPs-ZnO (tamaño de partícula 450nm), mostrando incremento del biomarcador dependiente de la concentración. Adicionalmente, en el estudio de otro estudio se indica que las CMSP tratadas con una concentración de 22  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,003$ ) de NPs-ZnO de tamaño de 48nm, mostraron un incremento en la frecuencia de Mn (Aula et al., 2014).

Conforme lo consultado en la literatura y a los resultados obtenidos en el presente estudio es posible inferir que las NPs-ZnO a las concentraciones 250, 125, 62,5 y 31,2  $\mu\text{g/mL}$ , interactúan con la célula afectando procesos metabólicos a nivel de mitocondria, alteración de la permeabilidad celular e inducen apoptosis mostrando

su capacidad citotóxica. Es posible que esta NPs pueda ingresar a la célula ya sea por vía endocítica o en forma de iones libres, y debido a las características del nanomaterial tales como defectos, desorden reticular y áreas ricas en oxígeno en la superficie de estas NPs, así como, la presencia de vacancias favorece el desarrollo de reacciones que permite la generación de ROS (Benitez-Salazar et al., 2021), lo cual podría explicar el efecto citotóxico encontrado en el presente estudio.

Por otro lado, esta NPs no presenta efecto genotóxico, lo que podría sugerir que este tipo de NPs no tienen una interacción directa con el núcleo, por lo tanto, no se altera la estabilidad genómica.

## 10.CONCLUSIONES

Se identificó que la CC50 mediante la cual el 50% de las CMSP tratados con las NPs-ZnO permanece viable es de 34 µg/mL a las 24 horas de exposición.

Las NPs-ZnO obtenidas por el método polimérico de Pechini con morfología esférica, tamaño de 33,20 nm son capaces de inducir daño citotóxico a CMSP tratadas durante 24 horas, disminuyendo significativamente la viabilidad celular y la capacidad metabólica mitocondrial de las células expuestas a concentraciones de 250, 125 y 62,5 µg/mL.

Los resultados demostraron una alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática, liberando el contenido celular al exterior medido evidenciado mediante el incremento significativo del porcentaje de liberación de esta enzima citoplasmática LDH en un 83%, 71% y 70% en CMSP expuestas a concentraciones de 250; 125 y 62,5 µg/mL de NPS-ZnO respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el proceso de muerte celular predominante en CMSP expuestos a concentraciones de 250; 125; 62,5; 31,2 y 15,6 µg/mL de las NPs-ZnO evaluadas, corresponde a la población de células doble positivas (Anexina +/ 7AAD +) o células apoptóticas tardías, por tanto, se puede inferir que la vía por medio de la cual estas NPs en particular causan daño citotóxico a células mononucleares humanas es la vía intrínseca de la apoptosis.

El daño genotóxico cuantificado en las CMSP tratados con las NPs-ZnO sintetizadas, evaluado mediante la presencia de Mn no es significativo, lo que demuestra que no existe una alteración en la estabilidad genómica.

## 11.RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un ensayo de detección de ROS con el fin de determinar si las causantes del daño mitocondrial y aumento en la permeabilidad de la membrana registrado en el presente estudio, puede atribuirse a la generación de especies reactivas de oxígeno generadas como parte del contacto de las NPs-ZnO e ingreso de las mismas a la célula.

Realizar un ensayo de detección de la actividad de la Caspasa-3 mediante el uso de kit PhiPhiLux G1D2 por citometría de flujo, un sustrato que puede penetrar la membrana plasmática se convierte en su forma fluorescente dejando en evidencia el inicio del proceso de muerte celular causada por la disolución de las NPs-ZnO y la acumulación mitocondrial de iones  $Zn^{+2}$ .

Realizar un análisis de cuantificación de NPs-ZnO intracelular mediante granulometría y microscopía electrónica.

Analizar el efecto modulador de los genes del metabolismo Glutación S-Transferasa, como genes importantes en el proceso de captación y detoxificación de metabolitos tóxicos del organismo, sobre la expresión del efecto tóxico inducido por las NPs-ZnO sobre CMSP.

## 12.BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, H., Venkat Kumar, S., & Rajeshkumar, S. (2017). A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.03.002>
- Andersson-Willman, B., Gehrman, U., Cansu, Z., Buerki-Thurnherr, T., Krug, H. F., Gabrielsson, S., & Scheynius, A. (2012). Effects of subtoxic concentrations of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on human lymphocytes, dendritic cells and exosome production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(1), 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.021>
- Andre Nel, Tian Xia, Lutz Madler, N. L. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311(3), 622–627. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1053560>
- Arciniegas-Grijalba, P. A., Patiño-Portela, M. C., Mosquera-Sánchez, L. P., Guerra Sierra, B. E., Muñoz-Florez, J. E., Erazo-Castillo, L. A., & Rodríguez-Páez, J. E. (2019). ZnO-based nanofungicides: Synthesis, characterization and their effect on the coffee fungi *Mycena citricolor* and *Colletotrichum* sp. *Materials Science and Engineering C*, 98(July 2018), 808–825. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.031>
- Asharani, P. V., Low, G., Mun, K., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver. *ACS Nano*, 3(2), 279–290.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305–1308. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Ashokkumar, M., & Muthusamy, C. (2022). Role of ionic radii and electronegativity of co-dopants (Co, Ni and Cr) on properties of Cu doped ZnO and evaluation of In-vitro cytotoxicity. *Surfaces and Interfaces*, 30(February), 101968. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.101968>
- Au, W. W., Walker, D. M., Ward Jr, J. B., Whorton, E., Legator, M. S., & Singh, V. (1991). Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(2), 137–144.
- Aula, S., Lakkireddy, S., Swamy, A. V. N., Kapley, A., Jamil, K., Tata, N. R., & Hembram, K. (2014). Biological interactions in vitro of zinc oxide nanoparticles of different characteristics. *Materials Research Express*, 1(3), 0–23. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/1/3/035041>
- Ávila, H., Cruz, a M., Villegas, M., Caballero, a C., & Rodríguez-Páez, J. E. (2004). *Cerámica y Vidrio Estudio comparativo de dos metodos de sintesis para la. 744*, 0–4.
- Babele, P. K., Thakre, P. K., Kumawat, R., & Tomar, R. S. (2018). Zinc oxide



- nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere*, 213, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.028>
- Bazhukova, I., Zvonareva, I., Myshkina, A., & Bazhukov, S. (2019). *Ilya GAVRILOV*, 2 *Viktor MESCHANINOV*. 348–352.
- Belinsky, M., & Jaiswal, A. K. (1993). NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer and Metastasis Reviews*, 12(2), 103–117. <https://doi.org/10.1007/BF00689804>
- Benítez-Salazar, M. I; Dueñas, R. A; Niño, V. E; Caldas, L; Rodríguez Páez, J. E. (2020). Nanobactericida con base en nanopartículas de ZnO : Efecto sobre cepas modelo de *Escherichia coli*. *X International Materials Congress CIM-2019*, 114, 2015.
- Benitez-Salazar, M. I., Niño-Castaño, V. E., Dueñas-Cuellar, R. A., Caldas-Arias, L., Fernández, I., & Rodríguez-Páez, J. E. (2021a). Chemical synthesis versus green synthesis to obtain ZnO powders: Evaluation of the antibacterial capacity of the nanoparticles obtained by the chemical method. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106544>
- Benitez-Salazar, M. I., Niño-Castaño, V. E., Dueñas-Cuellar, R. A., Caldas-Arias, L., Fernández, I., & Rodríguez-Páez, J. E. (2021b). Chemical synthesis versus green synthesis to obtain ZnO powders: Evaluation of the antibacterial capacity of the nanoparticles obtained by the chemical method. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6), 106544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106544>
- Bhattacharya, D., Santra, C. R., Ghosh, A. N., & Karmakar, P. (2014). Differential toxicity of rod and spherical zinc oxide nanoparticles on human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(4), 707–716. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1744>
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., & Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93–100. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq075>
- Branica, G., Mladinić, M., Omanović, D., & Želježić, D. (2016). An alternative approach to studying the effects of ZnO nanoparticles in cultured human lymphocytes: Combining electrochemistry and genotoxicity tests. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 67(4), 277–288. <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2910>
- Camacho, Á., Duarte, Á., Dubay, D., Forero, E., González, E., Jaramillo, F., Maldonado, C., Montoya, J., Obregon, N., Osma, J., Sierra, C., & Urquijo, W.

- (2016). Definição de nanomateriais para a Colômbia. *Revista Colombiana de Química*, 45(1), 15–20. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n1.58955>
- Champion, J. A., & Mitragotri, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 4930–4934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600997103>
- Cioffi, N., & Rai, M. (2012). *Nano-antimicrobials: progress and prospects*. Springer Science & Business Media.
- Condello, M., De Berardis, B., Ammendolia, M. G., Barone, F., Condello, G., Degan, P., & Meschini, S. (2016). ZnO nanoparticle tracking from uptake to genotoxic damage in human colon carcinoma cells. *Toxicology in Vitro*, 35, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.06.005>
- Curylofo-Zotti, F. A., Tedesco, A. C., Lizarelli, G. T. C., Takahashi, L. A. U., & Corona, S. A. M. (2021). Effect of green tea-loaded chitosan nanoparticles on leathery dentin microhardness. *Odontology*, 109(4), 860–867. <https://doi.org/10.1007/s10266-021-00611-6>
- Deng, X., Luan, Q., Chen, W., Wang, Y., Wu, M., Zhang, H., & Jiao, Z. (2009). Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology*, 20(11), 115101.
- Doria, J., Mera, J., Córdoba, C., Paredes, O., Gómez, A., Paucar, C., & Morán, O. (2011). Absence Of Ferromagnetism In Mn Substituted Polycrystalline ZnO Multilayers Synthetized By Polymeric Precursor Method. *Revista Colombiana de Física*, 43(3), 821.
- Dusinska, M., & Collins, A. R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3), 191–205. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen007>
- Dusinska, M., Tulinska, J., El Yamani, N., Kuricova, M., Liskova, A., Rollerova, E., Rundén-Pran, E., & Smolkova, B. (2017). Immunotoxicity, genotoxicity and epigenetic toxicity of nanomaterials: New strategies for toxicity testing? *Food and Chemical Toxicology*, 109, 797–811. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.030>
- Eastlake, A., Zumwalde, R., & Geraci, C. (2016). Can control banding be useful for the safe handling of nanomaterials? A systematic review. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(6), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3476-0>
- Efthimiou, I., Georgiou, Y., Vlastos, D., Dailianis, S., & Deligiannakis, Y. (2020). Assessing the cyto-genotoxic potential of model zinc oxide nanoparticles in the presence of humic-acid-like-polycondensate (HALP) and the leonardite HA (LHA). *Science of the Total Environment*, 721, 137625. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137625>

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Erazo, A., Mosquera, S. A., & Rodríguez-Paéz, J. E. (2019). Synthesis of ZnO nanoparticles with different morphology: Study of their antifungal effect on strains of *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea*. *Materials Chemistry and Physics*, 234(July), 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.05.075>
- Ershova, E. S., Sergeeva, V. A., Chausheva, A. I., Zheglo, D. G., Nikitina, V. A., Smirnova, T. D., Kameneva, L. V., Porokhovnik, L. N., Kutsev, S. I., Troshin, P. A., Voronov, I. I., Khakina, E. A., Veiko, N. N., & Kostyuk, S. V. (2016). Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 805, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.05.004>
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455(1–2), 81–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911968>
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, 600(1–2), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028>
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Fenech, M, Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534(1–2), 65–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504755>
- Fenech, Michael, Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A. T., & Kirsch-volders, M. (2016). Mutation Research / Reviews in Mutation Research Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.008>
- Foladori, G. (2016). Políticas Públicas En Nanotecnología En América Latina. *Problemas Del Desarrollo*, 47(186), 59–81. <https://doi.org/10.1016/j.rpd.2016.03.002>
- Fu, J., Zeng, X., & He, N. (2017). Comparative cytotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles in human prostate cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(1), 196–202. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.12444>

- Gautam, A., Komal, P., Gautam, P., Sharma, A., Kumar, N., & Jung, J. P. (2021). Recent trends in noble metal nanoparticles for colorimetric chemical sensing and micro-electronic packaging applications. *Metals*, *11*(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/met11020329>
- Geng, J., Song, X., Zhang, X., Tie, S., Cao, L., & Tan, M. (2019). Hydrophilic Food-Borne Nanoparticles from Beef Broth as Novel Nanocarriers for Zinc [Research-article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*, 6995–7004. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01372>
- Ghosh, M., Jana, A., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A., Chakraborty, A., Mukherjee, A., & Mukherjee, A. (2016). Effects of ZnO nanoparticles in plants: Cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *807*, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.07.006>
- Ghosh, M., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Jana, A., Nag, A., & Mukherjee, A. (2016). Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells in vitro and Swiss albino male mice in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, *97*, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.025>
- Guerrero, V., Rivas, J., Rosas, N., & Valdivieso, C. (2013). Obtención de nanopartículas de óxidos de cinc y circonio por el método de Pechini. *VIII Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE*.
- Gümüs, Duy gu; Berber, A. A., & Kezban Ada, Aksoy; Seyin, H. (2014). In vitro genotoxic effects of ZnO nanomaterials in human peripheral lymphocytes. *Cytotechnology*, *66*, 317–325. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9575-1>
- H. Müller, K., Kulkarni, J., Motskin, M., Goode, A., Winship, P., Skepper, J. N., Ryan, M. P., & Porter, A. E. (2010). PH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution. *ACS Nano*, *4*(11), 6767–6779. <https://doi.org/10.1021/nn101192z>
- Hanley, C., Layne, J., Punnoose, A., Reddy, K. M., Coombs, I., Coombs, A., Feris, K., & Wingett, D. (2008). Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology*, *19*(29), 295103.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., & Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, *659*(1–2), 93–108. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>
- Huang, S., Chueh, P. J., Lin, Y. W., Shih, T. S., & Chuang, S. M. (2009). Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO<sub>2</sub> long-term exposure. *Toxicology and*

- Hudecová, A., Kuzsnierewicz, B., Rundén-Pran, E., Magdolenová, Z., Hašplová, K., Rinna, A., Fjellsbo, L. M., Kruszewski, M., Lankoff, A., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Skuland, T., Schwarze, P., Brunborg, G., Bjoras, M., Collins, A., Miadoková, E., Gálová, E., & Dušinská, M. (2012). Silver nanoparticles induce premutagenic DNA oxidation that can be prevented by phytochemicals from *Gentiana asclepiadea*. *Mutagenesis*, 27(6), 759–769. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges046>
- Hühn, D., Kantner, K., Geidel, C., Brandholt, S., De Cock, I., Soenen, S. J., Rivera Gil, P., Montenegro, J. M., Braeckmans, K., & Müllen, K. (2013). *Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: focusing on the sign of the net charge*. *ACS Nano* 7: 3253–3263.
- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., & Schlager, J. J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*, 19(7), 975–983.
- Iavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D. H., & Shvedova, A. A. (2017). Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 96–111. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.025>
- Invernizzi, N., Hubert, M., & Vinck, D. (2014). 11 Nanoscience and Nanotechnology: How an Emerging Area on the Scientific Agenda of the Core Countries Has Been Adopted and Transformed in Latin America. *Beyond Imported Magic: Essays on Science, Technology, and Society in Latin America*, 225.
- Izak-Nau, E., Huk, A., Reidy, B., Uggerud, H., Vadset, M., Eiden, S., Voetz, M., Himly, M., Duschl, A., Dusinska, M., & Lynch, I. (2015). Impact of storage conditions and storage time on silver nanoparticles' physicochemical properties and implications for their biological effects. *RSC Advances*, 5(102), 84172–84185. <https://doi.org/10.1039/c5ra10187e>
- Kao, Y. Y., Chiung, Y. M., Chen, Y. C., Cheng, T. J., & Liu, P. S. (2012). Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicological Sciences*, 125(2), 462–472. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr319>
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., & Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(6). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
- Khanna, P., Ong, C., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). Nanotoxicity: An interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials*, 5(3), 1163–1180. <https://doi.org/10.3390/nano5031163>

- Kirsch-volders, M., Bonassi, S., Knasmueller, S., Holland, N., Bolognesi, C., & Fenech, M. F. (2014). Mutation Research / Reviews in Mutation Research Commentary: Critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemical. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 759, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.12.001>
- Kirsch-Volders, M., Fenech, M., & Bolognesi, C. (2018). Validity of the Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (L-CBMN) as biomarker for human exposure to chemicals with different modes of action: A synthesis of systematic reviews. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.010>
- Koopman, G., Primate, B., & Reutelingsperger, C. (1994). *Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cell undergoing apoptosis ... Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine exp. October.*
- Kreft, S., & Kreft, M. (2009). Quantification of dichromatism: a characteristic of color in transparent materials. *Journal of the Optical Society of America A*, 26(7), 1576. <https://doi.org/10.1364/josaa.26.001576>
- Kumar, A., Choudhary, P., Kumar, A., Camargo, P. H. C., & Krishnan, V. (2022). Recent Advances in Plasmonic Photocatalysis Based on TiO<sub>2</sub> and Noble Metal Nanoparticles for Energy Conversion, Environmental Remediation, and Organic Synthesis. *Small*, 18(1). <https://doi.org/10.1002/smll.202101638>
- Lai, X., Wei, Y., Zhao, H., Chen, S., Bu, X., Lu, F., Qu, D., Yao, L., Zheng, J., & Zhang, J. (2015). The effect of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ZnO nanoparticles on cytotoxicity and glucose metabolism in lung epithelial cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(6), 651–664. <https://doi.org/10.1002/jat.3128>
- Lambin, P., Lieveise, R. I. Y., Eckert, F., Marcus, D., Oberije, C., van der Wiel, A. M. A., Guha, C., Dubois, L. J., & Deasy, J. O. (2020). Lymphocyte-Sparing Radiotherapy: The Rationale for Protecting Lymphocyte-rich Organs When Combining Radiotherapy With Immunotherapy. *Seminars in Radiation Oncology*, 30(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2019.12.003>
- Lankoff, A., Arabski, M., Wegierek-Ciuk, A., Kruszewski, M., Lisowska, H., Banasik-Nowak, A., Rozga-Wijas, K., Wojewodzka, M., & Slomkowski, S. (2013). Effect of surface modification of silica nanoparticles on toxicity and cellular uptake by human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Nanotoxicology*, 7(3), 235–250. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.649796>

- Li, L. Z., Zhou, D. M., Peijnenburg, W. J. G. M., van Gestel, C. A. M., Jin, S. Y., Wang, Y. J., & Wang, P. (2011). Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International*, 37(6), 1098–1104. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.01.008>
- Liu, J., Kang, Y., Zheng, W., Song, B., Wei, L., Chen, L., & Shao, L. (2017). Ion-shedding zinc oxide nanoparticles induce microglial BV2 cell proliferation via the ERK and Akt signaling pathways. *Toxicological Sciences*, 156(1), 167–178. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw241>
- López, C., & Rodríguez-Páez, J. E. (2017). Synthesis and characterization of ZnO nanoparticles: effect of solvent and antifungal capacity of NPs obtained in ethylene glycol. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 123(12), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00339-017-1339-x>
- Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: From genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, 4(JUL), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., & Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233–278. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464>
- Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M., & Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192(1), 3–16.
- Márquez, I. G., Ghiyasvand, M., Massarsky, A., Babu, M., Samanfar, B., Omid, K., Moon, T. W., Smith, M. L., & Golshani, A. (2018). Zinc oxide and silver nanoparticles toxicity in the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 13(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193111>
- Medina, Miguel; Galván, Luis; Reyes, R. (2015). LAS NANOPARTÍCULAS Y EL MEDIO AMBIENTE. *Universidad Ciencia y Tecnología*, 19(74), 49–58.
- Medina, J., Bolaños, H., Mosquera-Sanchez, L. P., & Rodríguez-Paez, J. E. (2018). Controlled synthesis of ZnO nanoparticles and evaluation of their toxicity in *Mus musculus* mice. *International Nano Letters*, 8(3), 165–179. <https://doi.org/10.1007/s40089-018-0242-6>
- Meers, P., & Mealy, T. (1993). Calcium-Dependent Annexin V Binding to Phospholipids: Stoichiometry, Specificity, and the Role of Negative Charge. *Biochemistry*, 32(43), 11711–11721. <https://doi.org/10.1021/bi00094a030>
- Michaël Sebbagh, Claire Renvoizé, Jocelyne Hamelin, Nicole Riché, J. B. and J. B. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and. *Macmillan Magazines Ltd*, 34(2), 346–352. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.34.1148>

- Mihai, C., Chrisler, W. B., Xie, Y., Hu, D., Szymanski, C. J., Tolic, A., Klein, J. A., Smith, J. N., Tarasevich, B. J., & Orr, G. (2015). Intracellular accumulation dynamics and fate of zinc ions in alveolar epithelial cells exposed to airborne ZnO nanoparticles at the air-liquid interface. *Nanotoxicology*, 9(1), 9–22. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.859319>
- Mittal, S., & Pandey, A. K. (2014). Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: Role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/891934>
- Mohammadinejad, R., Moosavi, M. A., Tavakol, S., Vardar, D. Ö., Hosseini, A., Rahmati, M., Dini, L., Hussain, S., Mandegary, A., & Klionsky, D. J. (2019). Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy*, 15(1), 4–33. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1509171>
- Mosquera-Sánchez, L. P., Arciniegas-Grijalba, P. A., Patiño-Portela, M. C., Guerra-Sierra, B. E., Muñoz-Florez, J. E., & Rodríguez-Páez, J. E. (2020). Antifungal effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on *Colletotrichum* sp., causal agent of anthracnose in coffee crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101579>
- Mosquera, A., Varela, J. A., Caballero, A. C., & Rodríguez-Paéz, J. E. (2008). Cerámica y Vidrio. *Boletín de La Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*, 53(2), 24–28.
- Musarrat, J., Saquib, Q., Azam, A., & Naqvi, S. A. H. (2009). Zinc oxide nanoparticles-induced DNA damage in human lymphocytes. *International Journal of Nanoparticles*, 2(1–6), 402–415. <https://doi.org/10.1504/ijnp.2009.028775>
- Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. *Annual Review of Immunology*, 23, 853–875. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115811>
- Nersesyan, A., Fenech, M., Bolognesi, C., Mi????k, M., Setayesh, T., Wultsch, G., Bonassi, S., Thomas, P., & Knasm??ller, S. (2016). Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 770, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.05.003>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Sefa. *European Journal of Biochemistry*, 5426(267), 5421–5426.
- OECD. (2014). *Genotoxicity of manufactured nanomaterials : report of the OECD expert meeting*. 43, 1–37.
- OECD. (2018). *Evaluation of in vitro methods for human hazard assessment*



*applied in the OECD Testing Programme for the Safety of Manufactured Nanomaterials*. 36, 93.

- Oostingh, G. J., Casals, E., Italiani, P., Colognato, R., Stritzinger, R., Ponti, J., Pfaller, T., Kohl, Y., Ooms, D., Favilli, F., Leppens, H., Lucchesi, D., Rossi, F., Nelissen, I., Thielecke, H., Puentes, V. F., Duschl, A., & Boraschi, D. (2011). Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Particle and Fibre Toxicology*, 8, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-8>
- Osmond, M. J., & McCall, M. J. (2010). Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology*, 4(1), 15–41. <https://doi.org/10.3109/17435390903502028>
- Ostrovsky, S., Kazimirsky, G., Gedanken, A., & Brodie, C. (2009). Selective cytotoxic effect of ZnO nanoparticles on glioma cells. *Nano Research*, 2(11), 882–890. <https://doi.org/10.1007/s12274-009-9089-5>
- Page, B., Page, M., & Noel, C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *International Journal of Oncology*, 3(3), 473–476. <https://doi.org/10.3892/ijo.3.3.473>
- Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., & Bolzinger, M. A. (2014). The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457(1), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.057>
- Patiño-Portela, M. C., Arciniegas-Grijalba, P. A., Mosquera-Sánchez, L. P., Sierra, B. E. G., Muñoz-Florez, J. E., Erazo-Castillo, L. A., & Rodríguez-Páez, J. E. (2021). Effect of method of synthesis on antifungal ability of ZnO nanoparticles: Chemical route vs green route. *Advances in Nano Research*, 10(2), 1–21. <https://doi.org/10.12989/anr.2021.10.2.191>
- Peñaloza, Juan Pablo; Urrejola, Madelein C.; Soto, Liliam V.; Zumarán, C. C. ., & Álvarez, Beatriz; Fuentevilla, Ignacio; Haidar, Z. S. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura , Métodos de Elaboración , Características , Propiedades , Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa ( Layer-by-Layer Self-Assembly ). *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463–1471.
- Peng, X., Palma, S., Fisher, N. S., & Wong, S. S. (2011). Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquatic Toxicology*, 102(3–4), 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.014>
- Philpott, N. J., Turner, A. J. C., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J. C. W., Gordon-Smith, E. C., Dalglish, A. G., & Gibson, F. M. (1996). The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: Simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*, 87(6), 2244–2251.

- Pratap, D., & Soni, S. (2021). Review on the Optical Properties of Nanoparticle Aggregates Towards the Therapeutic Applications. *Plasmonics*, 16(5), 1495–1513. <https://doi.org/10.1007/s11468-021-01443-4>
- Puente-Urbina, B. A., García-Cerda, L. A., De León-Quiroz, E. L., & López-Martínez, M. G. (2012). Nanopartículas de Ni/NiO y Cu-Ag obtenidas mediante el método de Pechini: Síntesis y caracterización. *Superficies y Vacío*, 25(3), 183–187.
- Rahman, S. (2016). *FILLING OF CARBON NANO-TUBES WITH NANO ACTIVE METAL SPECIES AND THEIR STUDIES ON THE PHYSICO-CHEMICAL BEHAVIORS*. October.
- Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C., & Punnoose, A. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*, 90(21), 10–13. <https://doi.org/10.1063/1.2742324>
- Reichert, A. S., & Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends in Genetics*, 20(11), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.08.012>
- Rodriguez-Hernandez, A. G., Aguilar Guzmán, J. C., & Vázquez-Duhalt, R. (2018). Membrana celular y la inespecificidad de las nanopartículas. ¿Hasta dónde puede llegar un nanomaterial dentro de la célula? *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 11(20), 43. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.20.62711>
- Rueda, P. E., Rueda, J. E., & Villamizar, R. A. (2022). Optical Kerr detection in nanofluids based on Ag nanoparticles obtained by biosynthesis with endophytic fungi from the cocoa pod husk. *Optica Pura y Aplicada*, 55(1), 3025–3029. <https://doi.org/10.7149/OPA.55.1.51064>
- Sabella, S., Carney, R. P., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Al-Juffali, N., Vecchio, G., Janes, S. M., Bakr, O. M., Cingolani, R., Stellacci, F., & Pompa, P. P. (2014). A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*, 6(12), 7052–7061. <https://doi.org/10.1039/c4nr01234h>
- Sabir, S., Arshad, M., & Chaudhari, S. K. (2014). *Zinc Oxide Nanoparticles for Revolutionizing Agriculture : Synthesis and Applications*. 2014.
- Salas, G., Rosas, N., Galeas, S., Guerrero, V., & Debut, A. (2016). Síntesis de Nanopartículas de ZnO por el Método de Pechini ZnO Nanoparticles Synthesis by Pechini Method. *Revista Politécnica*, 38(1), 43–47.
- Saliani, M., Jalal, R., & Goharshadi, E. K. (2016). Mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells. *Nanomedicine Journal*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.7508/nmj.2016.01.001>

- Sanità, G., Carrese, B., & Lamberti, A. (2020). Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(November). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587012>
- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B., Oh, E., Stewart, M. H., Medintz, I. L., & Spring, S. (2013). *Supporting Information Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology Division of Biology Office of Science and Engineering Laboratories Center for Bio / Molecular Science and Engineering Co.* 1–11.
- Scherzad, A., Meyer, T., Kleinsasser, N., & Hackenberg, S. (2017). Molecular mechanisms of Zinc oxide Nanoparticle-induced genotoxicity short running title: Genotoxicity of ZnO NPs. *Materials*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/ma10121427>
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1), 9–15.
- Seaton, A., Tran, L., Aitken, R., & Donaldson, K. (2010). Nanoparticles, human health hazard and regulation. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0252.focus>
- Serpone, N., Dondi, D., & Albin, A. (2007). Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and skincare products. *Inorganica Chimica Acta*, 360(3), 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>
- Setyawati, M. I., Yuan, X., Xie, J., & Leong, D. T. (2014). The influence of lysosomal stability of silver nanomaterials on their toxicity to human cells. *Biomaterials*, 35(25), 6707–6715. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.007>
- Shabbir, S., Kulyar, M. F. e. A., Bhutta, Z. A., Boruah, P., & Asif, M. (2021). Toxicological Consequences of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO<sub>2</sub>NPs) and Their Jeopardy to Human Population. *BioNanoScience*, 11(2), 621–632. <https://doi.org/10.1007/s12668-021-00836-3>
- Shah, P., Kaushik, A., Zhu, X., Zhang, C., & Li, C. Z. (2014). Chip based single cell analysis for nanotoxicity assessment. *Analyst*, 139(9), 2088–2098. <https://doi.org/10.1039/c3an02280c>
- Shalini, D., Senthilkumar, S., & Rajaguru, P. (2018). Effect of size and shape on toxicity of zinc oxide (ZnO) nanomaterials in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 28(2), 87–94. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1366609>
- Shang, Li, Nienhaus Karin & Ulrich, N. G. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, 4(1–3), 13–

20. <https://doi.org/10.1007/s12645-013-0033-8>

- Sharma, V., Anderson, D., & Dhawan, A. (2012). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, 17(8), 852–870. <https://doi.org/10.1007/s10495-012-0705-6>
- Shoeb, E., Badar, U., Venkataraman, S., & Hefferon, K. (2021). Frontiers in bioengineering and biotechnology: Plant nanoparticles for anti-cancer therapy. *Vaccines*, 9(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080830>
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffeis, T. G. G., Wright, C. J., & Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23–24), 3891–3914.
- Singh, S. (2019). Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(4), 300–311. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1553221>
- Sliwinska, A., Kwiatkowski, D., Czarny, P., Milczarek, J., Toma, M., Korycinska, A., Szemraj, J., & Sliwinski, T. (2015). Genotoxicity and cytotoxicity of ZnO and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(3), 176–183. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1006509>
- Soenen, S. J., Parak, W. J., Rejman, J., & Manshian, B. (2015). (Intra)cellular stability of inorganic nanoparticles: Effects on cytotoxicity, particle functionality, and biomedical applications. *Chemical Reviews*, 115(5), 2109–2135. <https://doi.org/10.1021/cr400714j>
- Song, W., Zhang, J., Guo, J., Zhang, J., Ding, F., Li, L., & Sun, Z. (2010). Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology Letters*, 199(3), 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.10.003>
- Stueber, D. D., Villanova, J., Aponte, I., Xiao, Z., & Colvin, V. L. (2021). Magnetic nanoparticles in biology and medicine: Past, present, and future trends. *Pharmaceutics*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070943>
- Sucomel, P., Kvitek, L., Pucek, R., Panacek, A., Halder, A., Vajda, S., & Zboril, R. (2018). Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22976-5>
- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., & Nabiev, I. (2018). Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*, 13. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>

- Suzuki, J., Imanishi, E., & Nagata, S. (2014). Exposure of phosphatidylserine by Xkrelated protein family members during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(44), 30257–30267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583419>
- Toapanta-ramos, F., Lobato-campoverde, A., Quitiaquez, W., Hernández-Revelo, L., & Sánchez, V. (2020). Estudio numérico comparativo de la conductividad térmica del refrigerante R600a con nanopartículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y CuO. *Energies*, 85(4), 16–30.
- Torres-Bugarín, O., Romero, N. M., Ibarra, M. L. R., Flores-García, A., Aburto, P. V., & Zavala-Cerna, M. G. (2015). Genotoxic Effect in Autoimmune Diseases Evaluated by the Micronucleus Test Assay: Our Experience and Literature Review. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/194031>
- Trudeau, V. L., Metcalfe, C. D., Mimeault, C., & Moon, T. W. (2005). Chapter 17 Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish? *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 6(C), 475–493. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(05\)80020-7](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(05)80020-7)
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., & Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>
- Wang, B., Wang, Y., Feng, W., Zhu, M., Wang, M., Ouyang, H., Wang, H., Li, M., Zhao, Y., & Chai, Z. (2008). Trace metal disturbance in mice brain after intranasal exposure of nano- and submicron-sized Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. *Chemia Analytica*, 53(6), 927–942.
- Wang, J., Lee, J. S., Kim, D., & Zhu, L. (2017). Exploration of Zinc Oxide Nanoparticles as a Multitarget and Multifunctional Anticancer Nanomedicine. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(46), 39971–39984.
- Xin, X., Huang, G., & Zhang, B. (2021). Review of aquatic toxicity of pharmaceuticals and personal care products to algae. *Journal of Hazardous Materials*, 410(August 2020), 124619. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124619>
- Yafout, M., Ousaid, A., Khayati, Y., & El Otmani, I. S. (2021). Gold nanoparticles as a drug delivery system for standard chemotherapeutics: A new lead for targeted pharmacological cancer treatments. *Scientific African*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00685>
- Yao, K., Youn, H., Gao, X., Huang, B., Zhou, F., Li, B., & Han, H. (2012). Casein kinase 2 inhibition attenuates androgen receptor function and cell proliferation in prostate cancer cells. *Prostate*, 72(13), 1423–1430. <https://doi.org/10.1002/pros.22493>

- Zafon, C., & Obiols, G. (2009). Vía de señalización dependiente de la proteincinasa de activación mitogénica en el carcinoma papilar de tiroides. De las bases moleculares a la práctica clínica. *Endocrinología y Nutrición*, *56*(4), 176–186. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)70982-9](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)70982-9)
- Zembruski, N. C. L., Stache, V., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, *429*(1), 79–81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>
- Zeng, K., Li, J., Zhang, Z., Yan, M., Liao, Y., Zhang, X., & Zhao, C. (2015). Lipid-coated ZnO nanoparticles as lymphatic-targeted drug carriers: study on cell-specific toxicity in vitro and lymphatic targeting in vivo. *Journal of Materials Chemistry B*, *3*(26), 5249–5260. <https://doi.org/10.1039/c5tb00486a>
- Zhang, W., Bao, S., & Fang, T. (2016). The neglected nano-specific toxicity of ZnO nanoparticles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, *6*(April), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep24839>
- Zhao, X., Ng, S., Heng, B. C., Guo, J., Ma, L., Tan, T. T. Y., Ng, K. W., & Loo, S. C. J. (2013). Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Archives of Toxicology*, *87*(6), 1037–1052. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0827-1>
- Zhou, J., Lu, Z., Zhu, X., Wang, X., Liao, Y., Ma, Z., & Li, F. (2013). NIR photothermal therapy using polyaniline nanoparticles. *Biomaterials*, *34*(37), 9584–9592.