

TOXICIDAD CELULAR INDUCIDA POR NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS METÁLICOS EN CÉLULAS NEURONALES HUMANAS

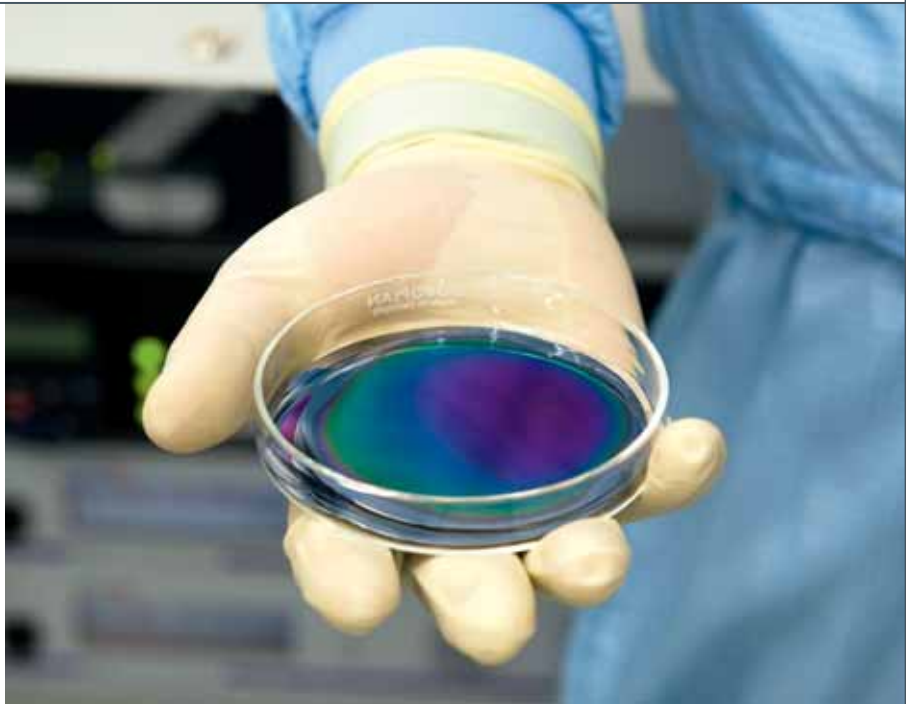
# *Daño al sistema nervioso inducido por* **NANOPARTÍCULAS**

Las nanopartículas (NP) de óxidos metálicos, como el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y el óxido de zinc ( $\text{ZnO}$ ), se utilizan en una gran variedad de aplicaciones industriales y médicas, incluyendo materiales de alta tecnología, plásticos, pinturas, implantes ortopédicos artificiales, derivados de papel, cosméticos y protectores solares. Los estudios sobre los efectos de estas NP en el sistema nervioso son muy escasos. El objetivo de este trabajo consiste en caracterizar tres NP de óxidos metálicos (una de  $\text{ZnO}$  y dos de  $\text{TiO}_2$ ) y evaluar sus posibles efectos sobre las células neuronales SHSY5Y de neuroblastoma humano, tratadas con diferentes concentraciones y durante diversos tiempos de exposición. Los resultados mostraron que el comportamiento de los dos tipos de NP de  $\text{TiO}_2$  es comparable, pese a su diferente composición cristalina. Este trabajo contribuye a incrementar el conocimiento acerca del impacto de las NP de óxidos metálicos sobre la salud humana en general y sobre el sistema nervioso de forma más específica.

Por **B. LAFFON LAGE**. Doctora en Farmacia. Profesora titular de Psicobiología de la Universidad de A Coruña (España) (Unidad de Toxicología, Universidad de A Coruña, e-mail: blaffon@udc.es). **V. VALDIGLESIAS GARCÍA**. Doctora en Biología. Investigadora del Instituto IRCCS San Raffaele Pisana, Roma (Italia). **C.S. TRINIDADE DA COSTA**. Doctora en Ciencias Biomédicas. Investigadora del Instituto Nacional de Salud Dr. Ricardo Jorge, Oporto (Portugal). **G. KILIÇ**. Máster en Biología Molecular, Celular y Genética. Estudiante de doctorado en la Universidad de A Coruña (España). **S.C. BASTOS DA COSTA**. Máster en Salud Ambiental. Estudiante de doctorado en el Instituto Nacional de Salud Dr. Ricardo Jorge, Oporto (Portugal). **J.P. FERNANDES TEIXEIRA**. Doctor en Ciencias Biomédicas. Director del Departamento de Salud Ambiental del Instituto Nacional de Salud Dr. Ricardo Jorge, Oporto (Portugal). **E. PÁSARO MÉNDEZ**. Doctor en Biología. Catedrático de Psicobiología de la Universidad de A Coruña (España).



Las nanopartículas (NP) son en la actualidad uno de los grandes protagonistas, desde un punto de vista industrial y comercial, de la nanotecnología. La principal ventaja que presentan es que se pueden fabricar a partir de casi todas las sustancias sólidas que se manejan habitualmente en los laboratorios, proporcionando un catálogo amplísimo de nanoobjetos con nuevas propiedades diferentes a las del material de partida. Estas propiedades pueden ser modificadas mediante el control de su tamaño y forma en un rango de 5-100 nm <sup>[1]</sup>.



Latinstock



Latinstock

## El objetivo de este trabajo ha consistido en la caracterización de dos NP de $\text{TiO}_2$ y una de $\text{ZnO}$ , y en la evaluación de sus posibles efectos sobre células neuronales

Actualmente se conocen más de un millar de productos de uso cotidiano que ya tienen NP incorporadas en su composición, entre los que se incluyen cremas de protección solar, pinturas, prótesis médicas, maquillaje y diferentes medicamentos <sup>[2]</sup>. Es por esto que el posible riesgo para la salud humana asociado a la exposición a estas NP se ha convertido en los últimos años en un tema de gran interés para la comunidad científica, principalmente debido a que los posibles efectos tóxicos de estas NP no han sido todavía caracterizados, y pueden diferir notablemente de los propios del material de que están compuestas cuando se encuentra en una escala mayor <sup>[3,4]</sup>.

Las NP de óxidos metálicos, como son el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y el óxido de zinc ( $\text{ZnO}$ ), se han convertido en im-

portantes nanomateriales habitualmente utilizados en una variedad de aplicaciones industriales y médicas, incluyendo materiales de alta tecnología, plásticos, pinturas, implantes ortopédicos, productos derivados de papel, cosméticos y protectores solares<sup>[5]</sup>. Debido a su extendida utilización, la toxicidad de estas NP ha sido ampliamente estudiada en distintas líneas celulares, principalmente queratinocitos y células de los pulmones, demostrándose que su exposición induce genotoxicidad, citotoxicidad y daño oxidativo<sup>[5-8]</sup>.

Sin embargo, los estudios sobre la posible neurotoxicidad y los efectos de las NP de óxidos metálicos sobre el sistema nervioso son hasta la fecha muy escasos. Hoy en día, hay una imperiosa necesidad de estudiar y caracterizar los efectos que la exposición a estas NP pueda ejercer sobre el tejido neuronal, especialmente desde la reciente publicación de un trabajo en el que se muestran pruebas irrefutables de que determinadas NP de uso industrial (por ejemplo, NP de

oro de 6 nm y 18 nm), entrando por vía intravenosa o a través de los pulmones, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro de animales pequeños<sup>[9]</sup>.

Con el fin de testar la posible neurotoxicidad de las NP de óxidos metálicos sobre células humanas, el objetivo de este trabajo ha consistido en la caracterización de tres de las NP de óxidos metálicos más empleadas en productos de uso cotidiano (una de zinc, ZnO, y dos de titanio, TiO<sub>2</sub>), así como en la evaluación de sus posibles efectos sobre las células neuronales SHSY5Y de neuroblastoma humano, tratadas con diferentes concentraciones y durante diversos tiempos de exposición.

### Materiales y métodos

#### *Preparación y caracterización de las suspensiones de NP*

Para llevar a cabo el estudio se escogieron tres de las NP de óxidos metáli-

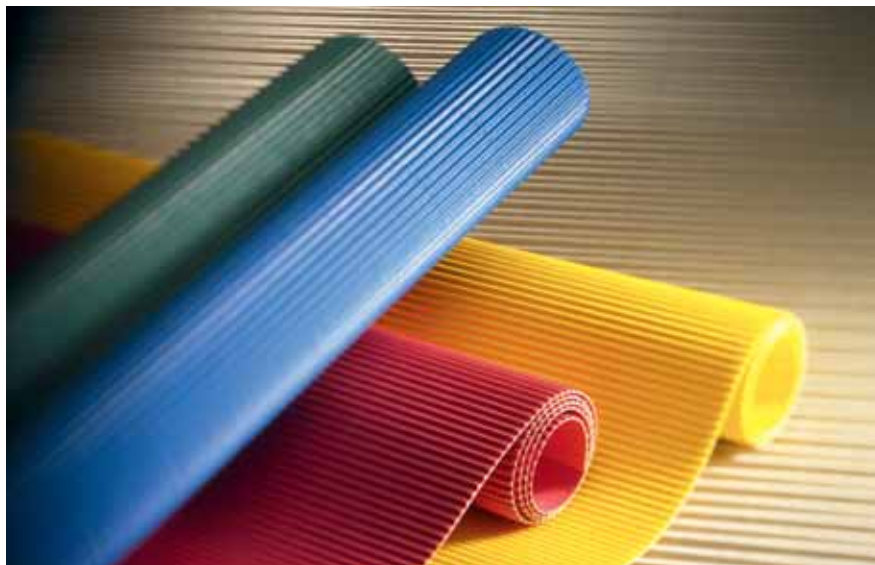
cos más empleadas en la fabricación de productos de uso cotidiano: NP de óxido de zinc –ZnO– y NP de dióxido de titanio –TiO<sub>2</sub>–, procedentes de dos casas comerciales distintas (Sigma, TiO<sub>2</sub>-S, y Degussa, TiO<sub>2</sub>-D) y con distinta composición cristalina (100% *anatase* para las TiO<sub>2</sub>-S y 80% *anatase* y 20% *rutile* para las TiO<sub>2</sub>-D). Las NP se suspendieron en agua desionizada o en medio de cultivo completo a una concentración final de 150 µg/ml para las de TiO<sub>2</sub> y 80 µg/ml para las de ZnO, y se sometieron a ultrasonificación a 30W durante 5 minutos. El tamaño hidrodinámico medio, la distribución de tamaño y el potencial zeta se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*).

#### *Cultivo celular*

Para testar los posibles efectos neurotóxicos de estas NP se utilizó la línea celular SHSY5Y, de neuroblastoma humano, frecuentemente utilizada como modelo neuronal en muchos estudios neuroquímicos, neurobiológicos, y neurotoxicológicos. La línea celular se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECCC, *European Collection of Cell Cultures*) y se mantuvo en medio compuesto de EMEM/F12 (1:1) con 1% aminoácidos no esenciales, 1% antibiótico y antimicótico, y 10% suero bovino fetal, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37° C. Veinticuatro horas antes de la realización de los experimentos, las células se pasaron a nuevos pocillos a una concentración aproximada de 2.5x10<sup>5</sup> células/pocillo. Los tratamientos se llevaron a cabo en un 1% del volumen final. Como control negativo se utilizó medio completo en todos los casos, y como controles positivos, camptotecina (10 µM), mitomicina C (1.5 µM) o bleomicina (1 µg/ml) para los ensayos de apoptosis, genotoxicidad o daño oxidativo, respectivamente.



Latinstock



Latinstock

Plásticos, pinturas y derivados del papel son algunas de las aplicaciones industriales en las que se utilizan habitualmente nanopartículas de óxidos metálicos.

### Alteraciones morfológicas y viabilidad celular

Se testaron siete concentraciones (0-150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para las de  $\text{TiO}_2$  y 0-80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para las NP de  $\text{ZnO}$ ) y tres tiempos de exposición (3, 6 y 24 horas). Los cambios en la morfología celular inducidos por el tratamiento con NP se observaron en un microscopio óptico de campo invertido con contraste de fases. La viabilidad celular se analizó mediante el test MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] y el ensayo de captación de rojo neutro o ensayo NRU (*Neutral Red Uptake*), siguiendo los protocolos descritos por Mossman (1983)<sup>[10]</sup> y Borenfreund y Puerner (1985)<sup>[11]</sup>, respectivamente. De los resultados obtenidos del análisis morfológico y los tests de viabilidad se seleccionaron tres concentraciones (80, 120 y 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para las NP de  $\text{TiO}_2$  y 20, 30 y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para las de  $\text{ZnO}$ ) y dos tiempos de exposición (3 y 6 horas) para la realización de los ensayos posteriores.

### Captación celular

La capacidad de las NP de penetrar en las células neuronales se analizó me-

dante una técnica de citometría de flujo, que se basa en la determinación del tamaño y granularidad celular, según el protocolo de Suzuki *et al.* (2007)<sup>[12]</sup>.

### Genotoxicidad

#### ■ Test de micronúcleos

Tras los tratamientos con las NP, las células se incubaron durante otro periodo adicional de 24 horas. La evalua-

Se analizó la captación de las NP por las células y su capacidad para inducir citotoxicidad, genotoxicidad por diversos mecanismos, daño oxidativo en el ADN y apoptosis

ción de micronúcleos (MN) se llevó a cabo por citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito por Valdiglesias *et al.* (2011)<sup>[13]</sup>.

#### ■ Ensayo del cometa

La determinación del daño primario en el ADN se llevó a cabo empleando la electroforesis en microgel de células aisladas, conocida comúnmente como ensayo del cometa, realizada según lo descrito por Laffon *et al.* (2002)<sup>[14]</sup>. Como parámetro para determinar el daño en el ADN se escogió el porcentaje de ADN en la cola del cometa (% tDNA).

#### ■ Ensayo $\gamma\text{H2AX}$

Para analizar los niveles de la forma fosforilada de la histona H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ )



Latinstock

se utilizó una metodología de citometría de flujo descrita por Valdiglesias *et al.* (2011) <sup>[13]</sup>.

**Daño oxidativo en el ADN**

Para evaluar el daño oxidativo en el ADN se utilizó una modificación del ensayo del cometa que incorpora un paso de incubación con la enzima de reparación OGG1, siguiendo el protocolo propuesto por Smith *et al.* (2006) <sup>[15]</sup>.

**Apoptosis**

La tasa de células en apoptosis se determinó mediante doble tinción con aneXina V e yoduro de propidio utilizando citometría de flujo y un *kit* comercial (BD Pharmingen™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I).

El potencial de membrana mitocondrial (MMP, de *Mitochondrial Membrane Potential*) se analizó también por citometría de flujo tras la tinción de las células con el colorante JC-1 a 10 µmol/L durante 30 minutos a 37° C.

**Análisis estadístico**

Para cada condición experimental testada se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes. Los datos se expresaron como media ± error estándar. La distribución de las variables respuesta no se ajustó a la normalidad según el test de Kolmogorov-Smirnov, por lo que se utilizaron los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-

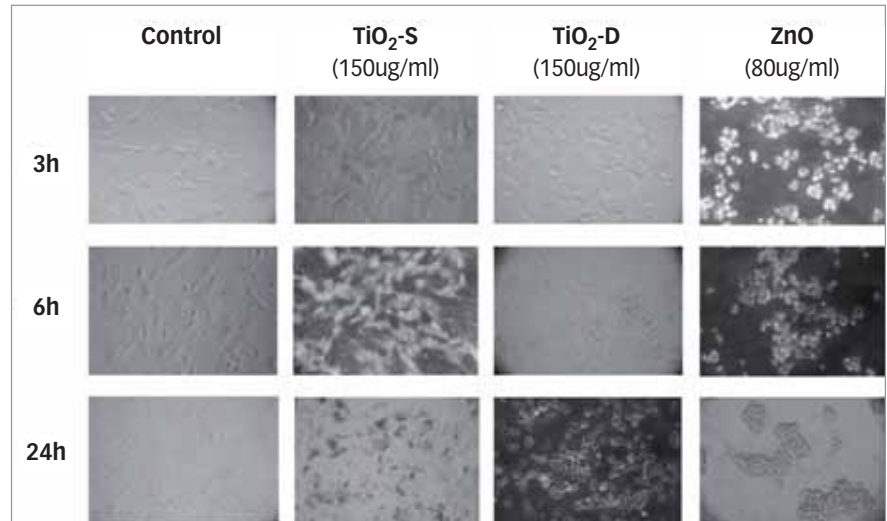


Figura 1. Células SHSY5Y tratadas con las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO durante diferentes tiempos de exposición.

Whitney para evaluar la existencia de diferencias entre grupos. Se consideró significativo un *P*-valor inferior a 0.05.

**Resultados y discusión**

**Caracterización de las NP**

Antes de comenzar los experimentos de evaluación toxicológica, se determinaron las propiedades físico-químicas de las NP testadas mediante DLS (tabla 1). El diámetro hidrodinámico medio obtenido para las NP suspendidas en agua fue de 447.9 nm para TiO<sub>2</sub>-S, 160.5 nm para TiO<sub>2</sub>-D y 243.7 nm para ZnO. En todos los casos, las NP mostraron un ligero aumento en su tamaño hi-

drodinámico cuando la caracterización se realizó en medio de cultivo completo. Esto podría ser debido a un ligero aumento en la aglomeración; sin embargo, los gráficos de dispersión del tamaño obtenidos durante el análisis mostraron una buena dispersión para todas las NP testadas.

**Alteraciones morfológicas**

Tras el tratamiento de las células neuronales con las NP durante 3, 6 y 24 horas se evaluó microscópicamente su morfología y aspecto general. La figura 1 muestra las imágenes tomadas a las concentraciones más altas testadas para cada una de las NP. Al finalizar los tratamientos no se detectó ningún cambio en los cultivos celulares tratados con las NP de TiO<sub>2</sub>, aunque sí se observaron agregados de NP a las 24 horas de inicio de los tratamientos, confirmando la inestabilidad de la suspensión bajo esas condiciones. Por el contrario, sí se observaron alteraciones morfológicas en las células tratadas con NP de ZnO a las concentraciones más altas, e incluso a bajas concentraciones durante los tiempos de exposición más prolongados. Dichas alteraciones incluyen formación de

Tabla 1. Caracterización de las NP utilizadas

	TiO <sub>2</sub> -S	TiO <sub>2</sub> -D	ZnO
Tamaño de partícula <sup>a</sup> (nm)	25 (MET)	25 (MET)	100 (BET)
Área superficial específica <sup>a</sup> (m <sup>2</sup> /g)	200-220	35-45	15-25
Diámetro hidrodinámico (nm) (DLS)			
Agua	447.9	160.5	243.7
Medio	504.5	228.3	273.4
Potencial Zeta (mV) (DLS)			
Agua	-9.96	-27.8	-8.23
Medio	-10.7	-10.7	-11.7

<sup>a</sup>Especificado por el fabricante. MET: Microscopía Electrónica de Transmisión, BET: Brunauer-Emmett-Teller; DLS: Dynamic Light Scattering.

agregados celulares, pérdida de transparencia, redondeo y desprendimiento del frasco de cultivo.

### Viabilidad celular

Los efectos sobre la viabilidad celular de las diferentes NP fueron evaluados mediante los ensayos MTT y NRU. Ambos ensayos son complementarios, ya que el MTT proporciona información sobre la actividad mitocondrial de las células, mientras que el NRU muestra la actividad lisosomal. Se testaron siete concentraciones distintas de cada una de las NP durante tres tiempos de exposición (3, 6 y 24 horas). Los datos obtenidos para ambos ensayos se recogen en

## El comportamiento de los dos tipos de NP de TiO<sub>2</sub> es comparable, a pesar de su diferente composición cristalina

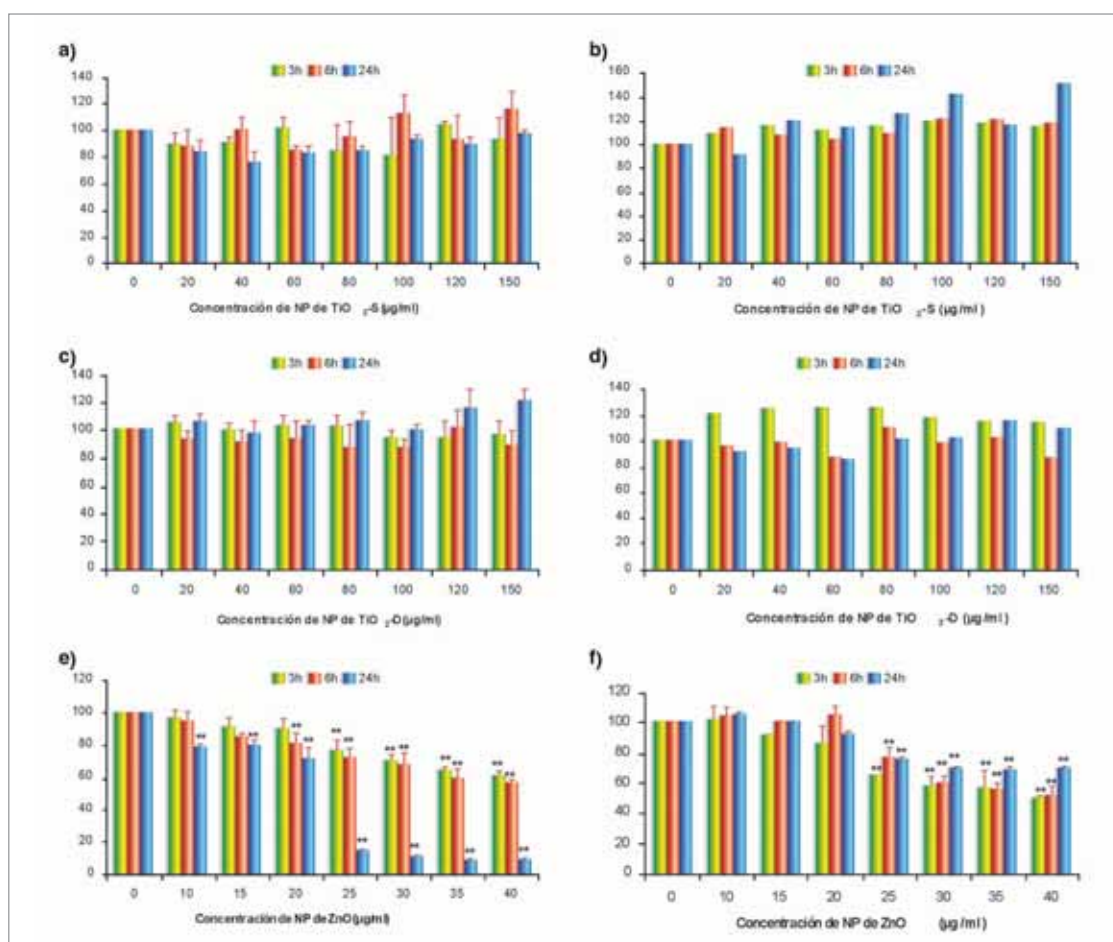
la figura 2. Ninguno de los tratamientos con NP de TiO<sub>2</sub> indujo efectos sobre la viabilidad de las células neuronales, siendo los datos obtenidos en ambos ensayos muy similares. Estos datos coinciden con los presentados por Petkovic *et al.* (2011) [16], que expusieron a células hepáticas a NP de TiO<sub>2</sub> (*anatase* y *rutile*) en

concentraciones y condiciones similares a las utilizadas en este estudio.

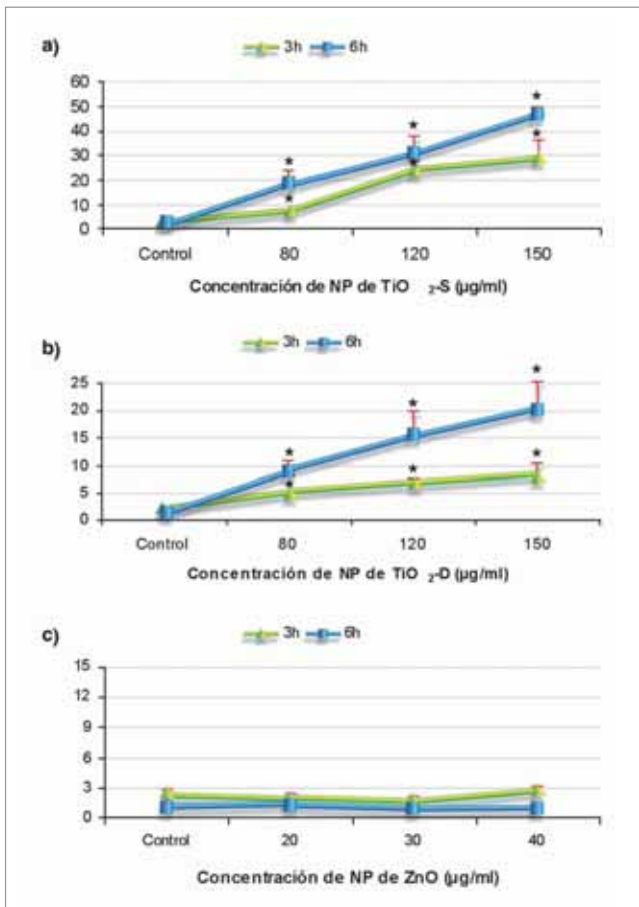
Sin embargo, la exposición a NP de ZnO disminuye la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis en los tres tiempos de tratamiento testados, aunque el descenso es más acusado a las 24 horas. Estos resultados concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía para otros tipos celulares [17,18].

### Captación celular

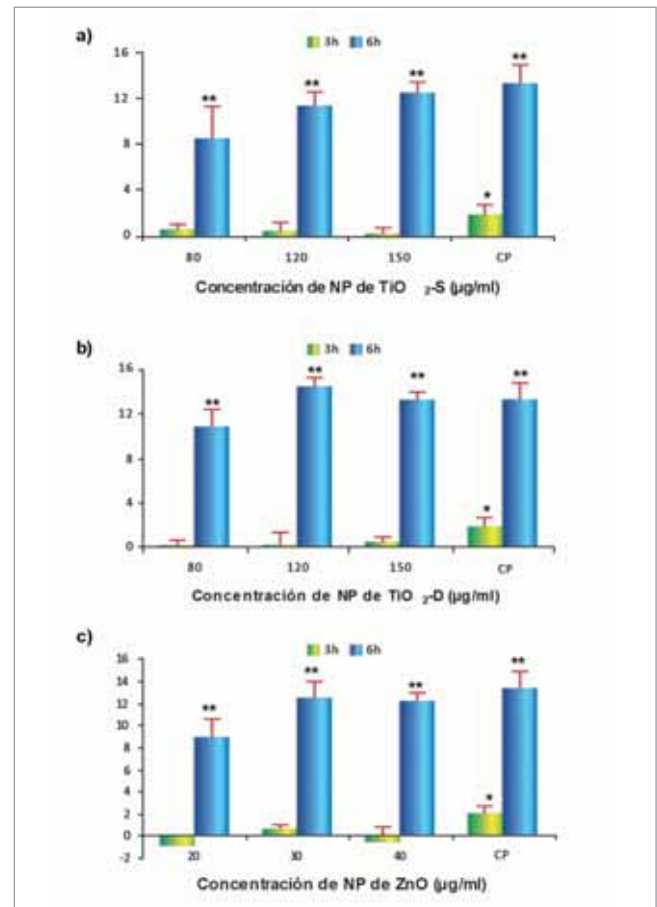
Las NP de TiO<sub>2</sub> mostraron una captación celular elevada y dependiente de la dosis (figura 3), siendo además ligeramente superior en las células tratadas durante 6 horas que en las tratadas du-



**Figura 2.** Resultados de los ensayos de MTT y NRU en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S (a y b, respectivamente), TiO<sub>2</sub>-D (c y d, respectivamente) y ZnO (e y f, respectivamente).



**Figura 3.** Captación celular de las NP de TiO<sub>2</sub>-S (a), TiO<sub>2</sub>-D (b) y ZnO (c). \*P<0.05 diferencia significativa con respecto al control negativo.



**Figura 4.** Resultados del test de MN en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S (a), TiO<sub>2</sub>-D (b) y ZnO (c). \*P<0.05, \*\*P<0.01 diferencia significativa con respecto al control negativo. CP: control positivo.

rante 3 horas. Los porcentajes de captación fueron siempre inferiores en las NP de TiO<sub>2</sub>-D que en las de TiO<sub>2</sub>-S.

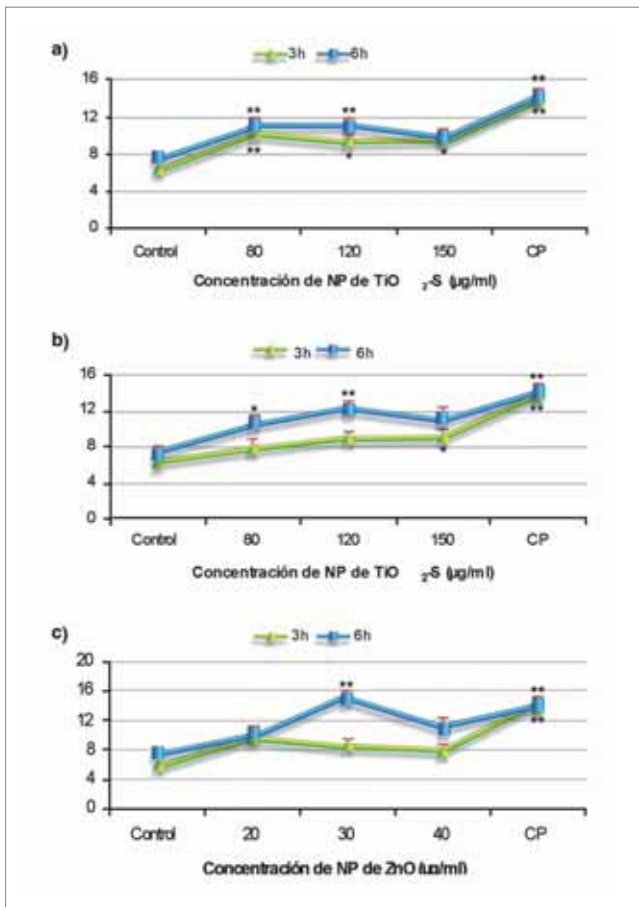
Por el contrario, y sorprendentemente, no se observó captación celular de las NP de ZnO en ninguna de las condiciones testadas. Lesniak *et al.* (2010) <sup>[19]</sup> observaron que las NP suspendidas en medio completo suplementado pueden recubrirse de las proteínas del medio, reduciendo así su capacidad para ser captadas por las células. Por otra parte, también se ha descrito que la tasa de internalización de las NP en las células puede ser afectada por parámetros distintos del tamaño y forma de las NP <sup>[20]</sup>. Parece, por tanto, que las condiciones

empleadas en nuestro estudio, especialmente en lo que se refiere a la utilización de medio suplementado con suero bovino fetal, limitan de alguna manera la penetración de las NP de ZnO en las células.

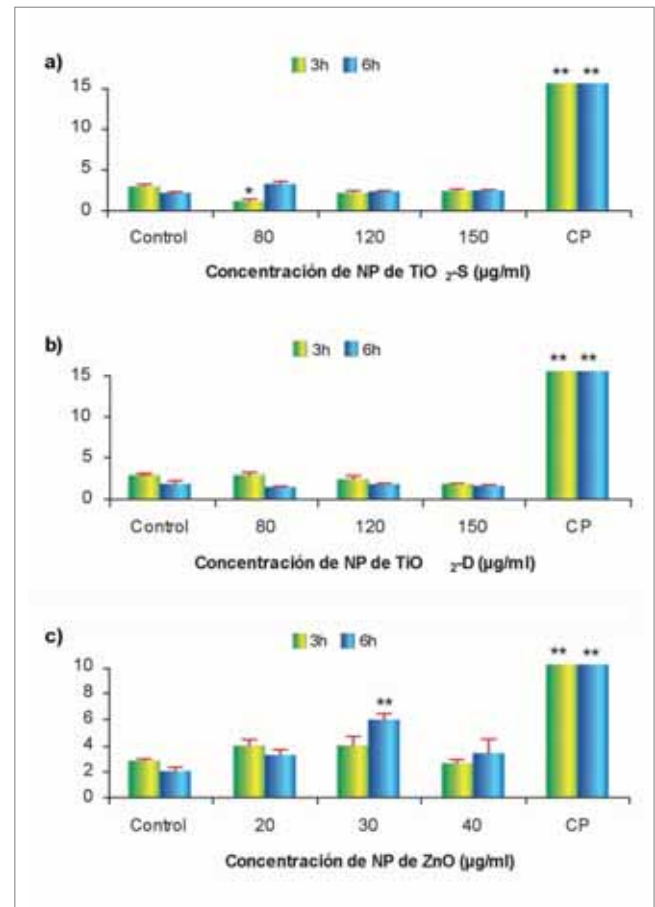
#### Genotoxicidad

La evaluación de la genotoxicidad inducida por las NP se llevó a cabo mediante el test de micronúcleos (MN), el ensayo del cometa y el análisis de la fosforilación de la histona H2AX. Los MN son pequeños cuerpos nucleares presentes en el citoplasma que contienen cromosomas completos o fragmentos cromosómicos que han quedado retra-

sados durante la anafase de la división nuclear. Proporcionan así información sobre procesos tanto de clastogénesis como de aneugénesis. Los niveles de la forma fosforilada de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) se determinaron como marcadores de roturas de doble cadena en el ADN. Una de las primeras respuestas celulares ante la producción de roturas de doble cadena en el material genético implica la fosforilación de las colas C-terminales de las histonas H2AX localizadas cerca de la zona de rotura. La maquinaria de reparación del ADN reconoce estas formas fosforiladas y comienza entonces a reparar las cadenas rotas. Por tanto, este ensayo proporciona infor-



**Figura 5.** Resultados del ensayo del cometa en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S (a), TiO<sub>2</sub>-D (b) y ZnO (c). \*P<0.05, \*\*P<0.01 diferencia significativa con respecto al control negativo. CP: control positivo.



**Figura 6.** Resultados del análisis de γH2AX en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S (a), TiO<sub>2</sub>-D (b) y ZnO (c). \*P<0.05, \*\*P<0.01 diferencia significativa con respecto al control negativo. CP: control positivo.

mación sobre eventos relacionados con clastogenicidad. Por su parte, el ensayo del cometa evalúa daño primario en el ADN: roturas de cadena simple y doble, sitios sensibles al álcali y lugares de reparación por escisión incompleta. Los resultados obtenidos tras la realización de estos tres ensayos se recogen en las figuras 4 a 6.

Los resultados obtenidos para ambas NP de TiO<sub>2</sub> fueron similares. En el test de MN se obtuvo un incremento significativo en el daño inducido solamente tras el tratamiento de 6 horas. No se observó ningún efecto sobre la fosforilación de la histona H2AX, mientras que en el ensayo del cometa se detectaron

## Las NP de TiO<sub>2</sub> penetran en las células pero no causan citotoxicidad. Inducen genotoxicidad no relacionada ni con roturas de cadena doble del ADN ni con daño oxidativo, y apoptosis mediante la vía intrínseca

efectos positivos tras 3 y 6 horas de exposición. Habitualmente, los resultados obtenidos de los ensayos del cometa y fosforilación de H2AX son similares, puesto que ambos detectan roturas de cadena doble en el ADN. No obstante, en el ensayo del cometa se detectan también otros tipos de daño, mencionados anteriormente, que no están relacionados con la fosforilación de la histona H2AX. Por tanto, parece que las NP de TiO<sub>2</sub> in-

ducen un daño en el ADN diferente de las roturas de cadena doble.

Las NP de ZnO no produjeron efectos genotóxicos tras 3 horas de exposición. Sin embargo, se observó una importante inducción de MN dependiente de la dosis tras 6 horas, acompañada por un incremento en la fosforilación de la histona H2AX y en el daño primario en el ADN. Estos resultados concuerdan con los pocos estudios existentes en la bi-



bliografía sobre los efectos genotóxicos de las NP de ZnO en células nerviosas, que describen daño en el ADN en neuronas primarias de rata [21] e inducción de MN en células de glioma [22], a concentraciones muy similares a las empleadas en nuestro estudio.

**Daño oxidativo en el ADN**

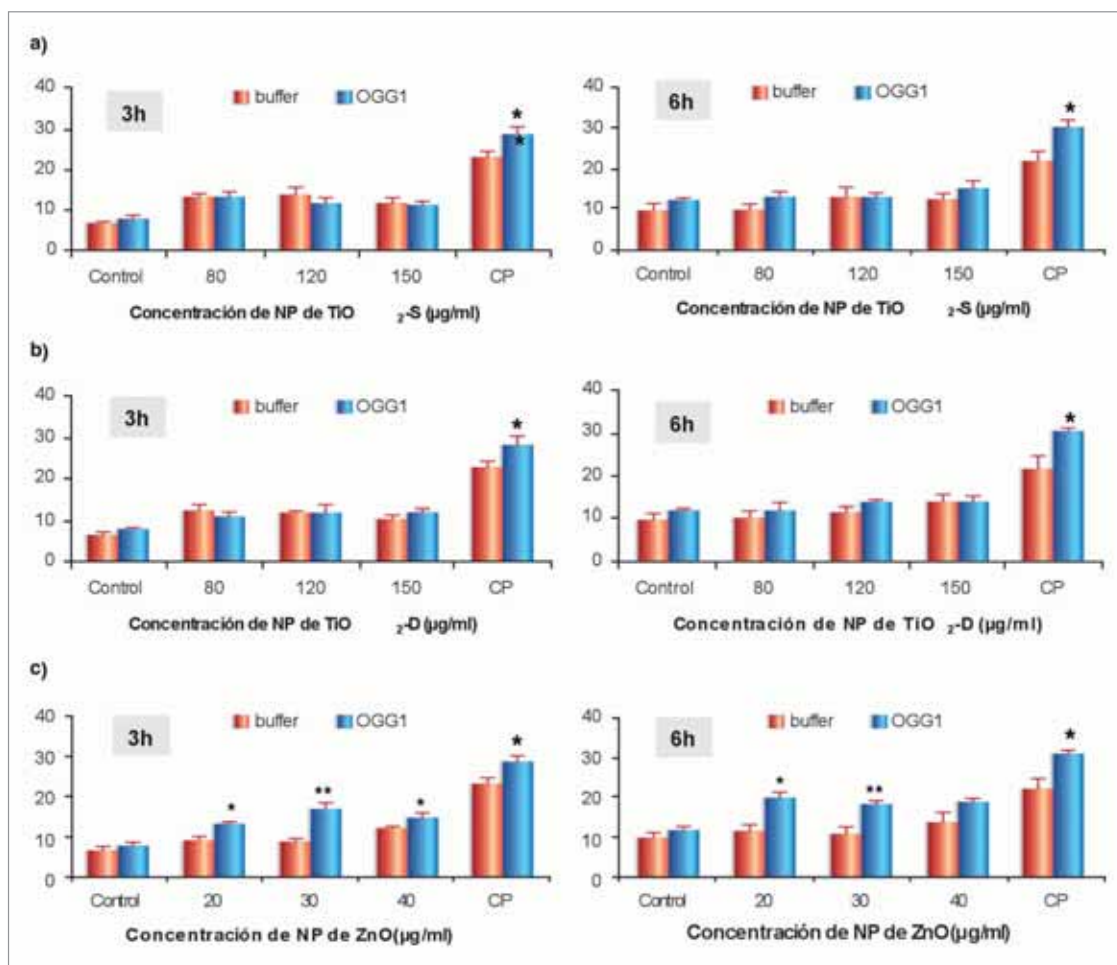
Para la evaluación del daño oxidativo en el ADN se empleó una variante del ensayo del cometa, que incluye un paso de incubación con la enzima ADN glucosilasa OGG1, que permite la detección específica de daño oxidativo por reconocimiento del aducto 8-oxo-7,8-

**A pesar de que las NP de ZnO no penetran en las células, inducen citotoxicidad, genotoxicidad, (incluyendo daño oxidativo en el ADN) y apoptosis independiente de la mitocondria**

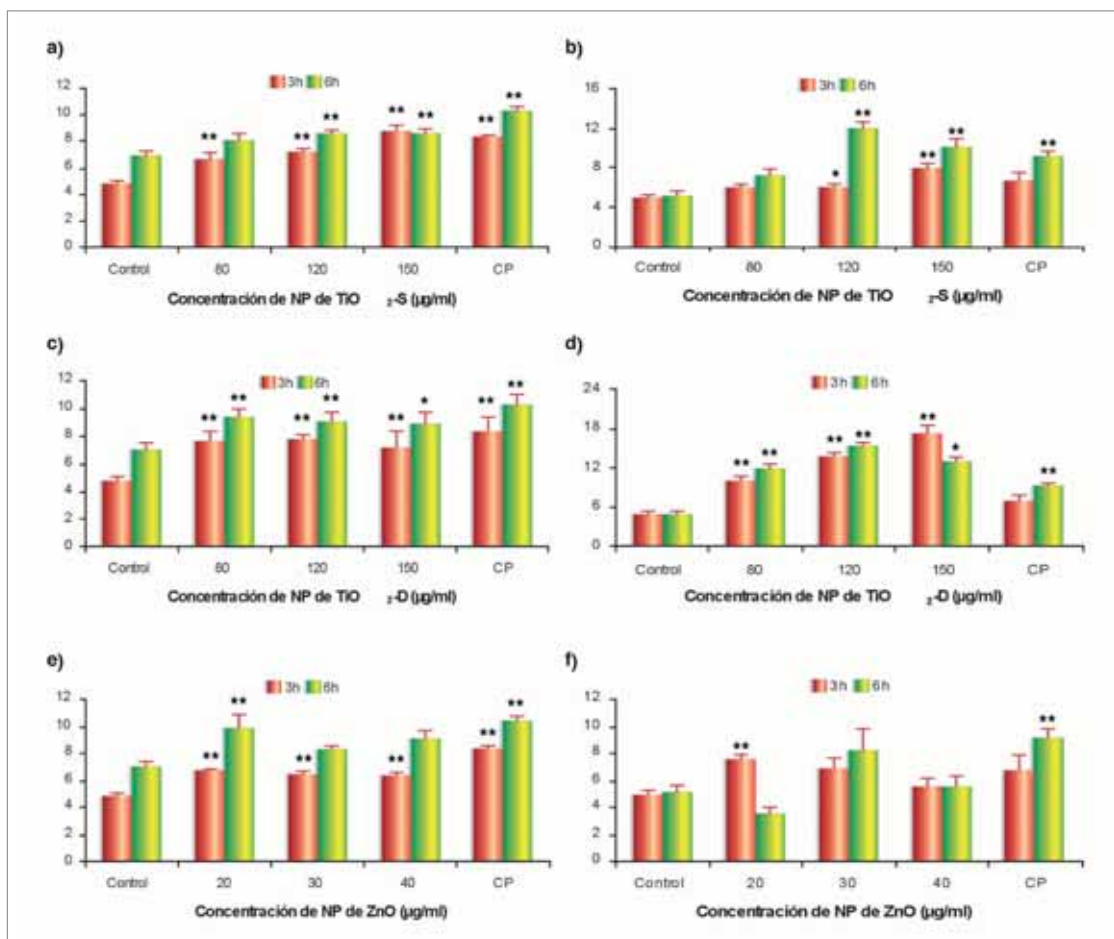
dihidroguanina. Este aducto constituye una de las lesiones en el ADN más abundantes y altamente mutagénicas [23], y ha sido ampliamente establecido como adecuado biomarcador de estrés oxidativo [24].

No se observó daño oxidativo tras el tratamiento con las NP de TiO<sub>2</sub>, a ninguna concentración ni tiempo de exposición (figura 7). A pesar de que otros

trabajos describen la implicación del estrés oxidativo en el daño celular inducido por las NP de TiO<sub>2</sub> [16,25], la generación de daño oxidativo no siempre se observa tras el tratamiento con NP de titanio y ya se han propuesto mecanismos alternativos para la toxicidad de estas NP, como la interacción con diferentes componentes celulares como los microtúbulos [26].



**Figura 7.** Resultados del ensayo del cometa modificado con la enzima OGG1 en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S (a), TiO<sub>2</sub>-D (b) y ZnO (c). \*P<0.05, \*\*P<0.01 diferencia significativa con respecto al *buffer*. CP: control positivo.



**Figura 8.** Resultados del análisis de apoptosis mediante la doble tinción con anexina V-ioduro de propidio y el análisis del potencial de membrana mitocondrial (MMP) en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S (a y b, respectivamente), TiO<sub>2</sub>-D (c y d, respectivamente) y ZnO (e y f, respectivamente). \*P<0.05, \*\*P<0.01 diferencia significativa con respecto al control negativo. CP: control positivo.

Sin embargo, las NP de ZnO indujeron daño oxidativo en el ADN tras 3 y 6 horas de incubación. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos en distintos tipos celulares <sup>[27,28]</sup> y animales de experimentación <sup>[18]</sup>.

### Apoptosis

El análisis de la muerte celular por apoptosis en las células neuronales tratadas con NP se llevó a cabo mediante dos metodologías distintas. Por una parte, mediante doble tinción con anexina V e ioduro de propidio, que permite la determinación de las células que se en-

cuentran en estadios tempranos de apoptosis. Y por otra parte, se analizó el potencial de la membrana mitocondrial a fin de determinar la potencial participación de este orgánulo en el proceso de muerte celular por apoptosis, ya que la alteración de este potencial es uno de los primeros pasos de la vía intrínseca de la apoptosis.

Tras ambos tiempos de tratamiento con NP de TiO<sub>2</sub> se obtuvieron incrementos dependientes de la dosis en el porcentaje de células apoptóticas acompañados de descensos significativos en el potencial de membrana mitocondrial (fi-

gura 8), sugiriendo implicación de este orgánulo en la vía apoptótica utilizada (vía intrínseca). Nuestros resultados coinciden con otros trabajos previos que describen un incremento de los niveles de apoptosis a través de la vía intrínseca en distintos tipos de células tratadas con NP de TiO<sub>2</sub> <sup>[29,30]</sup>.

Para las NP de ZnO se observaron igualmente incrementos significativos en el porcentaje de células apoptóticas, aunque no se detectaron en este caso alteraciones significativas en el potencial de membrana mitocondrial. Nuestros resultados sugieren, por tanto, que

las NP de ZnO inducen muerte celular mediante una ruta independiente de la mitocondria. De acuerdo con nuestros resultados, la apoptosis inducida por la exposición a NP de ZnO fue observada por otros autores en varios tipos celulares, incluyendo células neuronales [22,28,31].

### Conclusiones

El comportamiento de los dos tipos de NP de TiO<sub>2</sub> es comparable, a pesar de su diferente composición cristalina. No alteran la viabilidad celular, pero son internalizadas de forma efectiva por las células SHSY5Y. Inducen genotoxicidad dependiente de la dosis no relacionada con la producción de roturas de cadena doble del ADN ni con daño oxidativo, y apoptosis mediante la vía intrínseca. Mientras que los efectos genotóxicos causados por ambos tipos de NP de TiO<sub>2</sub> fueron muy similares, las NP TiO<sub>2</sub>-S fueron más efectivas en la inducción de citotoxicidad, de acuerdo con su mayor captación celular.



Cosméticos y protectores solares también incluyen en su composición nanopartículas de óxidos metálicos.

**Los resultados de este trabajo contribuyen a incrementar el conocimiento acerca del impacto de estas NP sobre la salud humana en general, y específicamente sobre el sistema nervioso**

A pesar de que las NP de ZnO no penetran en el interior de las células neuronales utilizadas, la exposición a estas NP induce descenso en la viabilidad celular, alteraciones morfológicas, genotoxicidad (incluyendo daño oxidativo en el ADN) y apoptosis independiente de la mitocondria, siendo la mayor parte de estos efectos proporcional a la dosis de NP aplicada y al tiempo de exposición.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a incrementar el conocimiento acerca del impacto de las NP de óxidos metálicos sobre la salud humana en general, y de forma más específica sobre el sistema nervioso. Sin embargo, todavía se necesita investigación complementaria para llegar a entender en profundidad los mecanismos moleculares que subyacen en los efectos observados en este estudio, así como para desarrollar las medidas de seguridad y límites de exposición para el personal que trabaja con materiales que contienen estos tipos de NP, y también para aquellos que pueden estar expuestos a los mismos cuando son implementados en aplicaciones comerciales, industriales y médicas. ♦



## PARA SABER MÁS

- [1] Serena PAD. ¿Qué sabemos de la nanotecnología? CSIC. 2010. Ed. Catarata.
- [2] PEN. Project of the Emerging Nanotechnologies (PEN). 2009. Disponible en: <<http://www.nanotechproject.org>>.
- [3] Ball P. Nanoparticles in sun creams can stress brain cells. *Nature news*. 2006.
- [4] Phibbs-Rizzuto P. Study of nanoparticles' effect on protein said important, but more research needed. *Daily Environment Report*, 2007 (107) A-4.
- [5] Osman IF, Baumgartner A, Cemel E, Fletcher JN, Anderson D. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEP-2 cells. *Nanomedicine*, 2010 (5) 1193-1203.
- [6] Kang SJ, Lee YJ, Kim BM, Choi YJ, Chung HW. Cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in UVA-irradiated normal peripheral blood lymphocytes. *Drug Chem Toxicol*, 2011 (34) 277-284.
- [7] Hsiao IL, Huang YJ. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ*, 2011 (409) 1219-1228.
- [8] Shukla RK, Sharma V, Pande AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol in Vitro*, 2011 (25) 231-241.
- [9] Kreyling W, Möller W, Semmler-Behnke M, Oberdörster G. Particle Dosimetry: Deposition and clearance from the respiratory tract and translocation towards extrapulmonary sites. 2007. Francis & Taylor, Boca Raton.
- [10] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983 (65) 55-63.
- [11] Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 1985 (24) 119-124.
- [12] Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol*, 2007 (41) 3018-3024.
- [13] Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, Méndez J. Okadaic acid-induced genotoxicity in human cells evaluated by micronucleus test and  $\gamma$ H2AX analysis. *J Toxicol Environ Health*, 2011a (74) 980-992.
- [14] Laffon B, Pásaro E, Méndez J. DNA damage and repair in human leukocytes exposed to styrene-7,8-oxide measured by the comet assay. *Toxicol Lett*, 2002 (126) 61-68.
- [15] Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis*, 2006 (21) 185-190.
- [16] Petković J, Zegura B, Stevanović M, Drnovsek N, Uskoković D, Novak S, Filipiä M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO<sub>2</sub> nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology*, 2011 (5) 341-353.
- [17] Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, 2012 (17) 852-870.
- [18] Fukui H, Horie M, Endoh S, Kato H, Fujita K, Nishio K, Komaba LK, Maru J, Miyahui A, Nakamura A, Kinugasa S, Yoshida Y, Hagihara Y, Iwahashi H. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chemico-Biological Interactions*, 2012 (198) 29-37.
- [19] Lesniak A, Campbell A, Nonopoli MP, Lynch I, Salvati A, Dawson KA. Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials*, 2010 (31) 9511-9518.
- [20] Kim JA, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nat Nanotechnol*, 2011 (7) 62-68.
- [21] Chiang HM, Xia Q, Zou X, Wang C, Wang S, Miller BJ, Howard PC, Yin JJ, Beland FA, Yu H, Fu PP. Nanoscale ZnO induces cytotoxicity and DNA damage in human cell lines and rat primary neuronal cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 2012 (12) 2126-2135.
- [22] Wahab R, Kaushik NK, Verma AK, Mishra A, Hwang IH, Yang YB, Shin HS, Kim YS. Fabrication and growth mechanism of ZnO nanostructures and their cytotoxic effect on human brain tumor U87, cervical cancer HeLa, and normal HEK cells. *J Biol Inorg Chem*, 2011 (16) 431-442.
- [23] Laantri N, Jalbout M, Khyatti M, Ayoub WB, Dahmoul S, Ayad M, Bedadra W, Abdoun M, Mesli S, Kandil M, Hamdi-Cherif M, Boualga K, Bouaouina N, Chouchane L, Benider A, Ben-Ayed F, Goldgar D, Corbex M. XRCC1 and hOGG1 genes and risk of nasopharyngeal carcinoma in North African countries. *Mol Carcinog*, 2011 (50) 732-737.
- [24] Kuo H-W, Chou S-Y, Hu T-W, Wu F-Y, Chen D-J. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res*, 2007 (631) 62-68.
- [25] Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect*, 2007 (115) 1631-1637.
- [26] Gheshlaghi ZN, Riazzi GH, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008 (40) 777-782.
- [27] De Berardis B, Civitelli G, Condello M, Lista P, Pozzi R, Arancia G, Meschini S. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010 (246) 116-127.
- [28] Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine*, 2012 (7) 845-857.
- [29] Wu J, Sun J, Xue Y (2010) Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. *Toxicol Lett* 199:269-276.
- [30] Xue C, Wu J, Lan F, Liu W, Yang X, Zeng F, Xu H (2010) Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J Nanosci Nanotechnol* 10:8500-8507.
- [31] 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* 20:115101.