

---

**Riesgo asociado a la exposición  
a nanopartículas de óxidos  
metálicos: efectos celulares  
y moleculares en células  
neuronales**

---

**Blanca Laffon Lage  
y col.**

**Ayudas a la investigación 2011**

## Investigador Principal

**Blanca Laffon Lage**

Profesora Titular de Psicobiología  
Universidad A Coruña

## Equipo Investigador

**Eduardo Pásaro Méndez**

Catedrático de Psicobiología  
Universidad de A Coruña

**Vanessa Valdiglesias García**

Investigadora Postdoctoral  
Universidad de A Coruña

**Julia García Lestón**

Investigadora Postdoctoral  
Universidad de A Coruña

**Francisco Aguilera Arriagada**

Estudiante de Doctorado  
Universidad de A Coruña

**Gözde Kiliç**

Estudiante de Doctorado  
Universidad de A Coruña

## Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	4
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL PROYECTO	4
3. RESULTADOS OBTENIDOS	4
3.1. Caracterización de las Nanopartículas	5
3.2. Alteraciones morfológicas	5
3.3. Evaluación de la citotoxicidad	5
3.4. Análisis de la captación celular	6
3.5. Evaluación de la genotoxicidad	9
3.5.1. Test de micronúcleos	9
3.5.2. Daño primario en el ADN	11
3.5.3. Fosforilación de la histona H2AX	12
3.6. Daño oxidativo en el ADN	14
3.7. Apoptosis	16
4. CONCLUSIONES	17
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

## 1. INTRODUCCIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

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 las NP 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 (Serena, 2010).

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 (PEN, 2009). 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 (Ball, 2006; Phibbs-Rizzuto, 2007).

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 importantes nanomateriales comúnmente 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 (Osman *et al.*, 2010). 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 (Osman *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011; Hsiao y Huang, 2011; Shukla *et al.*, 2011).

Sin embargo, los estudios sobre la posible neurotoxicidad y los efectos de las NP de óxidos metálicos sobre el sistema nervioso son 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 6nm y 18nm de oro), entrando por vía intravenosa o a través de los pulmones, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro de animales pequeños (Kreyling *et al.*, 2007).

Para testar la posible neurotoxicidad de las NP de óxidos metálicos sobre células humanas, en el presente proyecto de investigación se ha realizado el estudio y la caracterización de tres de las NP de óxidos metálicos más empleadas en productos de uso cotidiano (una de

zinc,  $\text{ZnO}$ , y dos de titanio,  $\text{TiO}_2$ ), así como la evaluación de sus posibles efectos sobre las células neuronales SHSY5Y de neuroblastoma humano, tratadas con diferentes concentraciones y durante diversos tiempos de exposición.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL PROYECTO

Los objetivos específicos que se plantearon en el presente proyecto son los siguientes:

1. Analizar las propiedades físico-químicas de las NP de zinc y titanio en suspensiones acuosas y en contacto con el medio de cultivo celular, y determinar las consecuencias de la interacción de las NP con las células, en términos de alteraciones morfológicas y capacidad de penetración en el interior celular.
2. Estudiar los posibles efectos citotóxicos que pueda ocasionar la exposición a las NP de zinc y titanio en células humanas, determinando para ello las alteraciones en la actividad enzimática mitocondrial y en la actividad de los lisosomas.
3. Evaluar los posibles efectos genotóxicos como consecuencia de la exposición de células humanas a las NP de zinc y titanio a distintos niveles: inducción de daño oxidativo en el ADN, de roturas de cadena, frecuencia de micronúcleos y presencia de la variante de histona H2AX fosforilada.
4. Evaluar los índices de muerte celular programada o apoptosis tras el tratamiento de las células con diferentes concentraciones de NP de zinc y titanio, empleando diferentes técnicas de citometría de flujo.
5. Describir, en base a los resultados obtenidos en los ensayos empleados, el mecanismo de acción de cada una de las NP estudiadas, y comparar sus efectos sobre las células humanas evaluadas.

## 3. RESULTADOS OBTENIDOS

Para llevar a cabo el estudio se escogieron un total de tres de las NP de óxidos metálicos más empleadas en la fabricación de productos de uso cotidiano: NP de óxido de zinc,  $\text{ZnO}$ , y NP de dióxido de titanio,  $\text{TiO}_2$ , procedentes de dos casas comerciales distintas (Sigma,  $\text{TiO}_2$ -S, y Degussa,  $\text{TiO}_2$ -D) y con distinta composición cristalina (100% *anatase* para las  $\text{TiO}_2$ -S y 80% *anatase* y 20% *rutile* para las  $\text{TiO}_2$ -D). Para testar los posibles efectos neurotóxicos de estas NP se utilizó la línea celular SHSY5Y, de neuroblastoma humano, una línea frecuentemente utilizada como modelo neuronal en muchos estudios neuroquímicos, neurobiológicos, y neurotoxicológicos (Encinas *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2003; Di Daniel *et al.*, 2005).

### 3.1. Caracterización de las nanopartículas

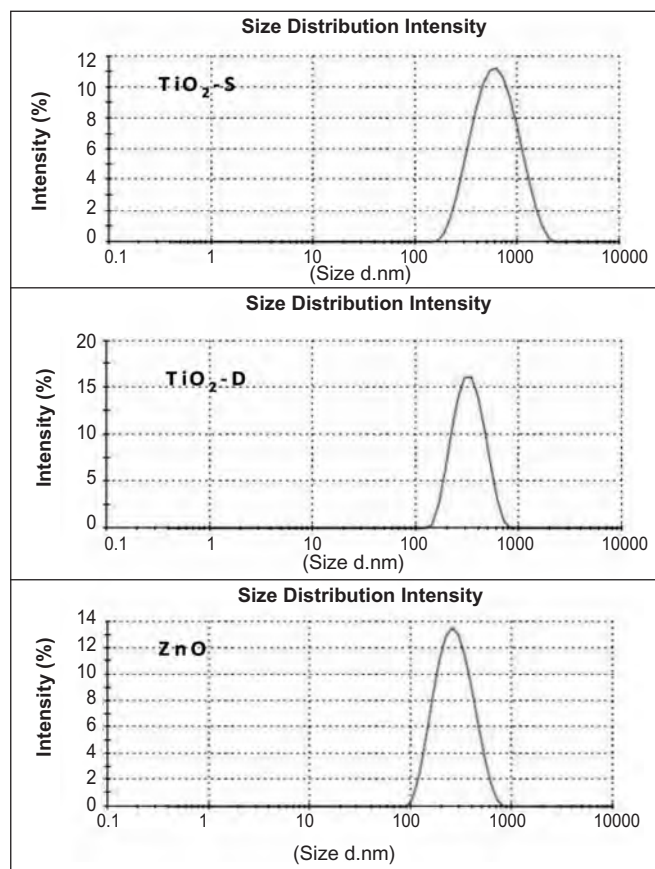
Antes de comenzar los experimentos de evaluación toxicológica, las NP fueron caracterizadas con el fin de determinar sus propiedades físico-químicas y describirlas en profundidad, y poder posteriormente, establecer relaciones entre dichas características y los efectos observados tras los tratamientos. Se llevó a cabo para ello un

estudio de la dispersión de luz dinámica (DLS) y se obtuvieron distintos parámetros para todas las NP del estudio, incluyendo el tamaño hidrodinámico medio, la distribución del tamaño y el potencial zeta (Tabla 1 y Figura 1). Las medidas se realizaron por duplicado empleando NP en suspensión, tanto en agua como en medio de cultivo.

**Tabla 1.** Caracterización de la NP mediante dispersión de luz dinámica (DLS)

NP	Diámetro hidrodinámico (nm)		Potencial Zeta (mV)	
	Agua	Medio cultivo	Agua	Medio cultivo
TiO <sub>2</sub> -S	447.9	504.5	-9.96	-10.7
TiO <sub>2</sub> -D	160.5	228.3	-27.8	-10.7
ZnO	243.7	273.4	-8.23	-11.7

El diámetro hidrodinámico medio obtenido para las NP suspendidas en agua fue 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 hidrodinámico cuando la caracterización se realizó en medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal. 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 (Figura 1).



**Figura 1.** Gráficos de distribución del tamaño obtenidos para las distintas NP durante la evaluación por DLS.

### 3.2. Alteraciones morfológicas

Una vez caracterizadas las diferentes NP se procedió a la evaluación microscópica de las células tratadas con varias concentraciones de dichas NP durante diferentes tiempos. En concreto se evaluaron concentraciones de entre 0 y 150 µg/ml para ambas NP de titanio y de entre 0 y 80 µg/ml para las de zinc, y se trataron las células durante 3, 6 y 24h. Para llevar a cabo el análisis de las posibles alteraciones morfológicas se empleó un microscopio óptico de campo invertido y se utilizaron objetivos de 10 y de 20 aumentos.

La Figura 2 muestra las imágenes tomadas a las concentraciones más altas testadas para cada una de las NP del estudio y los diferentes tiempos de exposición. Al finalizar los tratamientos, no se detectó ningún cambio en los cultivos celulares tratados con las NP de titanio: ni para las procedentes de Sigma, ni para aquellas procedentes de Degussa. Aunque sí se observaron agregados de NP a las 24h de inicio de los tratamientos confirmando la inestabilidad de la suspensión bajo esas condiciones. Como consecuencia, este tiempo de exposición, 24h, fue descartando para los sucesivos experimentos.

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 incluían formación de agregados celulares, pérdida de transparencia, redondeo y desprendimiento del frasco de cultivo (Figura 2).

### 3.3. Evaluación de la citotoxicidad

Los efectos citotóxicos de las diferentes NP fueron evaluados mediante los siguientes ensayos:

- Ensayo MTT: se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil-

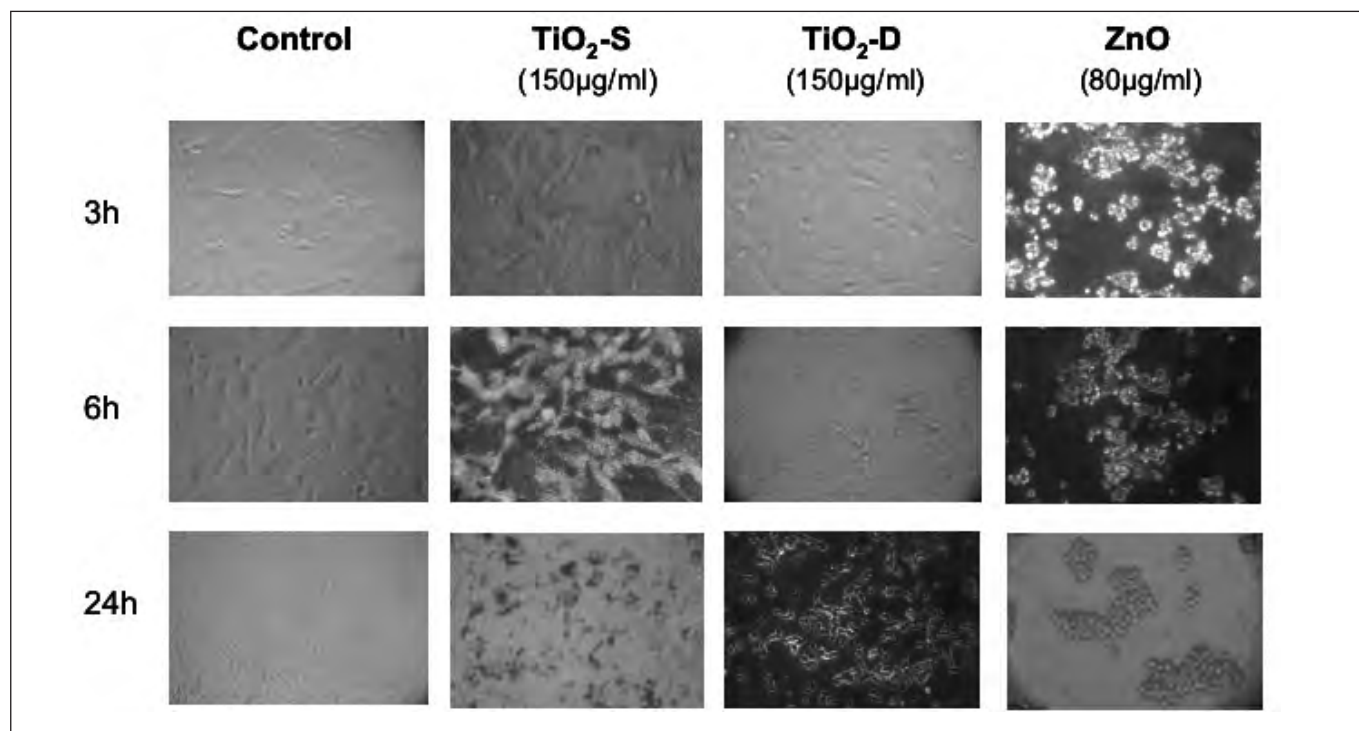


Figura 2. Células SHSY5Y tratadas con las NP de TiO<sub>2</sub> y ZnO durante diferentes tiempos de exposición.

tetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar espectrofotométricamente la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Es un método muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. Se realizó según el protocolo espectrofotométrico adaptado por Sharma *et al.* (2009) para su aplicación a NP.

- Ensayo de captación de rojo neutro o ensayo NRU (Neutral Red Uptake): se basa en la capacidad de las células viables de incorporar y unir el colorante rojo neutro, un colorante supravital que penetra fácilmente a través de la membrana celular por difusión no iónica y se acumula predominantemente en los lisosomas intracelulares. La citotoxicidad se expresa como la reducción de la captación del colorante tras la exposición. Se siguió el método propuesto por Repetto *et al.* (2008).

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 8 concentraciones distintas de cada una de las NP durante 3 tiempos de exposición (3, 6 y 24h). Los datos obtenidos para las NP de ZnO se recogen en las Figuras 3 y 4.

Como se puede observar, los resultados de ambas técnicas muestran que 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 24h. Estos resultados concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía

para otros tipos celulares (Sharma *et al.*, 2012; Fukui *et al.*, 2012).

En las Figuras 5 a 8 se recogen los resultados de los ensayos de citotoxicidad para las NP de TiO<sub>2</sub>. Ninguno de los tratamientos con estas NP, ya sea procedentes de Sigma o de Degussa, indujo efectos sobre la viabilidad de las células neuronales, siendo los resultados obtenidos en ambos ensayos muy similares. Estos datos coinciden con los presentados por Petkovic *et al.* (2011), 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.

### 3.4. Análisis de la captación celular

Antes de realizar los estudios de evaluación de genotoxicidad y citotoxicidad propiamente dichos, consideramos necesario determinar si las NP objeto de estudio eran capaces de entrar en las células neuronales y en qué medida lo hacían, o si, por el contrario, sólo interactúan con la membrana celular. Para llevar a cabo esta evaluación empleamos un análisis de captación celular mediante citometría de flujo, que se basa en la determinación del tamaño y granularidad celular, según el protocolo de Suzuki *et al.* (2007).

Las Figuras 9, 10 y 11 muestran los resultados obtenidos para las NP de TiO<sub>2</sub>-S, TiO<sub>2</sub>-D y ZnO, respectivamente.

Las NP de TiO<sub>2</sub>-S mostraron una captación celular elevada y dependiente de la dosis (Figura 9), siendo además ésta ligeramente superior en las células tratadas durante 6 h que en aquellas tratadas durante 3h.

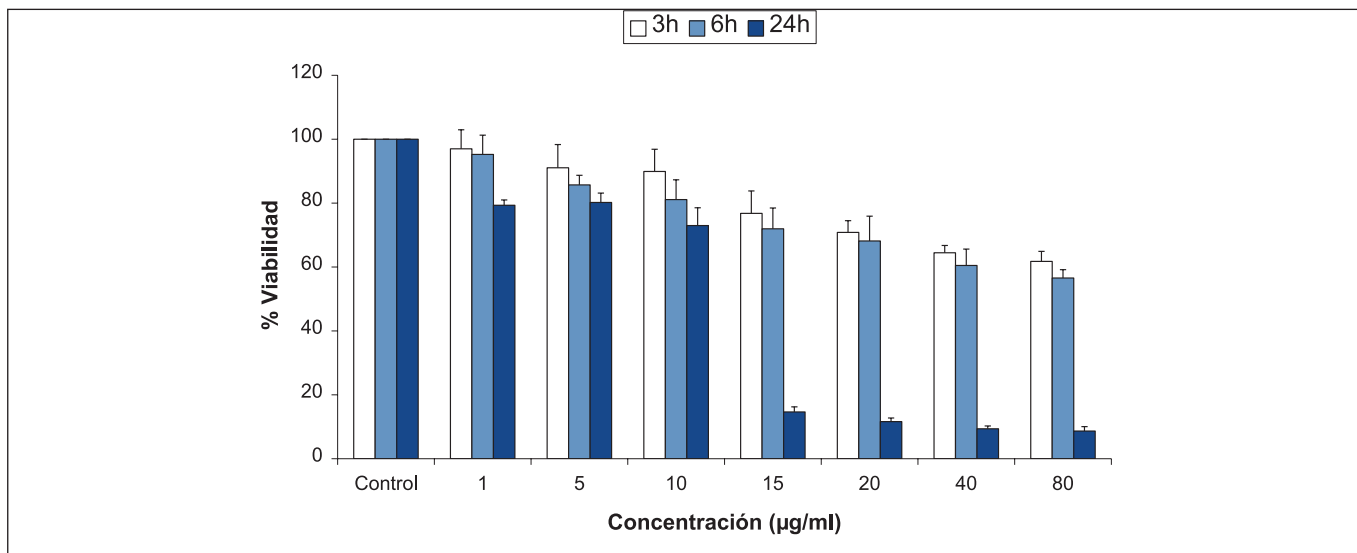


Figura 3. Resultados del ensayo MTT en células neuronales tratadas con NP de ZnO.

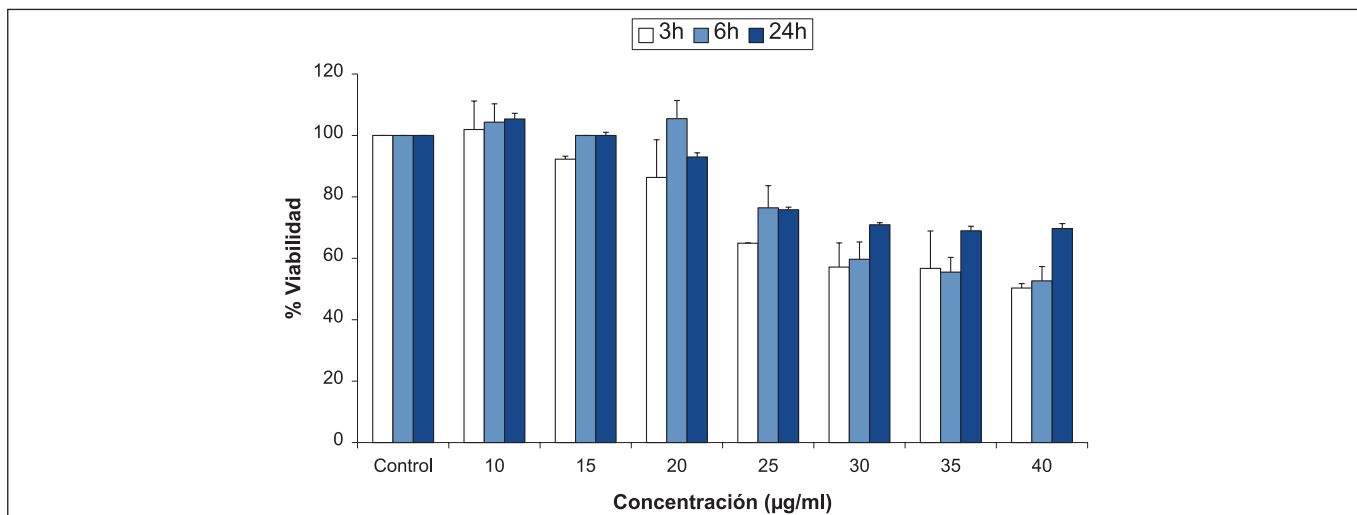


Figura 4. Resultados del ensayo NRU en células neuronales tratadas con NP de ZnO.

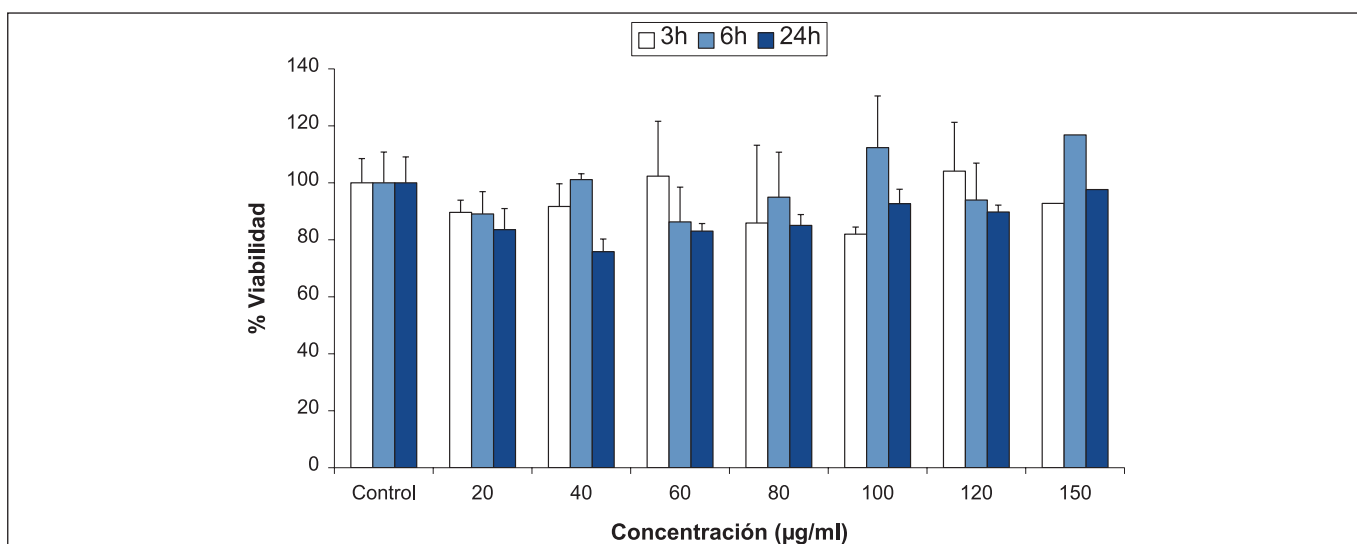


Figura 5. Resultados del ensayo MTT en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S.

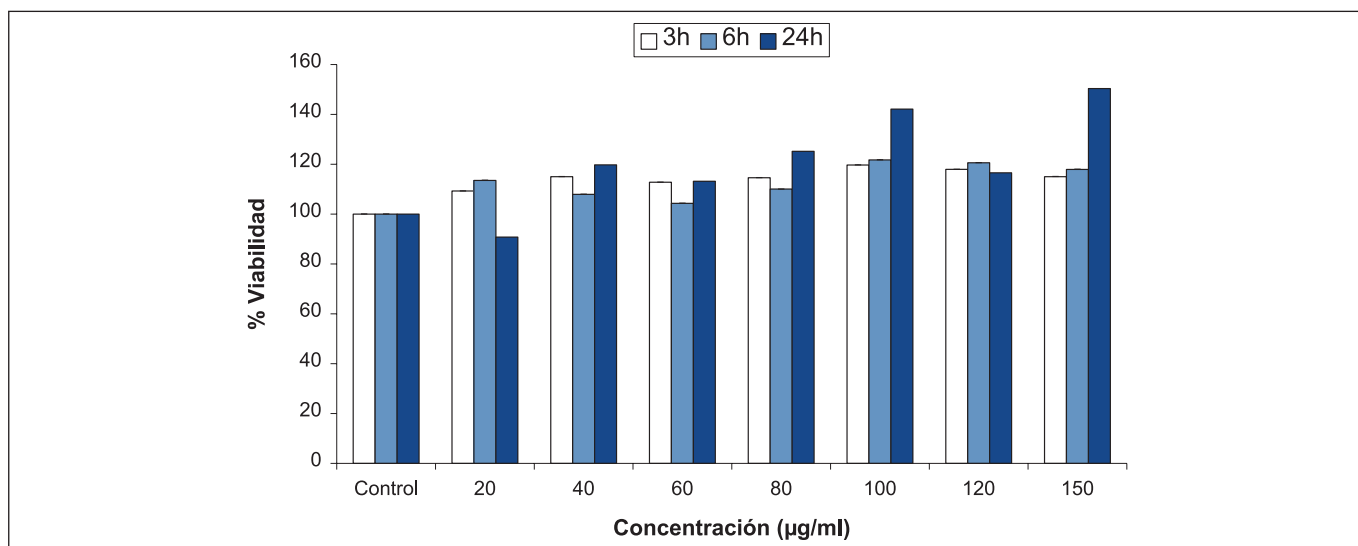


Figura 6. Resultados del ensayo NRU en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S.

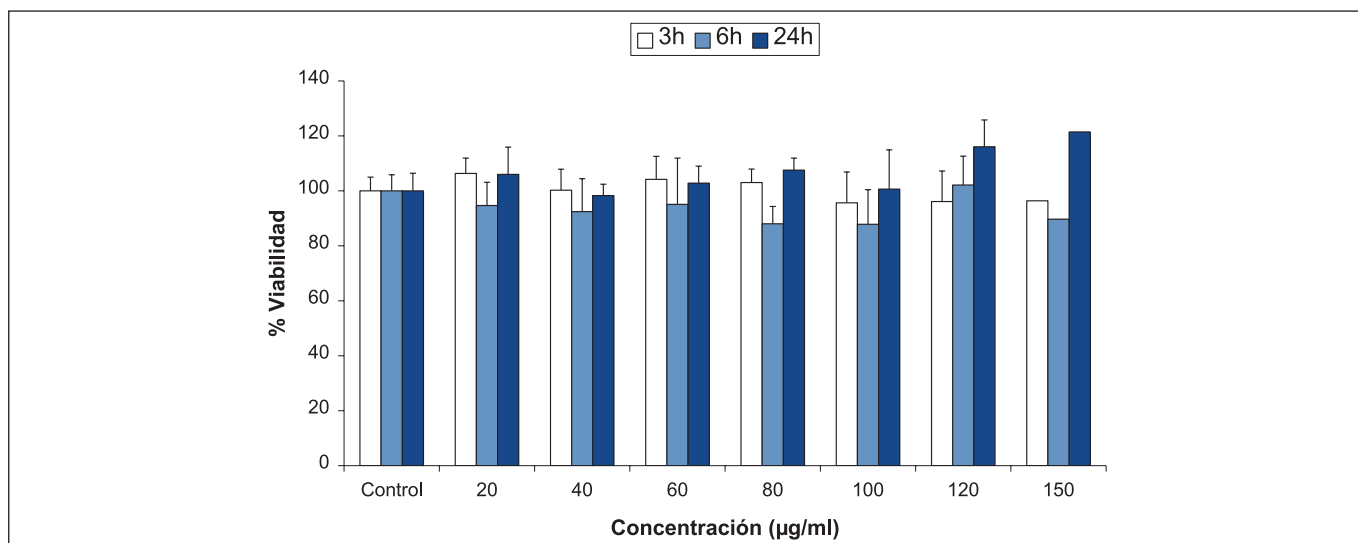


Figura 7. Resultados del ensayo MTT en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-D.

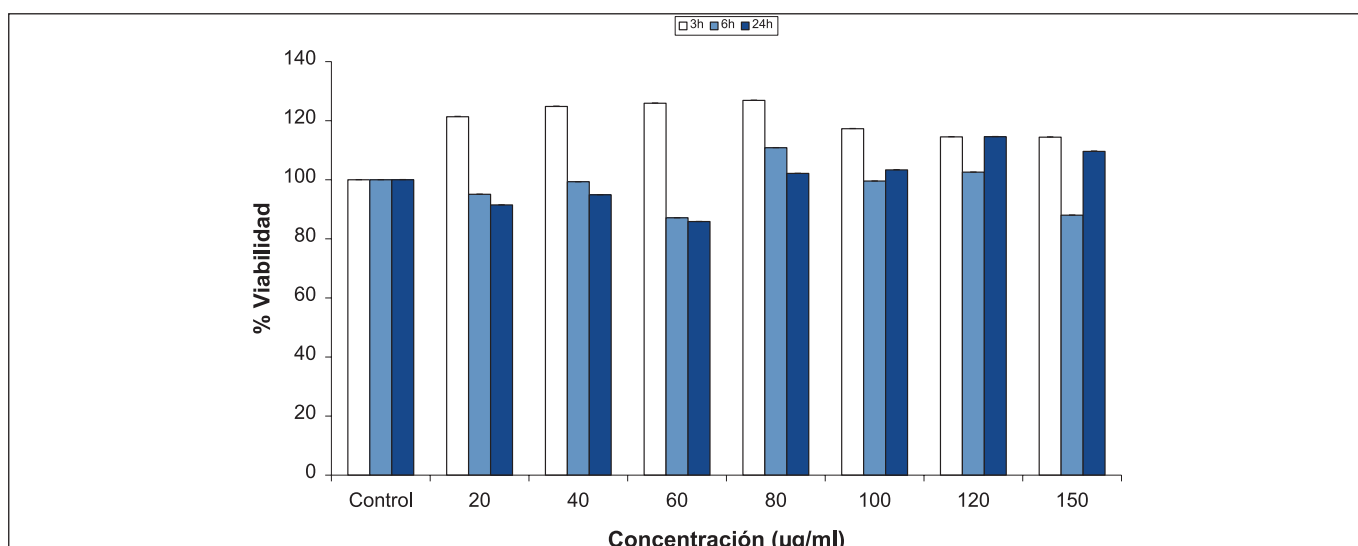


Figura 8. Resultados del ensayo NRU en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-D.



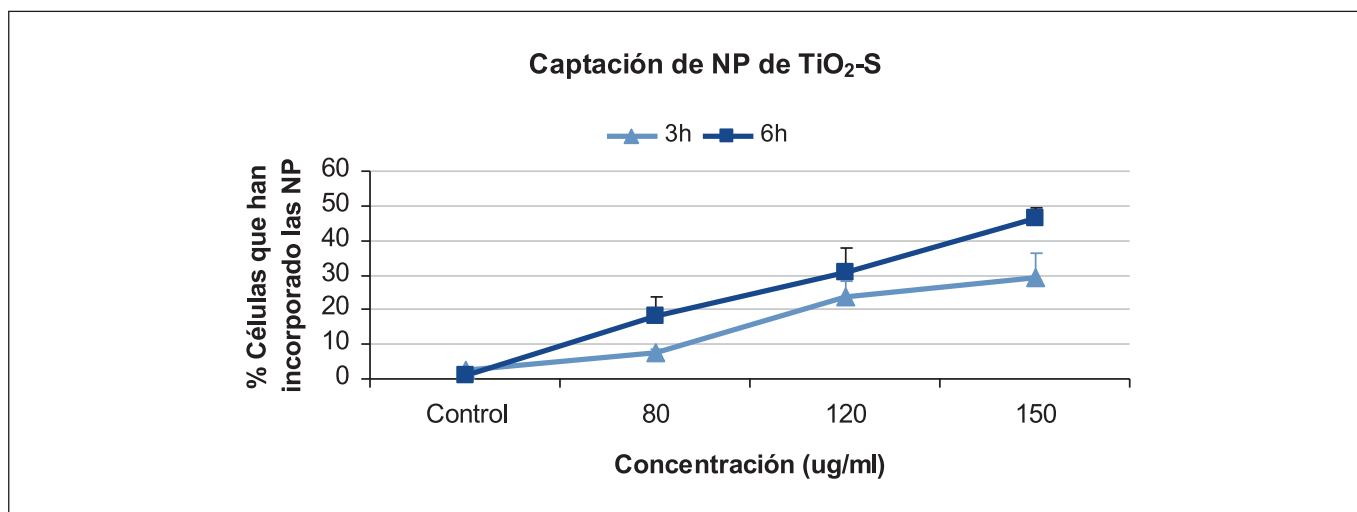


Figura 9. Captación celular de las NP de TiO<sub>2</sub>-S.

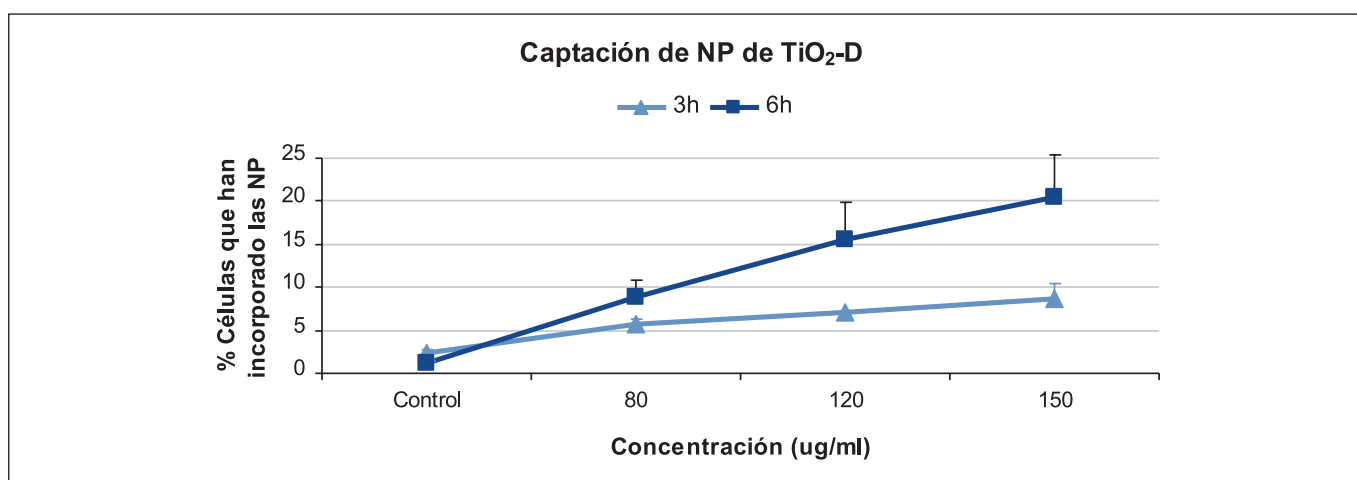


Figura 10. Captación celular de las NP de TiO<sub>2</sub>-D.

El comportamiento de las NP de TiO<sub>2</sub>-D fue bastante similar al de sus homólogas, con una relación dosis-respuesta positiva también en este caso (Figura 10), aunque los porcentajes de captación fueron siempre inferiores a los obtenidos a las mismas concentraciones para las NP de de TiO<sub>2</sub>-S (Figura 9). Se observó además una diferencia más pronunciada entre la captación celular obtenida a las 6 h y aquella obtenida a las 3h del inicio de los tratamientos.

Finalmente, y al contrario de lo obtenido para las NP de titanio, no se observó captación celular de NP de ZnO a ninguna de las concentraciones testadas ni para ninguno de los tiempos de exposición empleados (Figura 11). Lesniak *et al.* (2010) 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 verse afectada por parámetros distintos del tamaño y la forma de las NP (Kim *et al.*,

2012). 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.

### 3.5. Evaluación de la genotoxicidad

#### 3.5.1. Test de micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son pequeños cuerpos nucleares presentes en el citoplasma que contienen cromosomas completos o fragmentos cromosómicos que han quedado retrasados durante la anafase de la división nuclear. Proporcionan así información sobre procesos tanto de clastogénesis como de aneugénesis. En este trabajo se evaluó la inducción de MN por las NP testadas utilizando una metodología de citometría de flujo, siguiendo lo descrito en Nüsse *et al.* (1994) y Roman *et al.* (1998) con ligeras modificaciones (Valdiglesias *et al.*, 2011a).

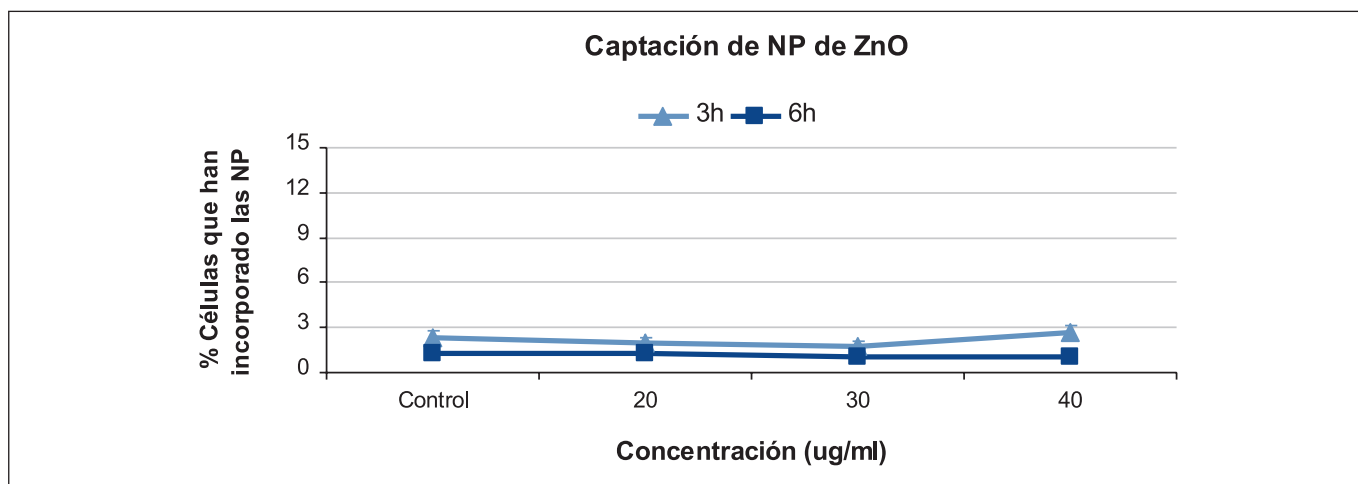


Figura 11. Captación celular de las NP de ZnO.

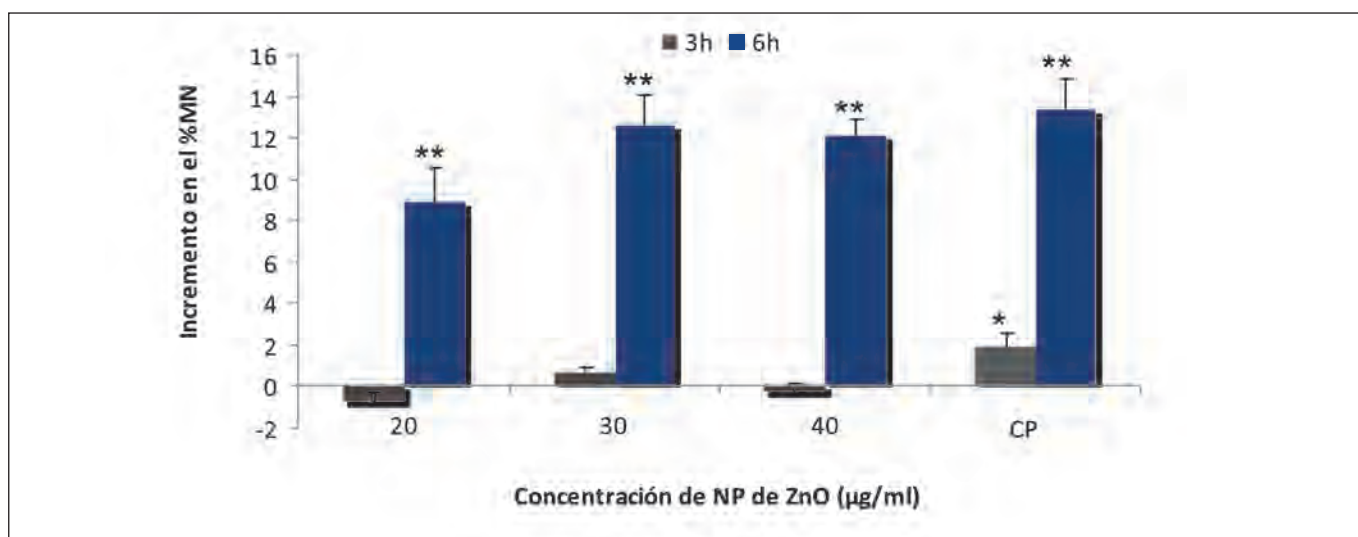


Figura 12. Resultados del test de MN en células neuronales tratadas con NP de ZnO. \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. PC: control positivo.

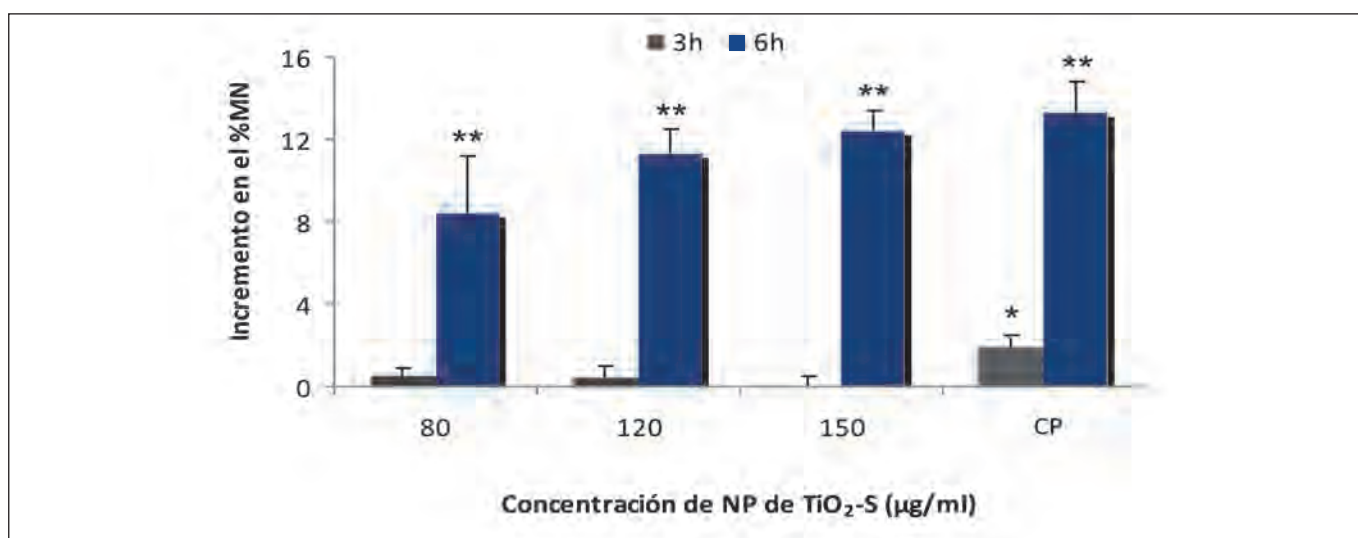
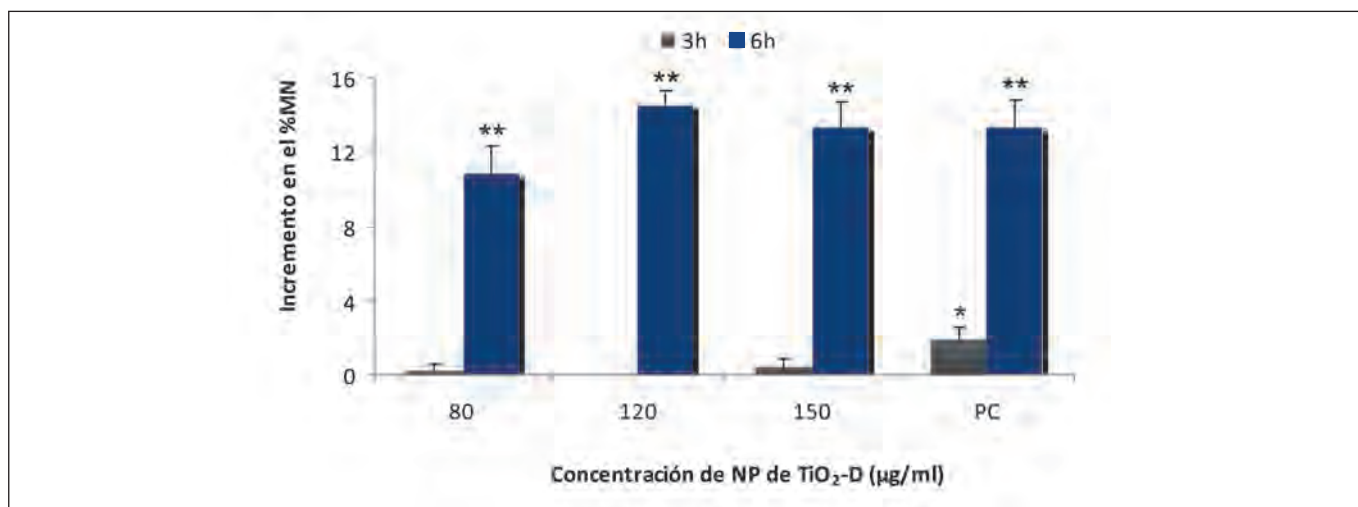


Figura 13. Resultados del test de MN en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. CP: control positivo.



**Figura 14.** Resultados del test de MN en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-D. \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. PC: control positivo.

A pesar de que no se obtuvieron alteraciones significativas en la inducción de MN en las células tratadas con NP de ZnO durante 3h, tras 6h de tratamiento se detectó una importante respuesta significativa y dependiente de la dosis (Figura 12).

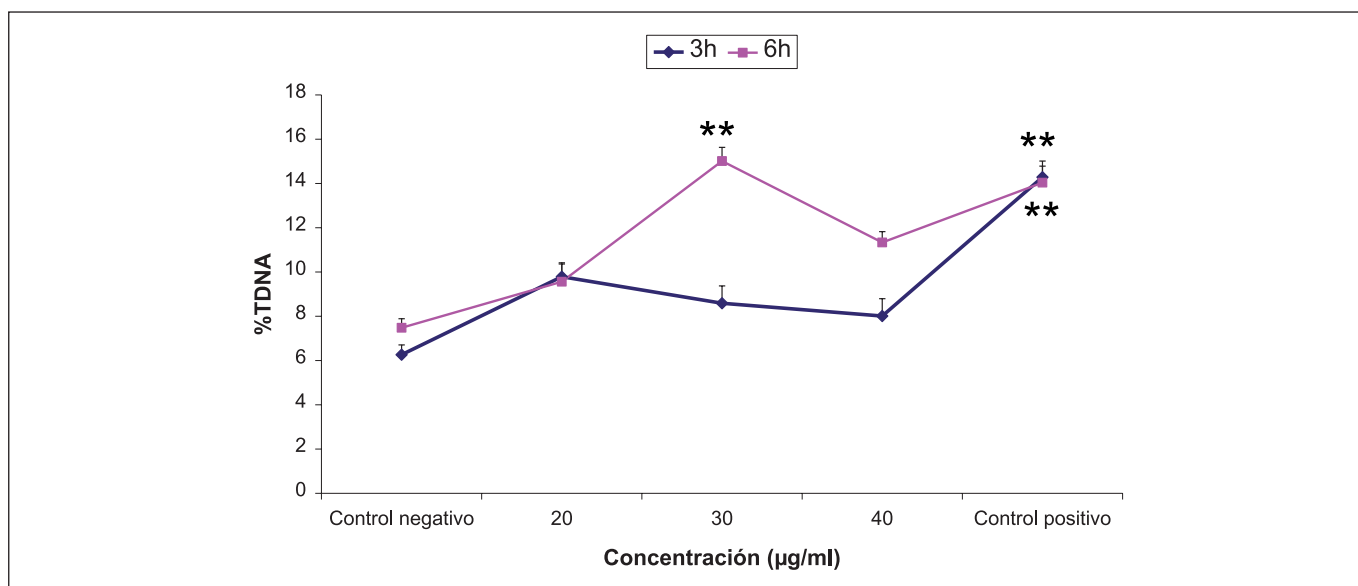
Los resultados obtenidos con las NP de TiO<sub>2</sub> fueron asimismo similares entre sí y también respecto a las NP de ZnO, es decir, respuestas negativas tras 3h de tratamiento pero positivas y dosis-dependientes tras el tratamiento más largo (Figuras 13 y 14).

### 3.5.2. Daño primario en el ADN

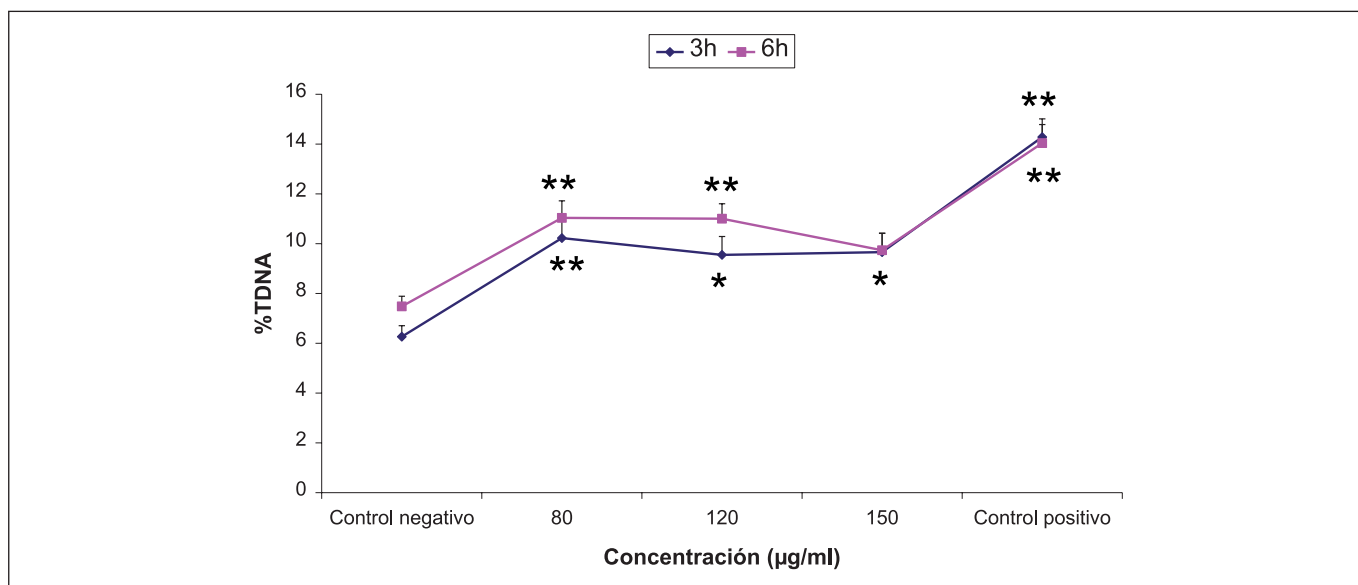
La determinación de daño primario en el ADN se llevó a cabo empleando la electroforesis en microgel de células aisladas, conocida comúnmente como ensayo del co-

meta. Mediante esta técnica sencilla, sensible y específica se evalúa el daño en el ADN (roturas de cadena simple y doble, lugares sensibles al álcali y procesos incompletos de reparación por escisión, en su versión alcalina) en células aisladas. Este ensayo se realizó según la metodología desarrollada por Singh *et al.* (1988), con ligeras modificaciones incorporadas en nuestro laboratorio (Laffon *et al.*, 2002).

En la Figura 15 se muestran los datos obtenidos tras la realización del ensayo del cometa en células neuronales tratadas con ZnO. No se han obtenido indicios significativos de genotoxicidad, al menos en lo que a daño primario en el ADN se refiere, inducida por las NP de ZnO tras el tratamiento de 3h, y únicamente un incremento significativo en el daño a la concentración de 30 µg/ml tras el tratamiento de 6h.



**Figura 15.** Resultados del ensayo del cometa en células neuronales tratadas con NP de ZnO. \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control negativo.



**Figura 16.** Resultados del ensayo del cometa en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control negativo.

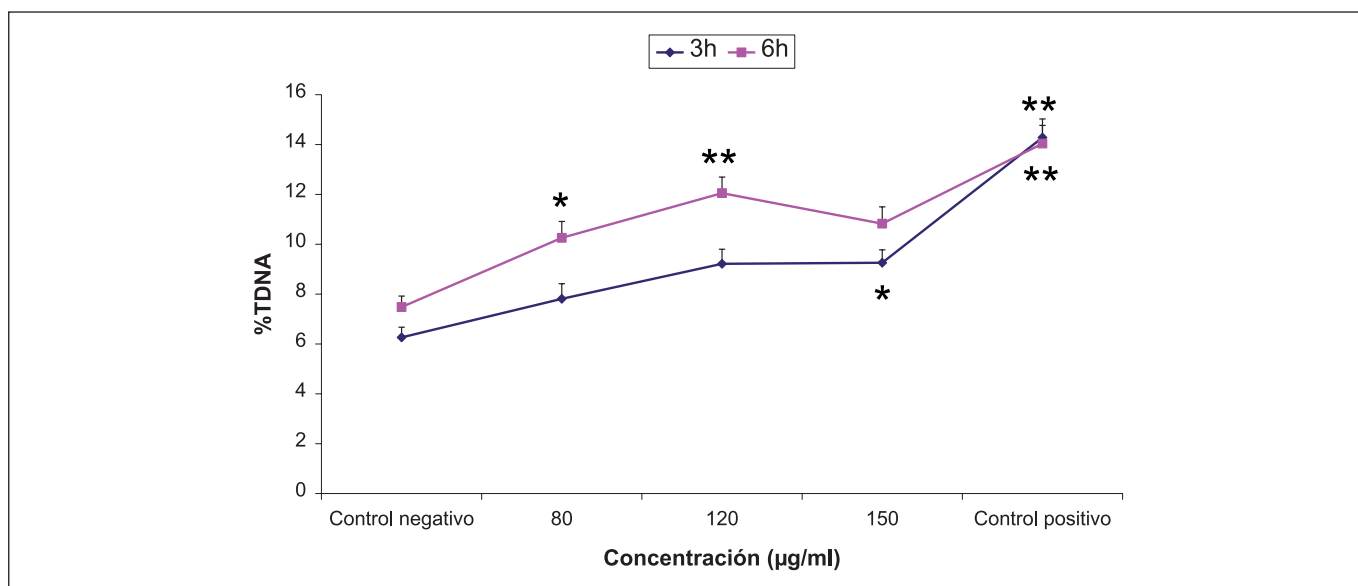
Los resultados obtenidos tras la incubación con NP de TiO<sub>2</sub> se recogen en las Figuras 16 y 17. Estos datos indican que el comportamiento de ambos tipos de NP es similar. Al contrario de lo que ocurrió con las NP de ZnO, se han obtenido resultados positivos tras ambos periodos de tratamiento (3 y 6h).

### 3.5.3. Fosforilación de la histona H<sub>2</sub>AX

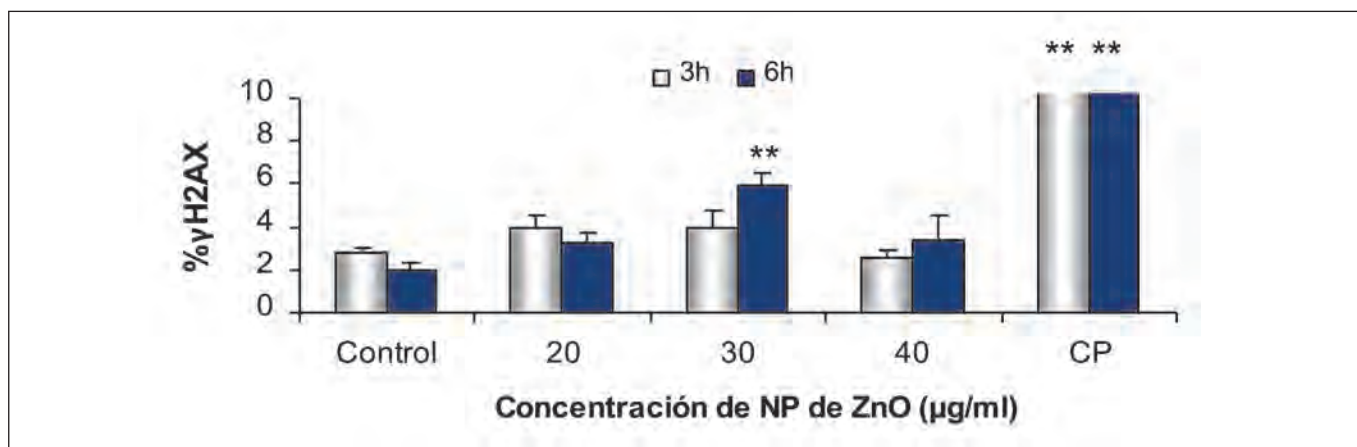
Los niveles de la forma fosforilada de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) se determinaron como marcadores de roturas de doble cadena en el ADN. Una de las primeras respuestas celulares ante la producción de roturas de doble cadena

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 información sobre eventos relacionados con clastogenicidad. Para el análisis se utilizó una metodología de citometría de flujo propuesta por Tanaka *et al.* (2009) con algunos cambios (Valdiglesias *et al.*, 2011a).

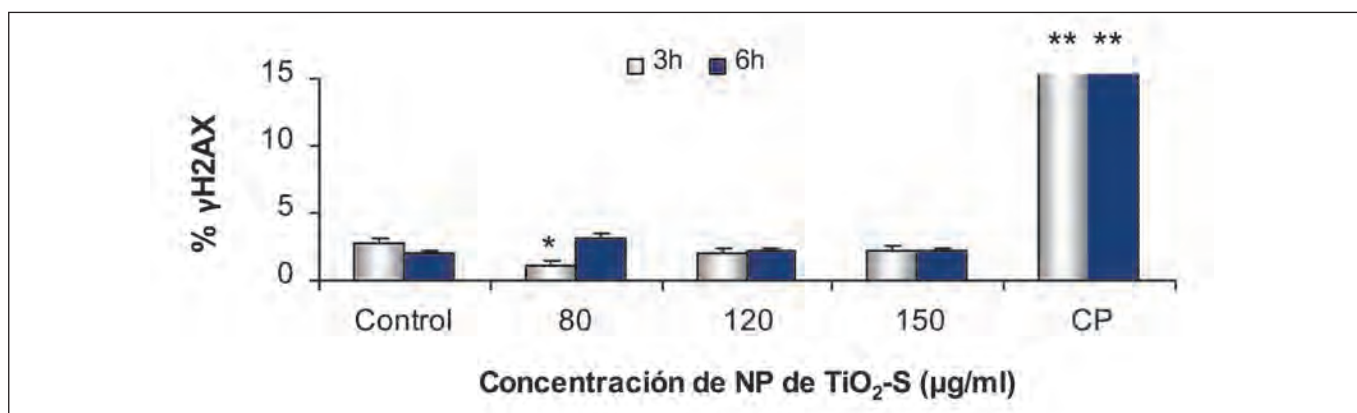
Los resultados obtenidos en este ensayo con las NP de ZnO se recogen en la Figura 18. No se encontraron diferencias significativas respecto al control tras el tratamiento de 3h, aunque después de 6h sí se observó un



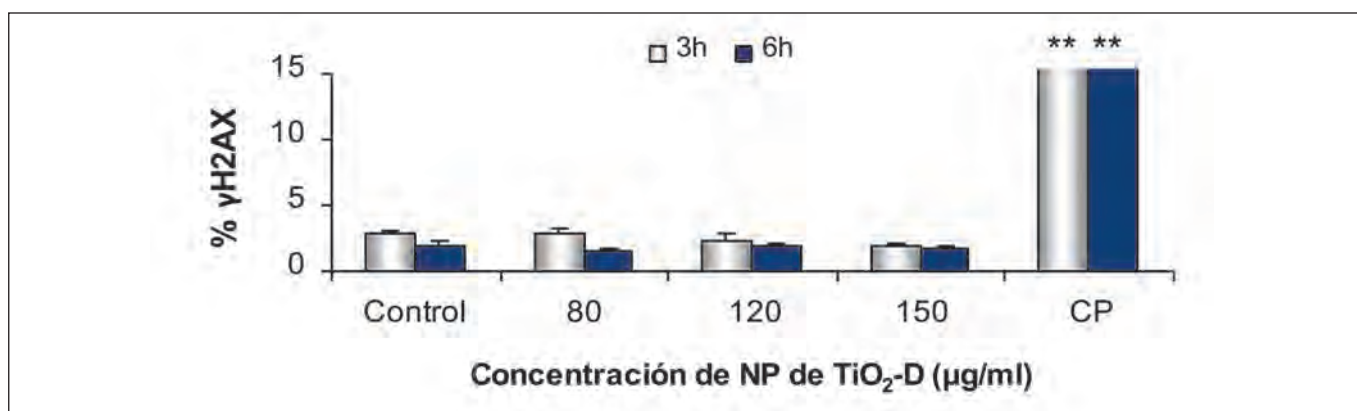
**Figura 17.** Resultados del ensayo del cometa en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-D. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control negativo.



**Figura 18.** Resultados del análisis de  $\gamma$ H2AX en células neuronales tratadas con NP de ZnO. \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. CP: control positivo.



**Figura 19.** Resultados del análisis de  $\gamma$ H2AX en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. CP: control positivo.



**Figura 20.** Resultados del análisis de  $\gamma$ H2AX en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-D. \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. CP: control positivo.

incremento significativo en los niveles de fosforilación de la histona en la concentración de 30  $\mu$ g/ml.

Las Figuras 19 y 20 muestran los resultados obtenidos en la aplicación de este ensayo a células neuronales tratadas con las dos NP de TiO<sub>2</sub>. Como se puede observar, ambos tipos de NP presentaron respuestas similares,

y no se produjeron alteraciones respecto a los correspondientes controles negativos tras ninguno de los dos tiempos de tratamiento testados.

En resumen, los resultados de los ensayos de genotoxicidad obtenidos para las NP de ZnO muestran una importante inducción de MN dependiente de la dosis tras 6h,

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 bibliografía sobre los efectos genotóxicos de las NP de ZnO en células nerviosas, que describen daño en el ADN en neuronas primarias de rata (Chiang *et al.*, 2012) e inducción de MN en células de glioma (Wahab *et al.*, 2011), a concentraciones muy similares a las empleadas en nuestro estudio.

Por su parte, los resultados para las NP de TiO<sub>2</sub> fueron similares. En el test de MN se obtuvo incremento significativo en el daño inducido solamente tras el tratamiento de 6h. No se observó ningún efecto sobre la fosforilación de la histona H2AX, mientras que en el ensayo del cometa se detectaron efectos positivos tras 3 y 6h 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> inducen daño en el ADN diferente de las roturas de cadena doble.

### 3.6. 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 glicosilasa OGG1, que permite la detección específica de daño oxidativo por reconocimiento del aducto 8-oxo-7,8-dihidroguanina. Este aducto constituye una de las lesiones en el ADN más abundantes y altamente mutagénicas (Laantri *et al.*, 2011), y ha sido ampliamente establecido como adecuado biomarcador de estrés oxidativo (Kuo *et al.*, 2007). En este ensayo se siguió la metodología desarrollada por Smith *et al.* (2006), ligeramente modificada en nuestro laboratorio (Valdiglesias *et al.*, 2011b).

Los resultados obtenidos en la determinación del daño oxidativo en las tres NP testadas se recogen en las Figuras 21, 22 y 23. Las NP de ZnO indujeron daño oxidativo en el ADN tras 3 y 6h de incubación. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos empleando distintos tipos celulares (De Berardis *et al.*, 2010; Akhtar *et al.*, 2012) y animales de experimentación (Fukui *et al.*, 2012).

Sin embargo, no se observó daño oxidativo tras el tratamiento con las NP de TiO<sub>2</sub>, a ninguna concentración ni tiempo de exposición. 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> (Long *et al.*, 2007; Petkovic *et al.*, 2011), ya se han propuesto mecanismos alternativos para la toxicidad de estas NP, como la interacción con diferentes componentes celulares como los microtúbulos (Gheshlaghi *et al.*, 2008).

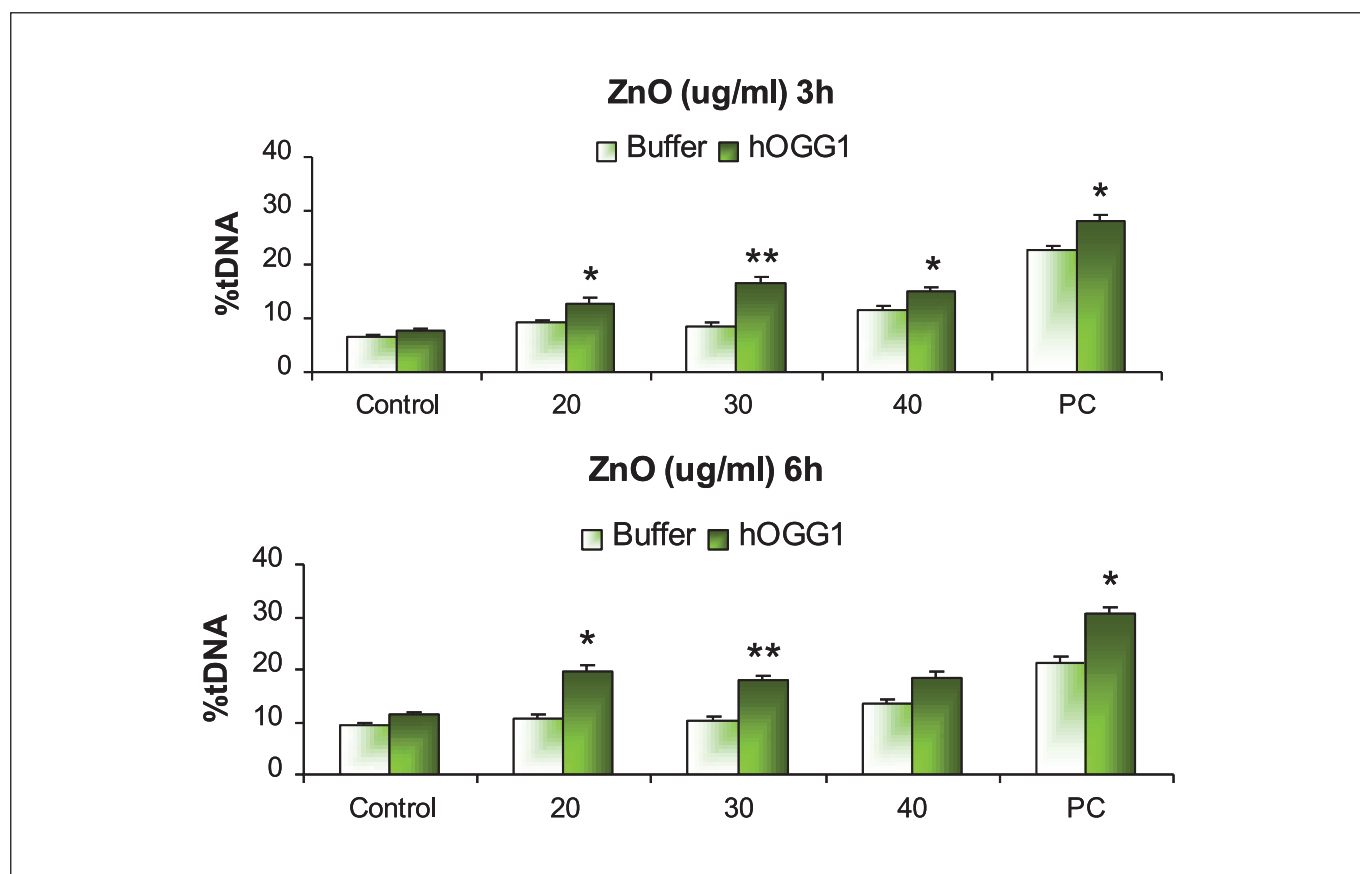


Figura 21. Resultados del ensayo del cometa modificado con la enzima hOGG1 en células neuronales tratadas con NP de ZnO. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al *buffer*. PC: control positivo.

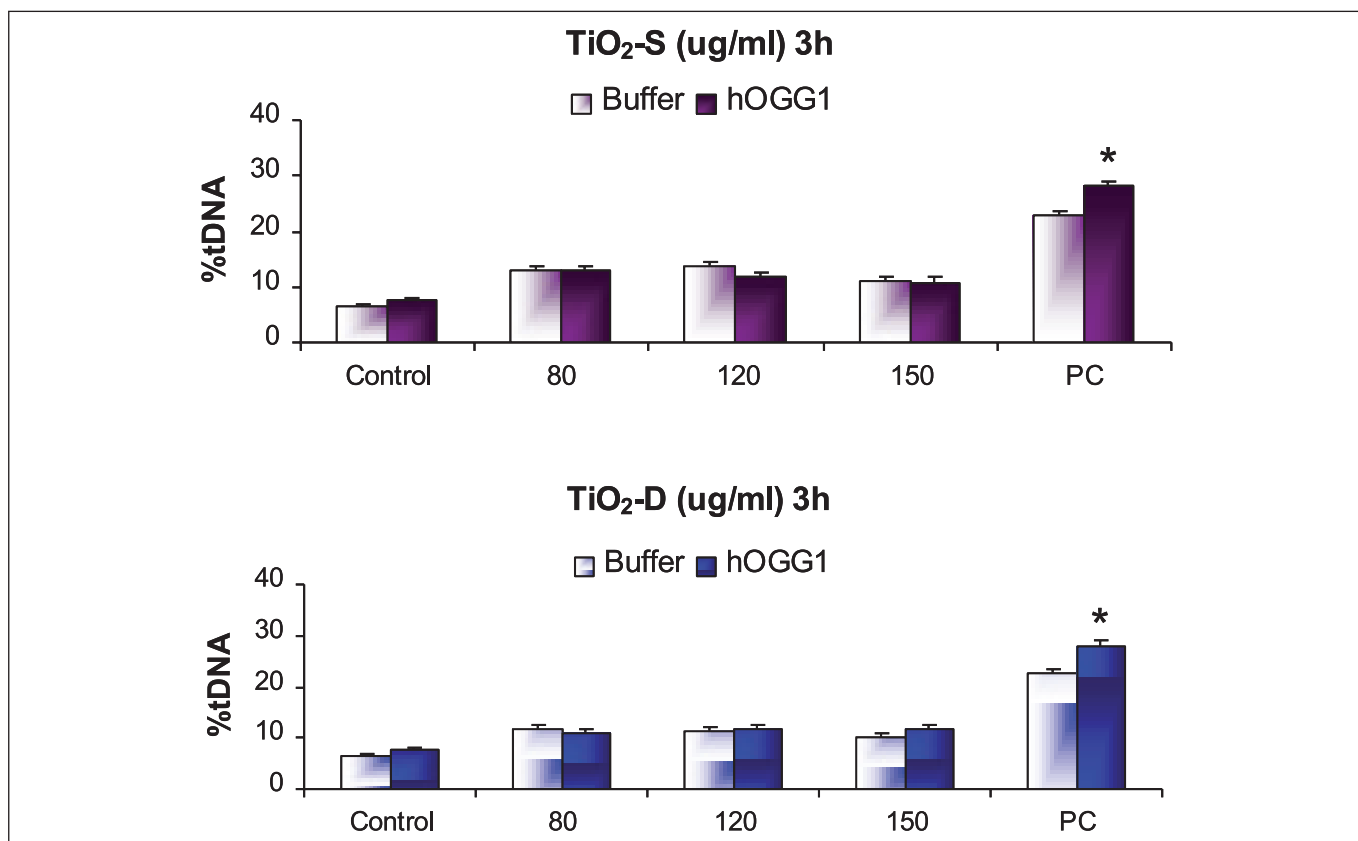


Figura 22. Resultados del ensayo del cometa modificado con la enzima hOGG1 en células neuronales tratadas con las dos NP de TiO<sub>2</sub> durante 3h. \* $P < 0.05$ , diferencia significativa respecto al *buffer*. PC: control positivo.

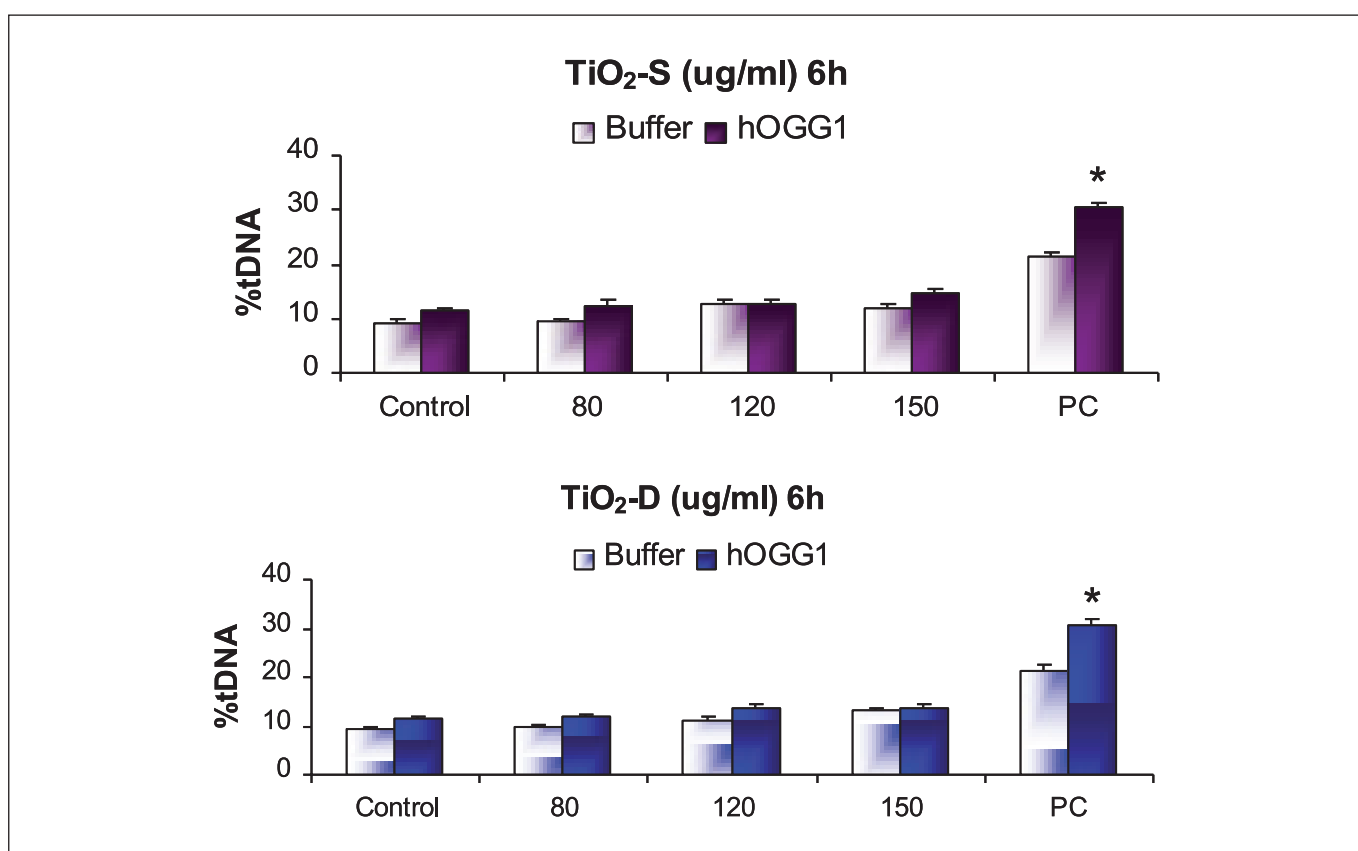


Figura 23. Resultados del ensayo del cometa modificado con la enzima hOGG1 en células neuronales tratadas con las dos NP de TiO<sub>2</sub> durante 6h. \* $P < 0.05$ , diferencia significativa respecto al *buffer*. PC: control positivo.



### 3.7. Apoptosis

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

Los resultados obtenidos con las NP de ZnO se muestran en la Figura 24. Se observaron incrementos significativos en el porcentaje de células apoptóticas tras ambos tiempos de tratamiento testados, aunque no se detectaron alteraciones significativas en el potencial de membrana mitocondrial. Parece por tanto que nuestros resultados sugieren 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 (Deng *et al.* 2009; Wahab *et al.* 2011; Akhtar *et al.* 2012).

Tras el tratamiento de las células SHSY5Y con ambos tipos de NP de TiO<sub>2</sub> se obtuvieron igualmente incrementos dependientes de la dosis en el porcentaje de células apoptóticas, pero en este caso se acompañaron de descensos significativos en el potencial de membrana mitocondrial, sugiriendo implicación de este orgánulo en la vía apoptótica utilizada (vía intrínseca) (Figuras 25 y 26). 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> (Wu *et al.* 2010; Xue *et al.* 2010).

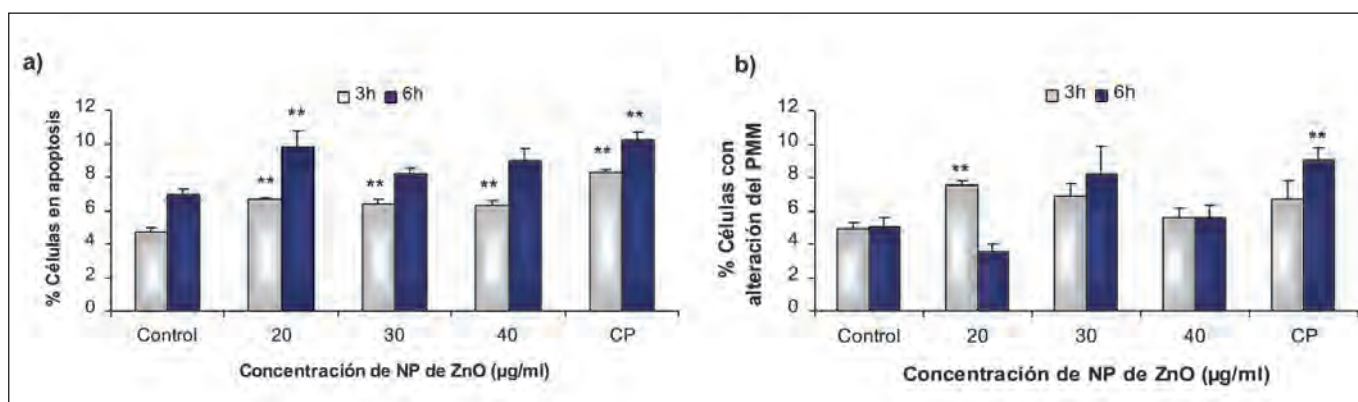


Figura 24. Resultados del análisis de apoptosis, doble tinción anexinaV-ioduro de propidio (a) y análisis del potencial de membrana mitocondrial (MMP) (b), en células neuronales tratadas con NP de ZnO. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. PC: control positivo.

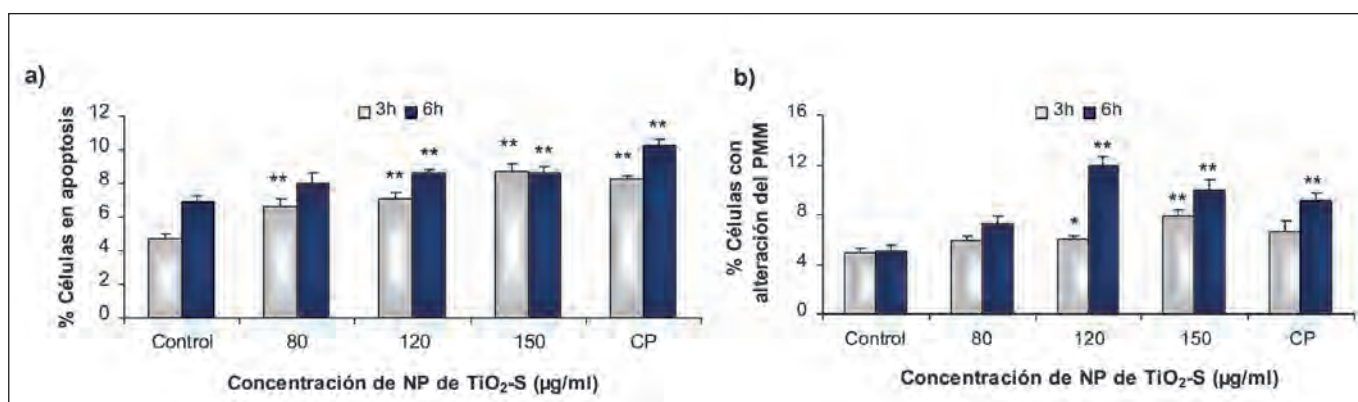
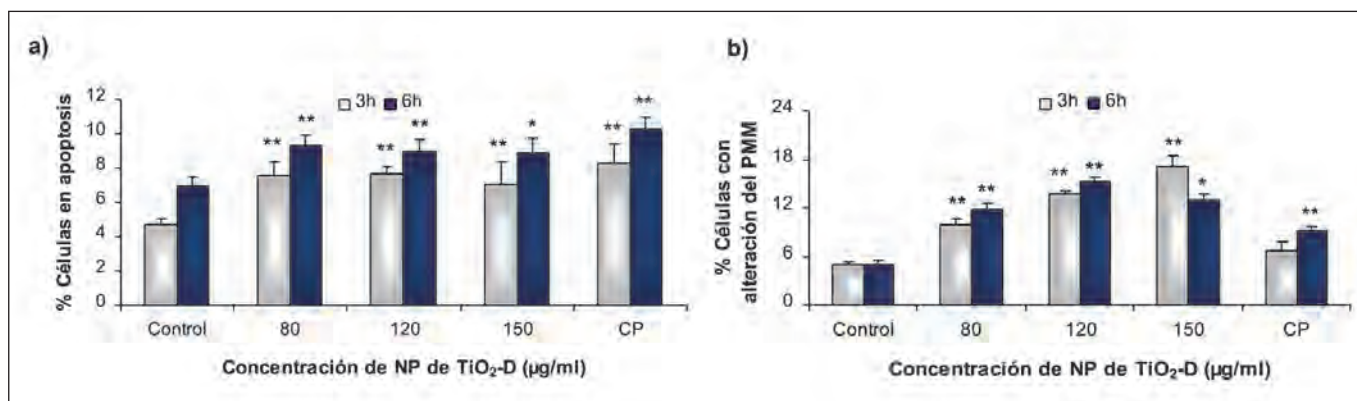


Figura 25. Resultados del análisis de apoptosis, doble tinción anexinaV-ioduro de propidio (a) y análisis del potencial de membrana mitocondrial (MMP) (b) en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-S. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. CP: control positivo.





**Figura 26.** Resultados del análisis de apoptosis, doble tinción anexinaV-ioduro de propidio (a) y análisis del potencial de membrana mitocondrial (MMP) (b), en células neuronales tratadas con NP de TiO<sub>2</sub>-D. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencia significativa respecto al control. PC: control positivo.

## 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten deducir las siguientes conclusiones generales:

- A pesar del hecho de que las NP de ZnO no penetran en el interior de las células neuronales utilizadas, la exposición a estas NP induce descenso de la viabilidad, alteraciones morfológicas, genotoxicidad (incluyendo daño oxidativo en el ADN) y apoptosis, siendo la mayor parte de estos efectos proporcional a la dosis de NP aplicada y al tiempo de exposición.
- El comportamiento de los dos tipos de NP de TiO<sub>2</sub> es comparable, a pesar de su diferente composición cristalina. No producen citotoxicidad, 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.

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 a los efectos observados en este estudio, y para desarrollar las medidas de seguridad y límites de exposición para la gente que trabaja con materiales que contienen estos tipos de NP, y también para aquellos que pueden estar expuestos a ellos cuando son implementados en aplicaciones comerciales, industriales y médicas.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. 2012. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine* 7, 845-857.
- Ball P. 2006. Nanoparticles in sun creams can stress brain cells. *Nature news*.
- Borenfreund E, Puerner JA. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24, 119-124.
- Chiang HM, Xia Q, Zou X, Wang C, Wang S, Miller BJ, Howard PC, Yin JJ, Beland FA, Yu H, Fu PP. 2012. Nanoscale ZnO induces cytotoxicity and DNA damage in human cell lines and rat primary neuronal cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 12, 2126-2135.
- De Berardis B, Civitelli G, Condello M, Lista P, Pozzi R, Arancia G, Meschini S. 2010. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 246, 116-127.
- 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.
- Fukui H, Horie M, Endoh S, Kato H, Fujita K, Nishio K, Komaba LK, Maru J, Miyauhi A, Nakamura A, Kinugasa S, Yoshida Y, Hagihara Y, Iwahashi H. 2012. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chemico-Biological Interactions* 198, 29-37.
- Gheshlaghi ZN, Riazi GH, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R. (2008). Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 40:777-782.

- Hsiao IL, Huang YJ. 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ* 409, 1219-1228.
- Kang SJ, Lee YJ, Kim BM, Choi YJ, Chung HW. 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in UVA-irradiated normal peripheral blood lymphocytes. *Drug Chem Toxicol* 34, 277-284.
- Kim JA, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. 2011. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nat Nanotechnol* 7, 62-68.
- Kreyling W, Möller, W., Semmler-Behnke, M., and Oberdörster, G. 2007. Particle Dosimetry: Deposition and clearance from the respiratory tract and translocation towards extra-pulmonary sites. Francis & Taylor, Boca Raton.
- Kuo H-W, Chou S-Y, Hu T-W, Wu F-Y, Chen D-J. 2007. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res* 631: 62-68.
- 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. 2011. XRCC1 and hOGG1 genes and risk of nasopharyngeal carcinoma in north African countries. *Mol Carcinog* 50, 732-737.
- Laffon B; Pásaro E; Méndez J. 2002. DNA damage and repair in human leukocytes exposed to styrene-7,8-oxide measured by the comet assay. *Toxicol Lett* 126, 61-68.
- Lesniak A, Campbell A, Nonopoli MP, Lynch I, Salvati A, Dawson KA. 2010. Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* 31, 9511-9518.
- Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B. 2007. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect* 115, 1631-1637.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Nüsse M, Beisker W, Kramer J, Miller BM, Schreiber GA, Viaggi S, Weller EM, Wessels JM. 1994. Measurement of micronuclei by flow cytometry. *Methods Cell Biol* 42, 149-158.
- Osman IF, Baumgartner A, Cemeli E, Fletcher JN, Anderson D. 2010. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEP-2 cells. *Nanomedicine* 5, 1193-1203.
- PEN. 2009. Project of the Emerging Nanotechnologies (PEN). Disponible en: <<http://www.nanotechproject.org>>.
- Petkovi J, Zegura B, Stevanovi M, Drmovšek N, Uskokovi D, Novak S, Filipi M. (2011). DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO<sub>2</sub> nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology* 5, 341-353.
- Phibbs-Rizzuto P. 2007. Study of nanoparticles' effect on protein said important, but more research needed. *Daily Environment Report* 107, A-4.
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* 3, 1125-1131
- Roman D, Locher F, Suter W, Cordier A, Bobadilla M. 1998. Evaluation of a new procedure for the flow cytometric analysis of in vitro, chemically induced micronuclei in V79 cells. *Environ Mol Mutagen* 32, 387-396.
- Serena PAD. 2010. ¿Qué sabemos de la nanotecnología? CSIC. Ed. Catarata. Madrid.
- 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, 852-870.
- Sharma V, Shukla R, Saxenab N, Parmara D, Das M, Dhawan A. 2009. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Lett* 185, 211-218.
- Shukla RK, Sharma V, Pande AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol in Vitro* 25, 231-241.
- Singh NP, McCoy MT, Tice, RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA. 2006. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 21, 185-190.
- Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. 2007. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol* 41, 3018-3024.
- Tanaka T, Halicka D, Traganos F, Darzynkiewicz Z. 2009. Cytometric analysis of DNA damage, phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks (DSBs). *Methods Mol Biol* 523, 161-168.
- Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, Cemeli E, Anderson D, Méndez J. 2011b. Induction of oxidative DNA damage by the marine toxin okadaic acid depends on human cell type. *Toxicol* 57, 882-888.
- Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, Méndez J. 2011a. Okadaic acid-induced genotoxicity in human cells evaluated by micronucleus test and H2AX analysis. *J Toxicol Environ Health* 74, 980-992.
- Wahab R, Kaushik NK, Verma AK, Mishra A, Hwang IH, Yang YB, Shin HS, Kim YS. 2011. 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* 16, 431-442.
- 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.
- 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.

#### Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.