

EFFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS INDUSTRIALES TiO₂, SiO₂ Y ZnO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y EXPRESIÓN GÉNICA EN MÉDULA OSEA ROJA DE *Mus musculus*

Jacquelyne Zarría-Romero^{1,a}, Ana Osorio^{2,b}, José Pino^{1,c}, Betty Shiga^{1,c}, Dan Vivas-Ruiz^{3,d}

RESUMEN

Objetivos. Evaluar el efecto de las nanopartículas de ZnO, TiO₂ y SiO₂ sobre la viabilidad celular y la expresión génica de las interleuquinas 7 y 3 y del factor estimulante de colonias de granulocito – macrófago (GM-CSF) en *Mus musculus*. **Materiales y métodos.** Se extrajo médula ósea roja de cinco roedores (Balb/c) para el estudio de viabilidad celular mediante la prueba de MTT. Por otro lado, grupos cinco roedores fueron inoculados vía intraperitoneal con dosis de 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg/kg de nanopartículas de ZnO y SiO₂ y de 5; 10; 15; 20 y 25 mg/kg de nanopartículas de TiO₂, 30 h después, se obtuvo el ARN a partir de la médula ósea roja para los análisis de expresión génica empleando las técnicas de PCR y RT-PCR cuantitativa. **Resultados.** Las nanopartículas de ZnO y SiO₂ redujeron la viabilidad celular de una manera dosis-dependiente en un 37 y 26%, respectivamente, a partir de una dosis de 1 mg/kg. En cuanto al efecto sobre la expresión génica, a las dosis 5 y 10 mg/kg, las nanopartículas de TiO₂ redujeron en mayor porcentaje la expresión de las interleuquinas 7 y 3 (55,3 y 70,2% respectivamente), con respecto a la expresión del GM-CSF, el mayor porcentaje de reducción lo produjo las nanopartículas de SiO₂ (91%). Las nanopartículas de ZnO redujeron a partir de las dosis de 20 y 25 mg/kg. **Conclusiones.** Las nanopartículas de ZnO, SiO₂ y TiO₂ alteran la viabilidad celular y la expresión génica en la médula ósea de ratón.

Palabras clave: Nanopartículas; Interleucinas; Expresión génica; *Mus musculus* (fuente: DeCS BIREME).

EFFECT OF THE INDUSTRIAL NANOPARTICLES TiO₂, SiO₂ AND ZnO ON CELL VIABILITY AND GENE EXPRESSION IN RED BONE MARROW OF *Mus musculus*

ABSTRACT

Objectives. To evaluate the effect of ZnO, TiO₂ and SiO₂ nanoparticles on cell viability and expression of the interleukin 7, interleukin 3, and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) genes in *Mus musculus*. **Materials and methods.** Red bone marrow was extracted from five Balb/c mice for the analysis of cell viability using the MTT test. The mice were divided into two groups of five each: one group was inoculated intraperitoneally with 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10 mg/kg of ZnO and SiO₂ nanoparticles, respectively, and the other group was inoculated with 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, and 25 mg/kg of TiO₂ nanoparticles, respectively. Thirty hours later, RNA was extracted from the red bone marrow of the mice in both groups for gene expression analysis using quantitative PCR and RT-PCR. **Results.** ZnO and SiO₂ nanoparticles reduced cell viability in a dose-dependent manner by 37% and 26%, respectively, starting at a dose of 1 mg/kg. TiO₂ nanoparticles at 5 mg/kg and 10 mg/kg reduced the gene expression of interleukins 7 and 3 by 55.3% and 70.2%, respectively, and SiO₂ nanoparticles caused the greatest decrease (91%) in the expression of GM-CSF. ZnO nanoparticles reduced the expression of GM-CSF starting at doses of 20 mg/kg and 25 mg/kg. **Conclusions:** ZnO, SiO₂ and TiO₂ nanoparticles affect cell viability and gene expression in the mouse bone marrow.

Key words: Nanoparticles; Interleukins; Genic expression; *Mus musculus* (source: MeSH NLM).

¹ Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

² Laboratorio de Nanotecnología e Innovación Tecnológica. Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

³ Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

^a Biólogo, magister en Biología Molecular; ^b ingeniero químico, magister en Ciencias Químicas; ^c biólogo, bachiller en Ciencias Biológicas; ^d biólogo, doctor en Ciencias Biológicas

* La presente investigación es parte de la tesis de maestría en Biología Molecular de Jacquelyne Zarría Romero.

Recibido: 29/09/2016 Aprobado: 07/06/2017 En línea: 11/09/2017

INTRODUCCIÓN

Se define como nanopartícula (NP) a toda aquella partícula que posee una longitud entre 1 a 100 nm en sus dos o tres dimensiones, con tamaño superior a los átomos y las moléculas⁽¹⁾. Las NP son producidas en forma natural (incendios forestales, erupciones volcánicas, etc.) o de manera artificial a través de métodos físicos y químicos⁽²⁾. Las NP están presentes en la vida cotidiana y en los procesos industriales, en su conjunto, constituyen una de las piedras angulares de las nanociencias y la nanotecnología⁽²⁾.

El uso de las NP y los nanomateriales, se ha incrementado vertiginosamente en los campos de la electrónica, la óptica, la industria alimentaria, textil, del cemento, plásticos, y en la medicina^(3,4). En cuanto al uso humano directo, las NP se encuentran en una serie de productos como cosméticos, bloqueadores, dentífricos, alimentos y medicamentos; adicionalmente, la exposición no voluntaria se da por inhalación en los lugares de trabajo (industrias y parque automotriz)⁽⁵⁾.

Un caso particular se presenta con las NP de óxido de zinc (ZnO), dióxido de silicio (SiO₂) y de dióxido de titanio (TiO₂) ampliamente requeridas en la industria alimentaria y en el sector salud. Las NP de TiO₂ y SiO₂ son usadas para mejorar el color, textura, sabor y como conservadores de fragancias y sabores; en tanto que las NP de ZnO son usadas como agentes antibacterianos en empaques para alimentos⁽⁶⁾. En el campo de la biomedicina, estas NP tienen potencialidad para ser empleadas en terapia génica, administración dirigida de medicamentos e imágenes biomédicas, biodetección de patógenos, detección de proteínas, pruebas acerca de la estructura del DNA, ingeniería de tejidos, destrucción tumoral, estudios fagocinéticos, etc.^(4,7).

No obstante, al igual que con otras NP, las NP de ZnO, SiO₂ y TiO₂ han sido señaladas como potenciales agentes perjudiciales para la salud humana y el medioambiente⁽⁸⁾. Estudios previos para estas tres NP han reportado su efecto citotóxico en los fibroblastos pulmonares humanos⁽⁹⁾, un efecto inflamatorio en las células intestinales mediante la producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁽⁶⁾ así como también efecto genotóxico y citotóxico en modelos vegetales⁽¹⁰⁾. Por estas evidencias, los autores recomiendan una extrema atención para el uso seguro de estos nanomateriales⁽⁹⁾.

Guiados por algunos de estos trabajos previos, en el 2015, nuestro grupo de investigación demostró el efecto genotóxico y citotóxico que producen estas tres NP en las células de la médula ósea roja (MOR) de ratón⁽¹¹⁾, un modelo biológico universalmente usado para este tipo de estudios por su alto grado de adaptabilidad, y por su semejanza, en ciertos aspectos fisiológicos, al ser humano⁽¹²⁾. Los resultados obtenidos en esta investigación promovieron el interés de continuar los estudios del efecto de estas tres NP sobre la viabilidad celular y la expresión génica de moléculas que median la proliferación y supervivencia celular.

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio. Los conocimientos de los efectos nocivos de las nanopartículas en nuestro país son aún desconocidos, sin embargo, las nanopartículas son ampliamente utilizadas en el sector industrial manufacturero; por ello, es necesario brindar información sobre los efectos perjudiciales que pueden causar y así tomar medidas preventivas.

Principales hallazgos. Las nanopartículas de TiO₂, SiO₂ y ZnO causan daño en la supervivencia celular y la expresión de genes de la médula ósea de ratón, modelo biológico muy similar al humano.

Implicancias. Promover el estudio de la toxicidad de las nanopartículas presentes en los productos de uso cotidiano.

Para tal efecto, la presente investigación tuvo como un primer objetivo, evaluar el efecto de las NP de ZnO, SiO₂ y TiO₂ sobre la viabilidad celular de la MOR de ratón; como segundo objetivo, se estudió el efecto sobre la expresión génica de las interleuquinas 3 (IL-3) y 7 (IL-7) y el factor estimulante de colonias de granulocito – macrófago (GM-CSF), moléculas producidas en la MOR y otros grupos celulares especializados (linfocitos T, B, etc.), y que son estimuladoras de la proliferación y supervivencia de diversos linajes celulares del sistema inmune⁽¹³⁾.

MATERIALES Y MÉTODOS

NANOPARTÍCULAS

Se realizó un estudio del tipo cuantitativo analítico experimental. Las NP de ZnO, SiO₂ y TiO₂ fueron proporcionadas por el Laboratorio de Nanotecnología e Innovación Tecnológica (LNIT) de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). La dispersión de las partículas se realizó por ultrasonido en agua ultrapura con el equipo de ultrasonido marca Branson modelo 550 del Laboratorio de Equipamiento Especializado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. La caracterización de las NP se realizó mediante análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS) en el equipo NICOMP nano 300 (LNIT) y la visualización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el microscopio marca JEOL, modelo JEM-2100HT del Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid, España.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Fueron empleados en total 70 ratones de la cepa albina Balb/C (18-22 g) procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud y mantenidos bajo condiciones estándares en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. El manejo, cuidado y experimentación de los roedores fueron desarrollados de acuerdo a la *Guide for care and use of laboratory animals*⁽¹⁴⁾.

PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Con base en el estudio previo ⁽¹¹⁾ se prepararon las dosis (en mg de nanopartícula/kg de peso) correspondientes a 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg para las NP de SiO₂ y ZnO y de 5; 10; 15; 20 y 25 mg para las NP de TiO₂ diluidas en solución salina e inyectadas vía intraperitoneal con jeringas tipo tuberculina. Se emplearon grupos de cinco ratones por cada dosis de NP correspondiente. Como control negativo se empleó solución de NaCl al 0,9%. Los roedores fueron mantenidos en observación por un periodo de 30 h para los posteriores análisis.

OBTENCIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA ROJA (MOR)

Los animales, previamente anestesiados, fueron sacrificados para la extracción de la médula ósea roja a partir de los huesos largos de patas anteriores y posteriores. La MOR fue recibida en viales de 1 mL y suspendida en *buffer* fosfato salino (PBS) 0,1 M suplementado con seroalbúmina bovina al 5% y atemperado a 37 °C para su inmediato uso. Este procedimiento se realizó para todos los ensayos.

EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO POR PRUEBA DE 3-(4,5-DIMETILTIAZOL 2YL)-2,4-DIFENILBROMURO DE TETRAZOLIO (MTT)

Se aislaron células mononucleares a partir de la MOR de cinco ratones empleando la técnica Ficoll Hypaque; las células fueron lavadas tres veces con PBS 0,1 M y resuspendidas en 1 mL de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) completo. Las células fueron ajustadas a una concentración de 1×10^5 cel/mL en cámara de Newbauer. El cultivo celular se realizó en placa de ELISA de 96 pocillos mezclando 0,1 mL de suspensión celular y 0,1 mL de solución de NP. La incubación se realizó a 37 °C con 5% de CO₂ durante 48 h; posterior a ello, se adicionó 20 µL de MTT a cada pocillo y se continuó la incubación por 4 h adicionales. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y los cristales de formazan fueron disueltos en 300 µL de alcohol isopropílico para realizar una lectura a 570 nm empleando un lector de placas de ELISA Microplatereader ER 500. Sinnowa del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

OBTENCIÓN DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO A PARTIR DE LA MOR

Se extrajo el ARN a partir de células de la MOR empleando el kit Genejet RNA extraction (ThermoScientific), de acuerdo al protocolo del fabricante, el ARN obtenido fue almacenado a 0 °C para su uso. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó por fluorometría empleando un equipo Qubit fluorometer (Invitrogen™).

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS IL-7, IL-3 Y GM-CSF

Para los análisis de expresión, parte del ARN fue convertido a ADNc empleando el kit comercial Maxima First Strand

cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante; con el ADNc resultante se procedió a la amplificación de los genes por PCR convencional empleando el kit Taq platinum master mix (Invitrogen) y los cebadores descritos ⁽¹⁵⁾. Las condiciones de amplificación para todos los marcadores fueron: un ciclo a 94 °C x 5 min y 35 ciclos de 94 °C x 30 s, 55 °C x 30 s y 72 °C x 45 s. Los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 1% preteñidos con el intercalante Gel Red y visualizados en un equipo fotodocumentador de Cleaver Scientific. Inicialmente se usó al gen GAPDH como control de expresión interna, pero dada su variación en el tratamiento, las normalizaciones se realizaron con β-actina.

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS IL-7, IL-3 Y GM-CSF

Los niveles de expresión génica fueron analizados por RT-qPCR a partir del ARN previamente purificado empleando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) en el Equipo 7500 de Applied Biosystem. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que el apartado anterior. La cuantificación se realizó por Syber con el reportero ROX empleando una curva estándar de ADN de 2; 20 y 200 µg/ mL. Inicialmente, se consideró la normalización de los valores con el gen casero GAPDH, pero su alteración en el estudio, sugirió el empleo de la expresión de β-actina como normalizador en todos los casos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos fueron expresados como promedio ± desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes. Los análisis estadísticos fueron realizados empleando ANOVA y el test *Student-Newman-Keuls* para la comparación de todos los pares de promedios. Los valores de *p* menores a 0,05 (*p*<0,05) fueron considerados estadísticamente significantes. Asimismo, se realizó el análisis de correlación de Pearson para determinar la relación dosis respuesta. Estos estadísticos fueron implementados en el programa SPSS versión 11.5 para Windows.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LAS NANOPARTÍCULAS

Los análisis por DLS validaron la condición de NP para ZnO, SiO₂ y TiO₂ con tamaños promedio de 20±4,0; 12±7,0 y 45±10,0 nm, respectivamente; las imágenes por TEM de las NP junto con los histogramas se muestran en la Figura 1. El tamaño promedio evaluado por DLS es ligeramente menor que el tamaño de partícula evaluado por TEM, indicando la formación de aglomerados para todos los casos. Las NP de ZnO correspondieron a una estructura cristalina y en sistema hexagonal (Figura 1A). Las NP de SiO₂ presentan estructura amorfa (Figura 1B). Las NP de TiO₂ presentan estructura cristalina de la fase anatasa principalmente de forma

tabular (Figura 1C). Previo a la realización de las pruebas se fragmentaron los aglomerados de las NP por proceso de sonicación.

EFEECTO SOBRE LA VIABILIDAD DE CELULAR

Los ensayos de MTT (Figura 2) mostraron que las NP de ZnO producen disfunción mitocondrial de las células de la MOR de una manera dosis dependiente (Figura 2A); los efectos de esta NP fueron significativos a partir de un inóculo de 1 mg/kg, el cual reduce en un 37% la viabilidad celular. Para el caso de las NP de SiO₂ se registra también un comportamiento dosis dependiente; sin embargo, estas

NP incrementaron la viabilidad celular a pequeñas dosis (hasta 32% a dosis 0,5 mg/kg), no obstante, se produjo una severa disminución con las dosis más altas (hasta en un 56% a la dosis de 10 mg/kg). Por otro lado, las NP de TiO₂ produjeron una disminución significativa (en un 71%) solo a la dosis de 20 mg/kg.

EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE IL-7, IL-3 Y GM-CSF

Las NP de ZnO, SiO₂ y TiO₂ atenuaron significativamente la expresión de las IL-7, IL-3 y GM-CSF (Figuras 3, 4 y 5) con respecto al control. El efecto en la expresión del ARN fue de

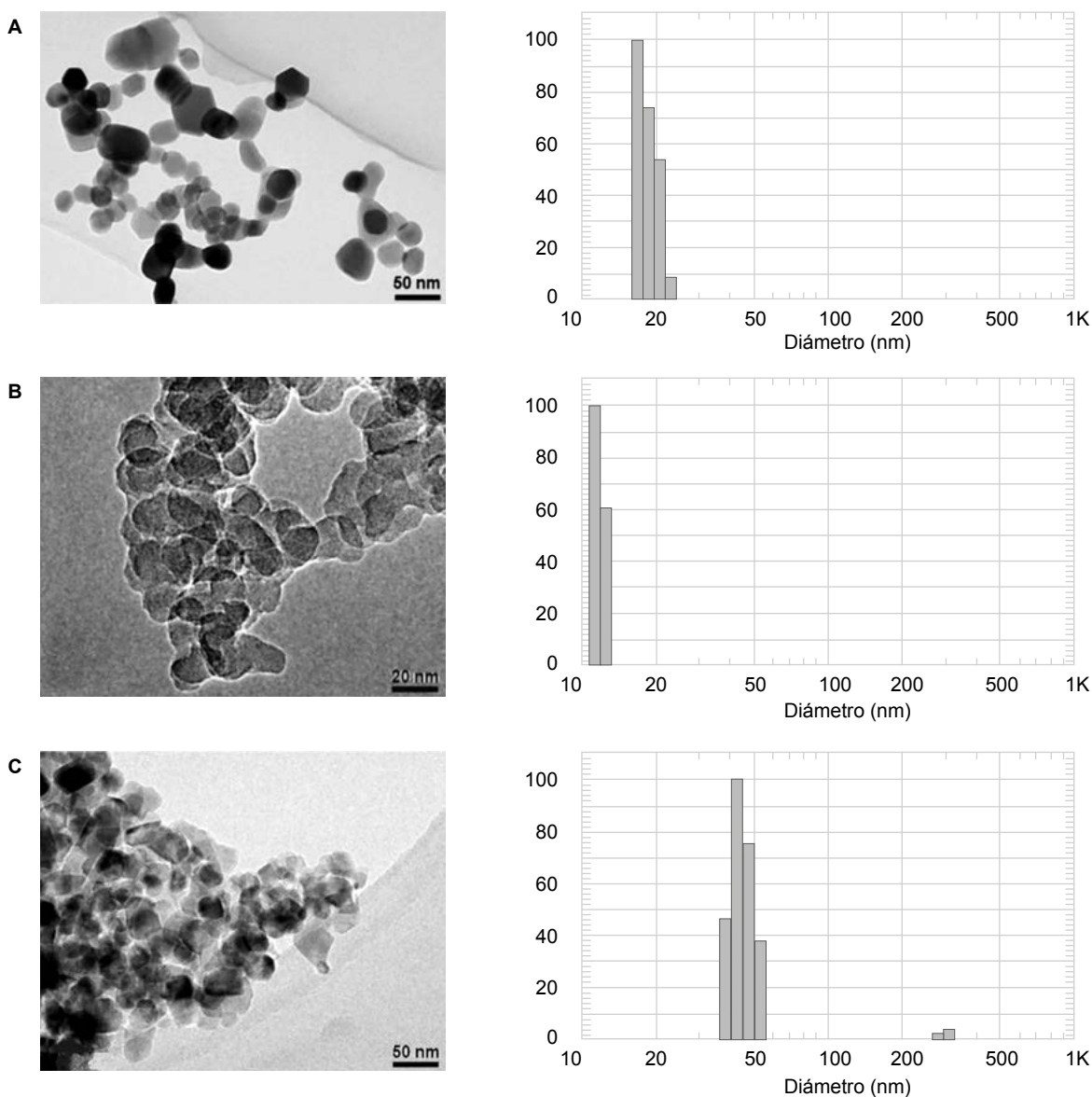


Figura 1. Caracterización física de las nanopartículas de ZnO (A), SiO₂ (B) y TiO₂ (C). Izquierda, análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se muestran la forma y disposición de las nanopartículas. Los números sobre las barras representan la escala de las imágenes (en nm). Derecha, análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS) donde se muestra la distribución del tamaño de las nanopartículas

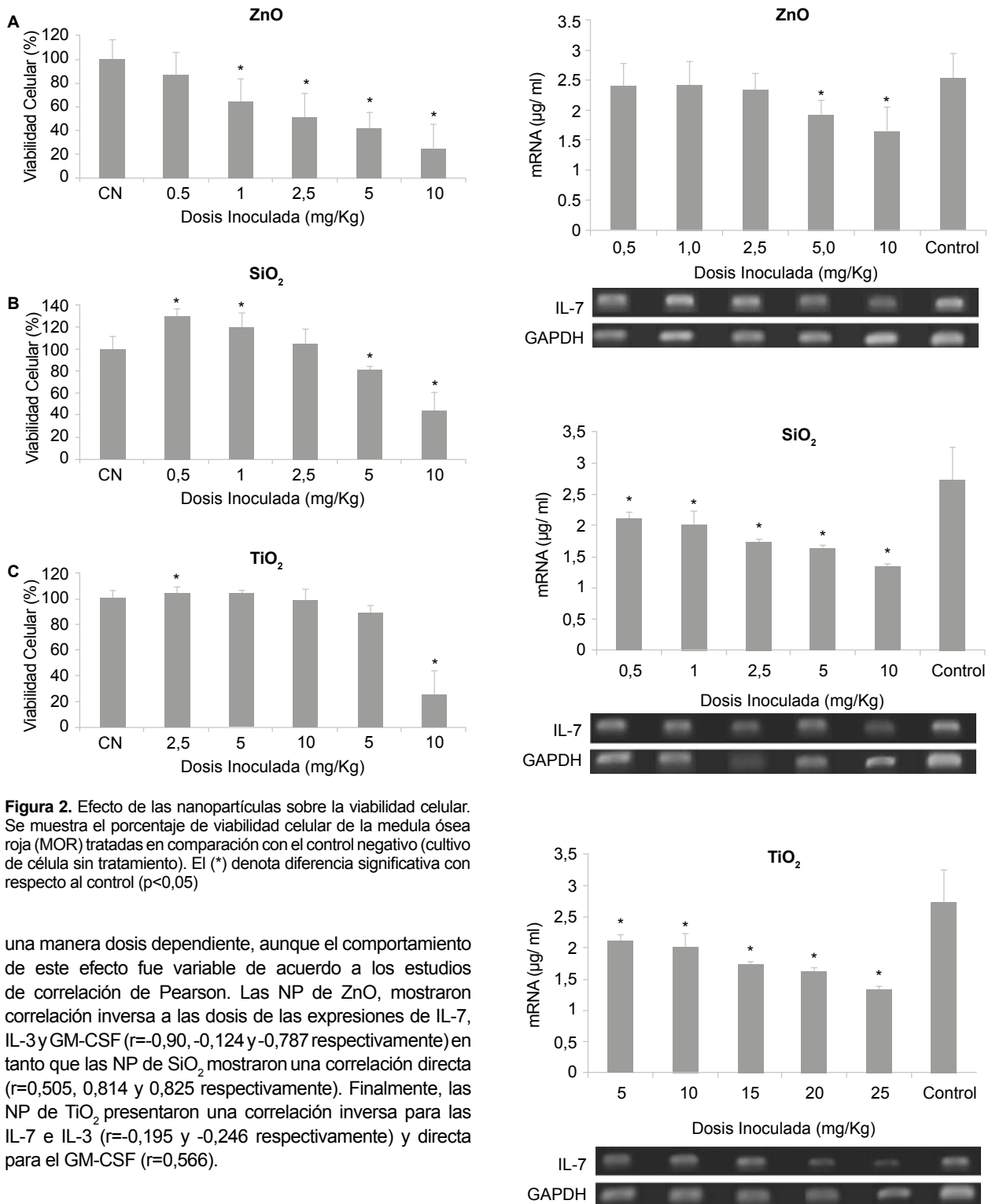


Figura 2. Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular. Se muestra el porcentaje de viabilidad celular de la médula ósea roja (MOR) tratadas en comparación con el control negativo (cultivo de célula sin tratamiento). El (*) denota diferencia significativa con respecto al control ($p < 0,05$)

una manera dosis dependiente, aunque el comportamiento de este efecto fue variable de acuerdo a los estudios de correlación de Pearson. Las NP de ZnO, mostraron correlación inversa a las dosis de las expresiones de IL-7, IL-3 y GM-CSF ($r = -0,90, -0,124$ y $-0,787$ respectivamente) en tanto que las NP de SiO₂ mostraron una correlación directa ($r = 0,505, 0,814$ y $0,825$ respectivamente). Finalmente, las NP de TiO₂ presentaron una correlación inversa para las IL-7 e IL-3 ($r = -0,195$ y $-0,246$ respectivamente) y directa para el GM-CSF ($r = 0,566$).

Comparativamente, a las dosis de 5 y 10 mg/kg de las tres NP, las NP de TiO₂ tuvieron mayor efecto atenuante sobre la expresión de las IL-7 e IL-3 (55,35% y 70,23% respectivamente) seguido por las NP de SiO₂ (50,73% y 67,46% respectivamente), en tanto que las NP de SiO₂ causaron la mayor inhibición (91,02%) en la expresión de GM-CSF seguido por las NP de TiO₂ (82,06%) (Figura 5).

Figura 3. Efecto de las nanopartículas sobre la expresión de la IL-7. Las gráficas de barras muestran la cuantificación del nivel de expresión del marcador a las diferentes dosis ensayadas. Las bandas muestran la intensidad de la expresión de la IL-7. Los valores se muestran como promedio \pm desviación estándar (DE). El (*) denota diferencia significativa con respecto al control ($p < 0,05$)

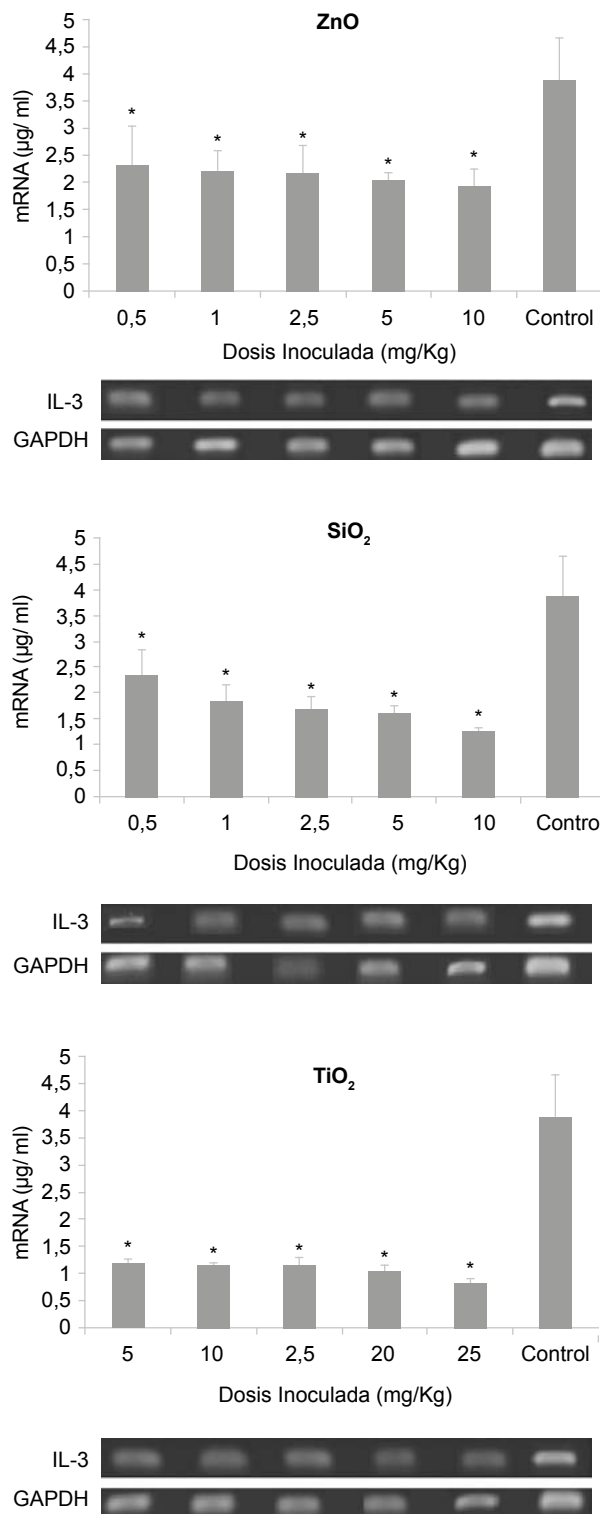


Figura 4. Efecto de las nanopartículas sobre la expresión de la IL-3. Las gráficas de barras muestran la cuantificación del nivel de expresión del marcador a las diferentes dosis ensayadas. Las bandas muestran la intensidad de la expresión de la IL-3. Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar (DE) normalizados con el gen casero β-actina. El (*) denota diferencia significativa con respecto al control (p<0,05)

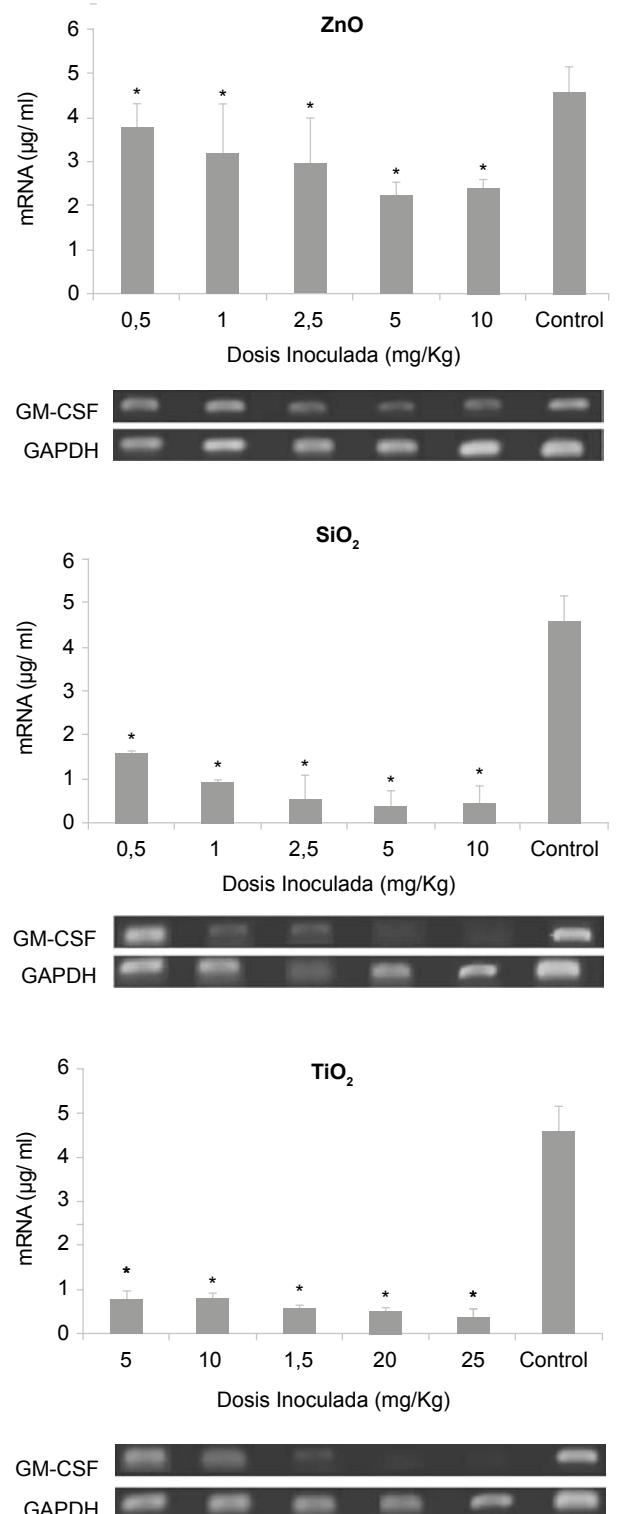


Figura 5. Efecto de las nanopartículas sobre la expresión de la GM-CSF. Las bandas muestran la intensidad de la expresión de la GM-CSF. Las gráficas de barras muestran la cuantificación del nivel de expresión del marcador a las diferentes dosis ensayadas. Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar (DE) normalizados con el gen casero β-actina. El (*) denota diferencia significativa con respecto al control (p<0,05)

Por otro lado, las NP de ZnO afectaron en menor grado la expresión de los tres marcadores analizados; a la dosis de 10 mg/kg, la reducción de la expresión de las IL-7, IL-3 y el GM-CSF fue de 34,64%, 50,39% y 5,88%, respectivamente.

EFFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE REFERENCIA

La expresión del gen casero GAPDH se vio significativamente inhibida por las NP en estudio (Figura 6). Las NP de SiO₂

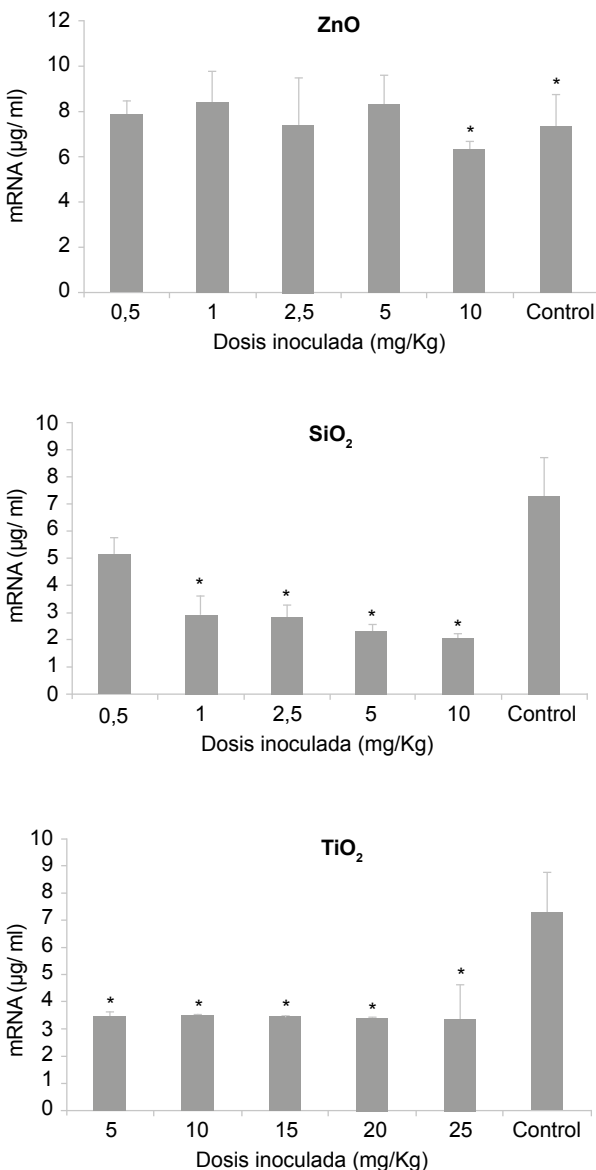


Figura 6. Efecto de las nanopartículas en estudio sobre la expresión del gen GAPDH. Las gráficas de barras muestran la cuantificación del nivel de expresión del marcador a las diferentes dosis ensayadas. Los valores se muestran como promedio \pm desviación estándar (DE) normalizados con el gen casero β -actina. El (*) denota diferencia significativa con respecto al control ($p < 0,05$)

atenuaron la expresión de manera dosis dependiente en un rango de 56,52 a 71,83%; en tanto que la NP de TiO₂ redujeron de manera uniforme en todas las dosis empleadas (reducción promedio=53,61%). La NP de ZnO redujeron en 13,62% a la dosis de 10 mg/kg. Este efecto no estuvo presente en la expresión del gen β -actina cuya expresión fue utilizada para la normalización de los genes en estudio.

DISCUSIÓN

El propósito de esta investigación fue evaluar y comparar el efecto de las NP de ZnO, SiO₂ y TiO₂ sobre la viabilidad celular y la expresión génica de las IL-7, IL-3 y el GM-CSF, empleando cantidades y tamaños similares a los comúnmente usados en la industria^(1,2) y se constituye como el primer trabajo de este tipo realizado en nuestro país.

Las NP que se encuentran dimensionadas entre 1 y 100 nm son ampliamente usadas en el campo de la nanotecnología, uno de los campos de mayor desarrollo en este siglo. Sin embargo, ya que las NP tienen largas áreas de superficie, alta reactividad química, volumen de poro interno y elevada permeabilidad celular, son propensas a inducir muchos efectos tóxicos^(2,16). El efecto de las NP depende de factores tales como tamaño, concentración, forma de exposición, la línea celular empleada, el tipo del organismo modelo, la relación cantidad: volumen y el tipo de NP; la literatura es diversa para cada uno de estos factores y en ella se exponen resultados variados^(2,5,8,18).

El ensayo de MTT ha demostrado que las NP tienen la capacidad de disminuir la viabilidad celular de una manera dosis dependiente en general. La prueba de MTT es un ensayo ampliamente usado por su correlación directa de funcionalidad mitocondrial y supervivencia celular y presenta mayor sensibilidad comparada con otras pruebas que evalúan citotoxicidad⁽¹⁷⁾ por lo que es idóneo para este tipo de análisis⁽²⁾. Los datos obtenidos demuestran diferencias significativas entre los tres tipos de NP a las mismas dosis (5 y 10 mg/mL). La reducción del MTT fue más alta en las NP de ZnO, seguidos por las NP de SiO₂ y NP de TiO₂, respectivamente. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Zhan *et al.*⁽⁹⁾ y Hu *et al.*⁽¹⁶⁾. La relación directa de la dosis de NP con el porcentaje de la reducción del MTT, también es observada para las alteraciones morfológicas y la muerte celular⁽⁹⁾.

Por otro lado, las NP de TiO₂ causaron la mayor disminución de la expresión de los genes estudiados. Este efecto estaría relacionado a una disminución de la carga linfocitaria en los roedores⁽¹⁹⁾. Park *et al.*⁽²⁰⁾ determinaron que las NP de TiO₂ producen daño pulmonar, incluyendo citotoxicidad, estrés oxidativo, respuestas inflamatorias, proliferativas e histopatológicas en modelos murinos. Asimismo, causa un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno y

óxido nítrico en células humanas cultivadas⁽²¹⁾. En el modelo de pez zebra altera la expresión de muchos genes incluidos la IL-10 e interferones⁽²²⁾. La citotoxicidad de las NP de TiO₂, por lo pronto, estaría relacionada a los linfocitos, mas no para los eritrocitos debido a que en este grupo de células representa a la NP menos perjudicial en comparación de las NP de SiO₂ y NP de ZnO⁽¹¹⁾. En el presente estudio se usó un rango mayor de concentración de esta NP debido a que previamente se determinó que en estas concentraciones se puede evidenciar efecto citotóxico. Este mismo hecho también se da en modelos en ratas⁽¹⁹⁾.

La exposición a las NP de SiO₂ conlleva a la mayor disminución del GM-CSF en comparación de las otras NP, este efecto podría comprometer la barrera antibacteriana a nivel celular por la alteración de los neutrófilos y monocitos⁽¹³⁾. Se ha reportado que las NP de SiO₂ alteran la maquinaria replicativa del ADN, así como también los procesos de división celular en los epitelios de ratas, ratones, humanos y cultivos de células HaCat, L-02 y HEK293⁽²³⁻²⁵⁾. Asimismo, efectos *in vivo* relacionados a esta NP incluyen inflamación pulmonar, daño isquémico al miocardio, viscosidad de la sangre y generación de ROS⁽²³⁾.

La incidencia menor que tiene las NP de ZnO con respecto a NP de SiO₂ y NP de TiO₂ demuestra que la célula es permisible y tolerante a este elemento, pero esta aparente tolerancia se deslinda del efecto citotóxico que causa, el cual es mayor en comparación con las NP de SiO₂ y NP de TiO₂⁽¹¹⁾. Se ha reportado el daño organogénico de las NP de ZnO en roedores⁽²⁶⁾ y también su efecto genotóxico mediante la alteración de la estructura del ADN y la generación de agentes oxidantes⁽²⁷⁾. Alaraby *et al.* reportaron que las NP de ZnO alteran la expresión de las proteínas Hsp70 y p53 y conlleva a un incremento de ROS en modelos de *Drosophyla*; sin embargo, al igual que el presente estudio, esta NP no se reporta como un agente genotóxico⁽²⁸⁾.

De una manera peculiar, se registró la atenuación de la expresión del gen GAPDH, un gen ampliamente usado como referencia para diversos estudios de expresión

génica⁽²⁹⁾; sin embargo, se ha detectado que su expresión puede variar en diferentes condiciones fisiológicas (incremento hormonal, estrés oxidativo, presencia de ácido retinoico, estradiol, etc.) o exposiciones a factores exógenos (biofosfanatos u otros agentes usados en quimioterapia)^(29,30), por lo que es necesario una evaluación de validación de este gen como control interno en estudios de expresión que involucran el empleo de NP.

Es evidente la necesidad de ahondar más en el estudio de los mecanismos de acción de las tres NP evaluadas, para ello, el uso de metodologías más específicas y empleo de líneas celulares humanas son pertinentes. Sin embargo, las metodologías empleadas en este trabajo logran incrementar el conocimiento de los efectos perjudiciales de las NP de ZnO, SiO₂ y TiO₂ y exponen a la médula ósea roja como un tejido adecuado para este tipo de evaluaciones y a los genes seleccionados como marcadores idóneos para la trazabilidad de estos efectos.

De igual forma, nuestros resultados, junto a los otros mencionados en el presente estudio, pretenden ser el punto de partida para más estudios a nivel biológico y clínico de los efectos que puedan darse en la población peruana que está expuesta a estos nanomateriales. Por otro lado, se pretende incentivar a las autoridades de salud correspondientes para dar inicio a un plan de identificación y monitoreo de las poblaciones expuestas a estos nanomateriales.

En conclusión, se ha podido determinar que las NP de ZnO, SiO₂ y TiO₂, de amplio uso en la industria alimentaria y el sector salud, tienen capacidad de disminuir, de manera variable, la viabilidad celular y alterar la expresión génica de las IL-7, IL-3 y GM-CSF de la médula ósea roja de ratón.

Fuente de financiamiento: la realización del presente trabajo ha sido posible gracias a los fondos provenientes del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - Innóvate Perú (Contrato 134-FINCYT-IA-2013).

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés alguno en la realización y publicación del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASTM International. E 2456-06 Terminology for Nanotechnology. West Conshohocken: ASTM International, 2008.
2. Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran Biomed J.* 2016; 20(1):1-11. doi: 10.7508/ibj.2016.01.001.
3. Stix G. Little big science. *Nanotechnology. Sci Am.* 2001; 285(3):32-7.
4. Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan S, Adithan C. Novel application of nanotechnology in medicine. *Indian J Med Res.* 2009;130(6):689-701.
5. Fröhlich E. Cellular elimination of nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016; 46:90-4. doi: 10.1016/j.etap.2016.07.003.
6. Setyawati MI, Tay CY, Leong DT. Mechanistic investigation of the biological effects of SiO₂, TiO₂, and ZnO nanoparticles on intestinal cells. *Small.* 2015;11(28):3458-68. doi: 10.1002/smll.201403232.
7. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology.* 2004;2(1):3. doi: 10.1186/1477-3155-2-3.
8. Anjum NA, Rodrigo MA, Moulick A, Heger Z, Kopel P, Zítka O, *et al.* Transport phenomena of nanoparticles in plants and animals/humans. *Environ Res.* 2016; 151:233-43. doi: 10.1016/j.envres.2016.07.018.
9. Zhang XQ, Yin LH, Tang M, Pu YP. ZnO, TiO₂, SiO₂ and Al₂O₃ nanoparti-

- cles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts. *Biomed Environ Sci*. 2011; 24(6):661-9. doi: 10.3967/0895-3988.2011.06.011.
10. Schiavo S, Oliviero M, Miglietta M, Rametta G, Manzo S. Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO₂ and TiO₂ effects at population growth inhibition levels. *Sci Total Environ*. 2016; 550:619-27. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.135.
 11. Zarria-Romero J, Osorio A, Carvallo C, Pino J, Shiga B, Vivas-Ruiz D. Evaluación citotóxica y genotóxica producida por nanoparticulados de ZnO, TiO₂ y SiO₂ a nivel de médula ósea de ratón *Mus musculus*. *Theorēma*. 2015;2(3):149-54.
 12. Vandenberg J. Use of House Mice in Biomedical Research. *ILAR J*. 2000;41(3): 133-35. doi: <https://doi.org/10.1093/ilar.41.3.133>.
 13. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 6ta ed. Madrid: Elsevier Saunders;2008.
 14. National Research Council (US), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.
 15. Álvarez E, Alzamora-Gonzales L. Efecto de *Lepidium meyenii* (maca) sobre la producción de tres citoquinas hematopoyéticas en esplenocitos de ratones inmunosuprimidos. *Bol latinoam Caribe plantas med aromát*. 2013;12(3):313-21.
 16. Hu X, Cook S, Wang P, Hwang HM. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Sci Total Environ*. 2009; 407(8):3070-2. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.01.033.
 17. Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006;160(2):171-7. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
 18. Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran Biomed J*. 2016;20(1):1-11. doi: 10.7508/ibj.2016.01.001.
 19. Dobrzyńska M, Gajowik A, Radzikowska J, Lankoff A, Dušinská M, Kruszewski M. Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats *in vivo*. *Toxicology*. 2014;315:86-91. doi: 10.1016/j.tox.2013.11.012.
 20. Park EJ, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology* 2009;260(1-3):37-46. doi: 10.1016/j.tox.2009.03.005.
 21. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. 2005; 213(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.tox.2005.05.007.
 22. Min-Kyeong Y, Hyung-Geun P. Gene expression in zebrafish embryos following exposure to Cu-doped TiO₂ and pure TiO₂ nanometer-sized photocatalysts. *Mol Cell Toxicol*. 2012; 8(2):127-37.
 23. Chen M, von Mikecz A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp Cell Res*. 2005; 305(1):51-62. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.021.
 24. Yang X, Liu J, He H, Zhou L, Gong C, Wang X, et al. SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Part Fibre Toxicol*. 2010;19;7:1. doi: 10.1186/1743-8977-7-1.
 25. Ye Y, Liu J, Xu J, Sun L, Chen M, Lan M. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. *Toxicol in Vitro*. 2010; 24(3):751-8. doi: 10.1016/j.tiv.2010.01.001.
 26. Fujihara J, Tongu M, Hashimoto H, Yamada T, Kimura-Kataoka T, Yasuda T, et al. Distribution and toxicity evaluation of ZnO dispersion nanoparticles in single intravenously exposed mice. *J Med Invest*. 2015;62(1-2):45-50. doi: 10.2152/jmi.62.45.
 27. Heim J, Felder E, Tahir MN, Kaltbeitzel A, Heinrich UR, Brochhausen C, et al. Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2015;7(19):8931-8. doi: 10.1039/c5nr01167a.
 28. Alaraby M, Annangi B, Hernández A, Creus A, Marcos R. A Comprehensive study of the harmful effects of ZnO nanoparticles using *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model. *J Hazard Mater*. 2015; 296:166-74. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.04.053.
 29. Valenti MT, Bertoldo F, Dalle Carbonare L, Azzarello G, Zenari S, Zanatta M, et al. The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer*. 2006;36:49. doi: 10.1186/1471-2407-6-49.
 30. Chapman JR, Waldenström J. *With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies*. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141853. doi: 10.1371/journal.pone.0141853.

Correspondencia: Jacquelyne Yesenia Zarria Romero

Dirección: Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, Pabellón de Investigación, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Calle Germán Amézaga 375, Lima 1. Cercado de Lima, Perú.

Correo electrónico: jzarria.romero@unmsm.edu.pe

Nuestros artículos se encuentran indizados en:

PubMed



www.pubmed.gov