

Evaluación citotóxica y genotóxica producida por nanoparticulados de ZnO, TiO₂ y SiO₂ a nivel de médula ósea de ratón *Mus musculus*

Cytotoxic and genotoxic evaluation produced by particulate ZnO, TiO₂ and SiO₂ level mouse bone marrow Mus musculus

Jacquelyne Zarría-Romero^{1,*}, Ana Osorio², César Carvallo¹,
José Pino¹, Betty Shiga¹ y Dan Vivas-Ruiz³
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad a nivel de médula ósea de ratón producida por particulados de ZnO, TiO₂ y SiO₂. Para tal fin se evaluó 90 ratones a los cuales se inoculó a través de vía intraperitoneal particulados de cada óxido dispersado en agua ultrapura, en dosis de ZnO (0,5 ; 1,0; 2,5; 5,0 y 10 µg/kg); TiO₂ (5 ; 10; 12,5; 20 y 25 µg/kg), y SiO₂ (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10 µg/kg), de los cuales, el óxido de titanio y el óxido de silicio son los que causan menor daño a nivel eritropoyético con respecto al óxido de zinc.

PALABRAS CLAVE: Eritrocito normocromático, eritrocito policromático, médula ósea roja.

ABSTRACT

The general objective this work has to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity level mouse bone marrow caused by particulate ZnO, TiO₂ and SiO₂. For this purpose which 90 mice were inoculated intraperitoneally through each oxide particulates dispersed in ultrapure water at doses of ZnO (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10 µg/kg), TiO₂ (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10 µg/kg) and SiO₂ (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 y 20 µg/kg) of which titanium oxide and silicon oxide are those that cause less damage to eritropoyetico level with respect to zinc oxide.

KEYWORDS: Normochromatic erythrocyte, polychromatic erythrocytes, bone marrow red.

Recibido: 14/09/2015

Aprobado: 06/11/2015

1 Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

2 Laboratorio de Nanotecnología e Innovación Tecnológica. Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM.

3 Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

* <jacquelyne.zarria@unmsm.edu.pe>

Introducción

En la actualidad la nanociencia y la nanotecnología son áreas de gran interés debido a la amplia variedad del uso potencial de los nanomateriales en los campos de la biomedicina la óptica y la electrónica. Particularmente, en el campo industrial, el empleo de las nanopartículas, NP, (materiales a nivel de átomos y moléculas) ha permitido una mejora en la competitividad en sectores de la industria textil, del cemento, electrónica, plásticos, alimentaria, etc. (Dobrzyńska et al. 2014 y Stix 2001).

El aumento del interés por la utilidad de las NP, en especial del dióxido de titanio (TiO_2), dióxido de silicio (SiO_2) y el óxido de zinc (ZnO) (Nam et al. 2012 y Chen 2005), ha ido de la mano por el interés de los efectos que estos pueden causar en la salud humana y animal (Seaton et al. 2010), existe evidencia del daño que pueden causar las NP a nivel celular y molecular (Zhang et al. 2011), induciendo el incremento de micronúcleos (MN) (Seaton et al. 2010 y Li et al. 2014) que son la evidencia de roturas a nivel de la molécula de ADN que se dan cuando la células, que están en constante división celular, se encuentran en contacto con estos materiales, estos fragmentos rotos de ADN no son incorporados al núcleo de las células hijas por lo que quedan rezagados como núcleos de menor tamaño (Schmid 1975).

Sin embargo, en el Perú, poco es el conocimiento que se tiene acerca del uso correcto de las nanomateriales y particulados, menos aún el conocimiento del efecto que estos pueden tener en la salud de las personas. El presente trabajo se ha centrado en el estudio de los efectos perjudiciales que tienen el TiO_2 , SiO_2 y ZnO a nivel celular (citotoxicidad) como a nivel de DNA (genotoxicidad), empleado como modelo medula ósea roja del ratón albino *Mus musculus*.

Parte experimental

Animales de experimentación

Se empleó ratones albinos (*Mus musculus*) de la cepa "Balb c", entre los pesos de 25 y 30 gramos obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Salud; previo a la realización de las pruebas, los roedores fueron aclimatados bajo condiciones estándares del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB-UNMSM) con un ciclo de 14h luz y 10h oscuridad recibiendo comida (balanceada y vitaminada "Bedoce") y agua ad libitum.

Preparación de las partículas

Fueron evaluadas las partículas de ZnO , TiO_2 y SiO_2 de procedencia industrial y de tamaños promedio entre 30 y 80 nm, provistas por el Laboratorio de Nanotecnología e Innovación Tecnológica de la Facultad de Química e Ingeniería Química (UNMSM). Las partículas de dispersaron en agua ultra pura y sonificadas durante 18 y 36 horas para cada caso, en un equipo de ultrasonido marca Branson, modelo 550 del Laboratorio de Equipamiento Especializado (LEE) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. Sobre la base de la concentración empleada, las partículas se aglomeraron en tamaños promedio de 1 500 nm, comprobado por microscopía electrónica de barrido. Las partículas fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) del LEE usando un microscopio de la marca FEI, modelo Inspect S50 en modo de alto vacío a presión $1,20 \times 10^{-5}$ Torr.

Inoculación de las partículas

Las partículas previamente dispersadas, fueron preparadas a razón de 0,5; 1,0; 2,5; 5 y 10 mg/kg de ratón, en solución fisiológica e inyectadas por vía Intraperitoneal (IP) mediante el empleo de jeringas del tipo tuberculina

1 mL; como control negativo se empleó NaCl al 0,9%W. Por cada dosis se empleó un grupo de 5 ratones para cada una de las partículas. Los roedores inoculados fueron mantenidos en observación por un lapso de 30 horas para su posterior evaluación.

Evaluación de la citotoxicidad

El efecto citotóxico de las partículas se determinó por la disminución de la proporción de los eritrocitos maduros (eritrocitos policromáticos, EPCs); con respecto a los inmaduros (eritrocitos normocromáticos, ENC) ambos obtenidos de la médula ósea roja (MOR); para ello los ratones fueron sacrificados 30h después de inoculados; la MOR fue diluida en buffer PBS, concentración 1X, suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) al 5%; se realizó un frotis por cada individuo y fueron teñidos con Giemsa al 2%. La observación fue realizada en un microscopio óptico de campo claro en donde se identificaron y contabilizaron a los EPCs y ENC. Se determinó el índice de citotoxicidad que se define como la relación EPC/ENC obtenido de una población de 2000 células. Los ensayos fueron realizados por quintuplicado.

Evaluación de la genotoxicidad

La evaluación se realizó mediante el Test de Micronúcleos (MN) en MOR, que se determina por el número de micronúcleos tanto en EPCs y ENC obtenidos con la metodología anterior para cada una de las dosis y partículas estudiadas.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar (DS) evaluados inicialmente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó un ANOVA con el test de Dunnett para evaluar la significancia estadística

de las diferencias entre los grupos experimentales y el control. Los valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) fueron considerados estadísticamente significantes.

Resultados y discusión

Efectos del ZnO

Las partículas de ZnO produjeron un daño citotóxico significativo en la MOR a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabla 1), induciendo una disminución en la presencia de EPCs y un significativo aumento de las poblaciones de ENC. En cuanto al efecto genotóxico, este apareció desde una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con un considerable aumento de células con micronúcleos (MNs) de una manera dosis dependiente; sin embargo, no se aprecia susceptibilidad diferencial por parte de EPC y ENC en la formación de los MNs.

Daño del SiO₂

Las partículas de SiO₂ mostraron efecto citotóxico a partir de los 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, las poblaciones de EPCs disminuyeron en tanto que las de ENC no mostraron una variación significativa con respecto al grupo control (tabla 2). En cuanto al daño genotóxico, desde la concentración 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ indujo el aumento considerable de MN, tanto en EPCs como en ENC, tampoco se observa susceptibilidad preferencial por la formación de MNs.

Efecto del TiO₂

Con respecto a las partículas de TiO₂, no se obtuvo efectos significativos hasta los 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; por este motivo se procedió a elevar las concentraciones del particulado hasta los 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (tabla 3). Daños citotóxicos significativos fueron observados a partir de una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con una disminución de la

TABLA 1
Efectos de las partículas de ZnO sobre la MOR

Dosis	Daño Citotóxico			Daño Genotóxico	
	N° de EPCs ±	N° de ENCs ±	Índice citotóxico	N° de EPC con MN	N° de ENC con MN
CN	991,00 ± 10,630	991,20 ± 10,45	1,000 ± 0,020	7,60 ± 2,302	10,2 ± 3,701
0,5	996,80 ± 1,483	982,20 ± 3,90	1,015 ± 0,004	11,00 ± 2,550	10 ± 2,121
1	977,40 ± 17,413	982,80 ± 15,73	0,995 ± 0,152	19,20 ± 6,797**	20,6 ± 3,782**
2,5	961,20 ± 85,031	985,60 ± 23,45	0,975 ± 0,206	26,60 ± 4,336**	26,6 ± 0,548**
5	934,60 ± 42,933	1006,4 ± 45,412	0,928 ± 0,257*	27,00 ± 5,338**	32 ± 4,636**
10	872,20 ± 16,498*	1062,8 ± 16,904*	0,821 ± 0,242**	37,00 ± 6,745**	36 ± 3,674**

± Desviación estándar

* Diferencias significativas con el CN para un valor p<0,05

** Diferencias significativas con el CN para un valor p<0,01

TABLA 2
Efecto de las partículas de SiO₂ sobre la MOR

Dosis	Daño Citotóxico			Daño Genotóxico	
	N° de EPCs	N° de ENCs	Índice citotóxico	N° de EPC con MN	N° de ENC con MN
CN	991,00 ± 10,630	991,20 ± 10,450	0,9998 ± 0,020	7,6 ± 2.302	10,2 ± 3.701
0,5	994,20 ± 4,970	987,40 ± 5,225	1,0068 ± 0,009	9,2 ± 1.483	9,2 ± 1.643
1	994,80 ± 2,387	984,20 ± 4,266	1,0106 ± 0,006	11,4 ± 1.673*	9,6 ± 1.140
2,5	984,20 ± 4,658	980,60 ± 1,342*	1,0036 ± 0,005	18,8 ± 1.924*	16,4 ± 3.647*
5	960,00 ± 10,050*	988,40 ± 0,548	0,9716 ± 0,01*	32,6 ± 3.620**	19 ± 3.359*
10	943,20 ± 7,918**	995,40 ± 6,768	0,9476 ± 0,012**	34,4 ± 5.213**	27 ± 3.158**
20	924,2 ± 24,152**	1008,00 ± 17,986	0,9158 ± 0,039**	30,6 ± 4.393**	36,80 ± 3,27**

± Desviación estándar

* Diferencias significativas con el CN para un valor p<0,05

** Diferencias significativas con el CN para un valor p<0,01

TABLA 3
Efecto de las partículas de TiO₂ sobre la MOR

Dosis	Daño Citotóxico			Daño Genotóxico	
	N° de EPCs	N° de ENCs	Índice citotóxico	N° de EPC con MN	N° de ENC con MN
CN	990,80 ± 10,630	991,20 ± 10,450	0,999 ± 0,0202	7,6 ± 2,302	10,4 ± 2,362
5	995,40 ± 3,05	990,60 ± 1,52	1,005 ± 0,0045	7,8 ± 1,789	6,2 ± 0,837
10	991,60 ± 2,70	991,20 ± 3,57	1,000 ± 0,0058	10 ± 1,581	7,2 ± 0,837
12.5	980,00 ± 5,15	986,80 ± 3,209	0,993 ± 0,0250	15,2 ± 1,304*	18,4 ± 2,88*
20	930,20 ± 18,63*	1022,40 ± 15,44*	0,910 ± 0,0315**	26 ± 2,737**	21,4 ± 2,408**
25	863,40 ± 6,652*	1062,60 ± 17,95*	0,813 ± 0,0295**	29,4 ± 1,517**	44,6 ± 2,966**

± Desviación estándar

* Diferencias significativas con el CN para un valor p<0,05

** Diferencias significativas con el CN para un valor p<0,01

población celular de EPCs y aumento de ENCs. Los daños genotóxicos fueron evidentes a partir de los 12,5 µg/kg.

En los últimos diez años se ha debatido sobre los efectos que pueden estar causando el empleo de las nanopartículas en la salud humana y animal; los resultados, en base a evaluaciones de nanopartículas de Ag, Pb y Au, han demostrado efectos deletéreos a nivel celular y particularmente a nivel de ADN.

Específicamente, in vivo, las nanopartículas de ZnO causan severos efectos patológicos a nivel de pulmón, bazo e hígado; se evidencia una rápida asimilación cuando es suministrado por vía sanguínea en ratones (Fujihara et al. 2015). Estudios in vitro han demostrado la genotoxicidad del ZnO mediante la alteración en la estructura del DNA y la generación de agentes oxidantes, reduciendo de esta manera la viabilidad ce-

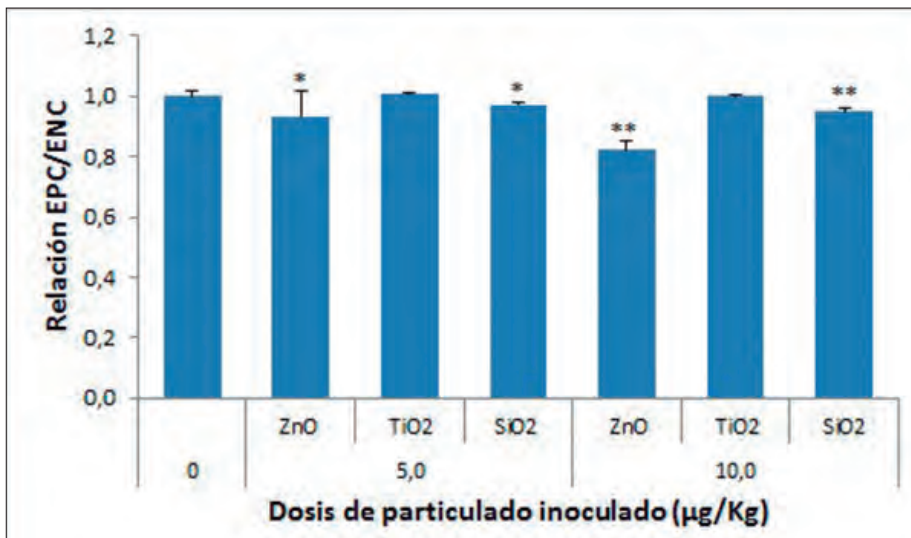


Figura 1. Daño citotóxico causado por el particulado en estudio. Expresado mediante la relación EPC/ENC. EPC (eritrocitos policromáticos), ENC (eritrocitos normocromáticos). Media \pm DS (n=5). Diferencia significativas del control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

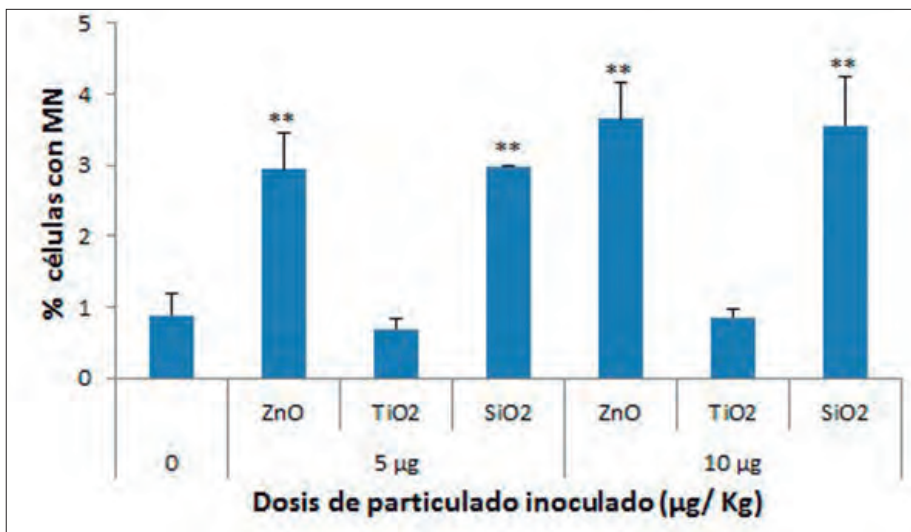


Figura 2. Daño genotóxico causado por el particulado en estudio. MN (micronúcleos). El daño fue evaluado por el incremento en la presencia de micronúcleos. Media \pm DS (n=5). Diferencia significativas del control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

lular (Heim et al. 2015). Por otro lado, estudios empleando a la mosca del vinagre, no han evidenciado daño significativo, aunque sí hay evidencia de alteración a nivel de expresión génica (Alaraby et al. 2015).

Con respecto al SiO₂, se ha demostrado que sus nanopartículas producen una serie de alteraciones a nivel molecular en la maquinaria replicativa del ADN y alteran los procesos de división celular en cultivos de tejido epitelial humano, de rata y de ratón (Chen y Von 2005). A nivel de efectos in vivo, causa una serie de alteraciones como inflamación pulmonar, daño isquémico al miocardio, aumento en las concentraciones de fibrinógeno,

viscosidad de la sangre y la generación de radicales hidroxilos. Por otro lado, nuevos estudios in vitro han demostrado una citotoxicidad elevada en células HaCat (Yang et al. 2010).

Los datos obtenidos indican que el ZnO resultó ser el particulado que produce mayor daño citotóxico en comparación al SiO₂ y TiO₂ (figura 1); en cuanto al daño genotóxico tanto el ZnO₂ y SiO₂ pueden inducir de manera semejante la formación de MN en las células de MOR (figura 2).

En el caso de TiO₂, las altas dosis empleadas para evidenciar los daños demuestran que este particulado, a las condiciones expuestas, no es un agente citotóxico ni geno-

tóxico relevante; resultados similares fueron encontrados en test de MN en ratas expuestas por vía intra peritoneal (Dobrzyńska et al. 2014) y oral (Chen Z. et al 2014), sin embargo, el ensayo con γ -H2AX (evaluación de histonas), de Cometa en leucocitos y de cultivo celular de fibroblastos demuestran significativo daño genotóxico, esto evidencia que el TiO_2 si posee la potencialidad de ser un agente genotóxico (Chen T. et al. 2014).

Conclusiones

Los resultados indican que el particulado de ZnO , SiO_2 y TiO_2 provocan daños citotóxicos y genotóxicos a nivel de la médula ósea roja de ratón, de una manera dosis dependiente; además, existe diferencias en la susceptibilidad a los particulados empleados, siendo el TiO_2 el particulado que requiere de mayor concentración para producir efectos significativos en el modelo empleado.

Agradecimientos

Al Fondo para la Investigación, Ciencia y Tecnología por el financiamiento brindado a través del proyecto FINCyT N°134 -IA-2013. Agradecimiento especial a Liz Padilla, Marie Coca y a Mac Pholo Aguirre por el interés y apoyo en el presente trabajo.

Bibliografía

ALARABY, M. et al. (2015). "A comprehensive study of the harmful effects of ZnO nanoparticles using *Drosophila melanogaster* as an in vivo model". *J Hazard Mater.* 296:166-174. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.04.053.

CHEN, M, y VON MIKECZ, A. (2005). "Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO_2 nanoparti-

cles". *Exp Cell Res.* 305(1):51-62.

CHEN, Z, et al. (2014). "Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro". *Toxicol Lett.* 226(3):314-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.02.020.

CHEN, T, et al. (2014). "Genotoxicity of vtitanium dioxide nanoparticles". *J Food Drug Anal.* 22(1):95-104. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.008

DOBRYŃSKA, M, et al. (2014). "Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo". *Toxicology*; 315:86-91. doi: 10.1016/j.tox.2013.11.012.

FUJIIHARA, J, et al. (2015). "Distribution and toxicity evaluation of ZnO dispersion nanoparticles in single intravenously exposed mice". *J Med Invest.*; 62(1-2):45-50. doi: 10.2152/jmi.62.45.

HEIM, J, et al. (2015). "Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles". *Nanoscale.* doi: 10.1039/C5NR01167A.

LI, Y, et al. (2014). "Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse". *Nanotoxicology.* 8 Suppl 1:36-45. doi: 10.3109/17435390.2013.855827. Epub 2013 Nov 22.

NAM, S, et al. (2013). No evidence of the genotoxic potential of gold, silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the SOS chromotest. *J Appl Toxicol.* Oct; 33(10):1061-9. doi: 10.1002/jat.2830.

SCHMID, W. (1975). "The micronucleus test". *Mutat Res.* Feb; 31(1):9-15.

SEATON, A, et al. (2010). "Nanoparticles, human health hazard and regulation". *J R Soc Interface.* 7 Suppl 1:S119-29. doi: 10.1098/rsif.2009.0252.

STIX, G. (2001). "Little big science, Nanotechnology". *Sci. Am. Sep*; 285 (3): 32– 37.

YANG, X, et al. (2010). " SiO_2 nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells". *Part Fibre Toxicol.* 7:1. doi: 10.1186/1743-8977-7-1.

ZHANG, X, et al. (2011). " ZnO , TiO_2 , SiO_2 and Al_2O_3 nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts". *Biomed Environ Sci.* Dec; 24(6):661-9. doi: 10.3967/0895-3988.2011.06.011.