

**EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN UN MODELO *IN VITRO* DE CARDIOMIOCITOS RL- 14**

**ANDREA BEDOYA VÁSQUEZ**



**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA  
ESCUELA INGENIERÍAS  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
INGENIERÍA QUÍMICA  
MEDELLÍN**

**2021**

**EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN UN MODELO *IN VITRO* DE CARDIOMIOCITOS RL- 14**

**ANDREA BEDOYA VÁSQUEZ**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Química**

**Directora**

**Yuliet Montoya Osorio IBM, MS.c, Ph.D**

**Asesora**

**Paola Orozco Valencia IBM, MS.c**



**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA**

**ESCUELA INGENIERÍAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**INGENIERÍA QUÍMICA**

**MEDELLÍN**

**2021**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Andrea Bedoya Vásquez, estudiante de ingeniería química, hago constar que:

Este trabajo de grado no ha sido presentado para optar a otro título académico, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad.

Cuando he consultado los trabajos publicados por otros autores en el marco teórico y el estado del arte, se realizó su debida referenciación, respetando las políticas de *copyright*.

Con excepción de los textos citados, declaro que los productos derivados de este trabajo de grado son completamente un trabajo inédito.

Firma: \_\_\_\_\_

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Andrea Bedoya Vásquez", written over a horizontal line.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Pontificia Bolivariana y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación - MINCIENCIAS, Colombia, por el apoyo académico en la formación de recurso humano convocatoria de doctorado nacional 647 de 2014 y al proyecto 121084467592.

Al Grupo de Dinámica Cardiovascular del Centro de Bioingeniería de la Universidad Pontificia Bolivariana bajo la dirección del doctor John Bustamante Osorno por permitir desarrollar este proyecto.

A la doctora Yuliet Montoya Osorio, quien fue un apoyo incondicional para desarrollar este proyecto.

A la Magister Paola Orozco Valencia, quien fue un apoyo y ayuda incondicional para desarrollar este proyecto.

A mis compañeros en grupo de investigación, porque sus aportes fueron de gran ayuda para terminar este trabajo.

A mis padres y mi hermana por su apoyo incondicional en cada una de las etapas de este trabajo y siempre apoyarme hasta final.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	10
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	14
1.3 MARCO TEÓRICO .....	15
1.3.1 Cardiomiocitos.....	15
1.3.2 Núcleo celular.....	15
1.3.3 Nanopartículas .....	15
1.3.4 Interacción nanopartícula – célula .....	16
1.3.5 Genotoxicidad .....	16
1.3.6 Ensayo Cometa.....	17
1.4 ESTADO DEL ARTE.....	19
1.5 OBJETIVOS .....	22
1.5.2 Objetivo General .....	22
1.5.3 Objetivos Específicos.....	22
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
2.1 Reactivos utilizados.....	23
2.2 Condiciones del ensayo .....	23
2.3 Síntesis nanopartículas .....	23
2.4 Modelo <i>in vitro</i> : línea celular de cardiomiocitos ventriculares fetales humanos RL-14 .....	23
2.5 Interacción célula-nanopartículas .....	24
2.6 Densidad y viabilidad celular .....	24
2.7 Evaluación genotóxica: Ensayo Cometa.....	25
2.8 Procesamiento de imágenes .....	26
2.9 Análisis estadístico.....	26
2.10 Consideraciones éticas .....	27
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
3.1 Caracterización de las nanopartículas de oro.....	28
3.2 Estandarización de protocolo de ensayo Cometa para cardiomiocitos RL-14 ante interacción con AuNPs-ChHMW.....	28
3.2.1 Preparación de los portaobjetos.....	29
3.2.2 Incorporación de cardiomiocitos RL-14 en agarosa .....	30
3.2.3 Lisis .....	31

3.2.4 Desnaturalización .....	31
3.2.5 Electroforesis .....	32
3.2.6 Neutralización, fijado y tinción.....	33
3.2.7 Protocolo final .....	33
3.3 Alteraciones morfológicas de los núcleos cardiomiocitos RL-14 expuestos a AuNPs-ChHMW .....	35
3.4 Evaluación de la genotoxicidad de nanopartículas de oro en núcleos de cardiomiocitos RL-14 .....	43
4. CONCLUSIONES .....	49
5. APOORTE DE LA INVESTIGACIÓN .....	50
6. BIBLIOGRAFÍA.....	51
7. ANEXO 1 METODOLOGÍA Y PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	55
7.1 Protocolo de ensayo Cometa para la evaluación de genotoxicidad de nanopartículas metálicas en interacción con cardiomiocitos RL-14 .....	55
7.1.1 Pretratamiento de portaobjetos con agarosa NMA.....	55
7.1.2 Día 1 .....	56
7.1.3 Día 2.....	56
7.2 Soluciones para el desarrollo del ensayo Cometa .....	57
7.2.1 Solución de lisis .....	57
7.2.2 Buffer neutralizante.....	58
7.2.3 Buffer de electroforesis .....	58
7.2.4 Tintes.....	58
7.2.5 Agarosas .....	58
7.3 Producción científica.....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espectros de absorción UV-Visible (A) y micrografías (B) de AuNPs-ChHMW obtenidas mediante síntesis verde.....	28
<b>Figura 2.</b> Cometas de núcleos de cardiomiocitos RL-14 a densidades poblaciones de (A) $3 \times 10^3$ células/mL y (B) $3.5 \times 10^3$ células/mL. Tomado a 20X. ....	31
<b>Figura 3.</b> Cometas de núcleos de cardiomiocitos RL-14 con tiempo mayores de desnaturalización donde (A) nubes difusas y (B) contornos poco definidos. Tomado a 20X. Las flechas amarillas indican el comportamiento descrito. ....	32
<b>Figura 4.</b> Protocolo de ensayo Cometa para cardiomiocitos RL-14. (A) cultivos control de cardiomiocitos RL-14. (B) interacción de las AuNPs-ChHMW con los cardiomiocitos RL-14. (C) lavado de los portaobjetos. (D) Pre-tratado de los portaobjetos con agarosa NMA. (E) viabilidad y densidad celular. (F) Incorporación de las células en agarosa. (G) Lisis. (H) Desnaturalización. (I) Electroforesis. (J) Neutralización, fijado y tinción. (K) lectura y procesamiento de imágenes obtenidas.....	34
<b>Figura 5.</b> Tipos de morfologías presentadas durante el ensayo Cometa de cardiomiocitos RL-14 expuestos a. a tratamientos de D1 a D5 de AuNPs-ChHMW durante 24 horas y sus respectivos controles negativo y positivo ( $H_2O_2$ ). Tomado a 20X.....	36
<b>Figura 6.</b> Tipos de morfologías presentadas durante el ensayo Cometa de cardiomiocitos RL-14 expuestos a. a tratamientos de D6 a D10 de AuNPs-ChHMW durante 24 horas y sus respectivos controles negativo y positivo ( $H_2O_2$ ). Tomado a 20X. ....	36
<b>Figura 7.</b> Tipos de morfologías presentadas durante el ensayo Cometa de cardiomiocitos RL-14 expuestos a. a tratamientos de D1 a D5 de AuNPs-ChHMW durante 72 horas y sus respectivos controles negativo y positivo ( $H_2O_2$ ). Tomado a 20X.....	37
<b>Figura 8.</b> Tipos de morfologías presentadas durante el ensayo Cometa de cardiomiocitos RL-14 expuestos a. a tratamientos de D6 a D10 de AuNPs-ChHMW durante 72 horas y sus respectivos controles negativo y positivo ( $H_2O_2$ ). Tomado a 20X. ....	37
<b>Figura 9.</b> Morfología de los cardiomiocitos RL-14 .....	38
<b>Figura 10.</b> Tamaño de cabeza y cola ( $\mu m$ ) en comparación con el tipo de cometa, a un periodo de 24h donde se tiene en (A) control positivo, negativo y tratamientos D1 a D4 y (B) tratamientos D5 a D10. Los valores se presentan como $\pm$ el error estándar con un $n=3$ ..	40
<b>Figura 11.</b> Tamaño de cabeza y cola ( $\mu m$ ) en comparación con el tipo de cometa, a un periodo de 72 h donde se tiene en (A) control positivo, negativo y tratamientos D1 a D4 y (B) tratamientos D5 a D10. Los valores se presentan como $\pm$ el error estándar con un $n=3$ . ....	42
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de ADN en cabeza y cola de núcleos de cardiomiocitos RL-145 expuestos a en los diferentes tratamientos de AuNPs-ChHMW y sus respectivos controles, para un periodo de (A) 24 h y (B) 72 h. Los valores se presentan como $\pm$ el error estándar con un $n=3$ .....	44
<b>Figura 13.</b> Gráficos de medias donde (A) porcentaje de ADN en cabeza y cola de núcleos de cardiomiocitos en interacción con las AuNPs-ChHMW y (B) porcentaje de ADN en cabeza y cola a los periodos de incubación de 24 y 72 h.....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones volumétricas de AuNPs-ChHMW utilizadas durante el ensayo y su respectiva abreviatura.....	24
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los diferentes tipos de cometa según su porcentaje de ADN en cola.....	26
<b>Tabla 3.</b> Momento Olive y momento de cola para cada uno de los tratamientos de AuNPs-ChHMW a 24h de evaluación .....	47
<b>Tabla 4.</b> Momento Olive y momento de cola para cada uno de los tratamientos de AuNPs-ChHMW a 72h de evaluación .....	48

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
IT	Ingeniería de tejidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NPs	Nanopartículas
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNPs-ChHMW	Nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano de alto peso molecular
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TiO <sub>2</sub> NPs	Nanopartículas de dióxido de titanio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
AT	Azul de tripano
NMA	Agarosa de punto de fusión normal
LMA	Agarosa de bajo punto de fusión
MO	Momento Olive
MT	Momento de la cola
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua destilada

## RESUMEN

Entre las estrategias de la ingeniería de tejidos (IT), se busca mejorar la función biológica de los diferentes procedimientos médico-quirúrgicos, además de la innovación de nuevos biomateriales, todo ello en pro de alternativas terapéuticas para las enfermedades cardiovasculares. Uno de los campos de acción que aborda la IT es el desarrollo de superficies nanoestructuradas, nanopartículas y biocompuestos, en donde sus propiedades superficiales y fisicoquímicas, pueden mejorar su comportamiento biocompatible.

Debido a que en los procesos de síntesis de los nanomateriales se emplean en su gran mayoría agentes reductores y estabilizantes de origen químico, estos pueden ocasionar efectos genotóxicos, todo ello en relación con las tendencias de aglomeración física, agregación y el revestimiento de la superficie, las cuales, inciden en la captación celular del nanomaterial. Basado en lo anterior, el uso de nanomateriales aumenta los efectos adversos causado por la internalización de nanoestructuras a nivel subcelular, generando alteraciones en las vías de señalización bioquímica celular y ocasionando modificaciones y daños en el ADN.

En este contexto, se determinó el efecto genotóxico de nanopartículas de oro obtenidas por síntesis verde sobre núcleos de cardiomiocitos RL-14, donde se evaluó la interacción de las AuNPs con los cardiomiocitos a diferentes concentraciones volumétricas desde 10 al 100 % v/v, con el objetivo de determinar su posible aplicación en el campo de la ingeniería de tejidos cardíaca como estrategia terapéutica para el uso de materiales bioactivos con propiedades ópticas y bioeléctricas.

Para determinar el efecto genotóxico de las nanopartículas de oro en interacción con los cardiomiocitos ventriculares humanos RL-14 se procedió a estandarizar un protocolo de ensayo Cometa, en donde se obtuvieron los parámetros necesarios para obtener imágenes que permitieron el análisis óptimo de los cometas obtenidos. Bajo este mismo esquema, se estableció el daño morfológico en los núcleos de cardiomiocitos RL-14 expuestos a nanopartículas de oro, donde se logró establecer una clasificación de los diferentes tipos de cometa según el daño que estos presentaban y así poder establecer la morfología de cada cometa. Además, en los diferentes tratamientos, se encontró que los cometas tipo 1, presentaron cabezas de cometa definidas con tamaños similares al control negativo, por lo que de dicha interacción se encontró que a medida que aumenta el daño en el ADN se exhiben polimorfismos del tamaño en la cola y cabeza del ADN.

Por otro lado, se analizaron los cometas obtenidos y se determinó el porcentaje de ADN en cabeza y cola para cada uno de los tratamientos de AuNPs-ChHMW y los controles a periodos de incubación de 24 y 72 horas, encontrando que el porcentaje de ADN en cola era menor en comparación con el control positivo, por lo que el daño genotóxico causado por las AuNPs-ChHMW no presentó cambios estadísticamente significativos, y esto se debe a que las nanopartículas de oro obtenidas por síntesis verde, tienen un tamaño y una estabilidad que favorece la funcionalidad biológica de los cardiomiocitos. Dichos daños, no

solo están relacionado con el nanomaterial sino con factores dentro del sistema como el exceso del disolvente en las concentraciones más bajas de estudio, donde se expresa un porcentaje de cola mayor en comparación con el control negativo.

En conclusión, las nanopartículas de oro obtenidas por síntesis verde empleando quitosano de alto peso molecular como agente reductor y estabilizante a diferentes concentraciones y diferentes periodos de evaluación, no presentaron un daño genotóxico significativo en comparación con el control positivo, el cual expresó altos porcentaje de ADN en cola.

**Palabras claves:** Ensayo Cometa, Genotoxicidad, ADN, Cardiomiocitos, nanopartículas de oro.

**CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN** Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo con una prevalencia de 17.9 millones en el 2016 y se prevé que esta cifra aumentará a 23.6 millones para el año 2030 [1], lo cual ha aumentado la necesidad de proponer nuevas estrategias de prevención, promoción y tratamiento para mitigar los daños ocasionados por las enfermedades cardíacas.

Entre las estrategias se empieza a potencializar la ingeniería de tejidos (IT), la cual busca mejorar la función biológica de los diferentes procedimientos médico-quirúrgicos actuales, además de la innovación de nuevos biomateriales todo ello en pro de alternativas terapéuticas para las ECV. Una de los campos de acción que aborda la IT es el desarrollo de superficies nanoestructuradas, nanopartículas y biocompuestos, en donde sus propiedades superficiales y fisicoquímicas únicas, pueden mejorar el rendimiento biológico de los biomateriales convencionales usados para el tratamiento de las ECV, como por ejemplo favorecer las características biofuncionales de los parches cardiacos [2]. Sumado a ello, diversos grupos investigativos se han enfocado en estudiar los diferentes comportamientos tisulares y celulares involucrados en el desarrollo y progresión de las enfermedades cardiacas.

Los nanomateriales son materiales de origen natural o sintético con alguna de sus escalas a nivel nanométrico, que contienen partículas en un estado no unido, ya sea como agregados o como aglomerados, dentro de estos se encuentran los nanotubos de carbono (CNT), metales catalíticos, óxidos metálicos, puntos cuánticos, dendrímeros, nanopelículas, nanofibras, nanopartículas compuestas y demás materiales sintetizados generalmente por técnicas de reducción química, irradiación, reacción electroquímica, hidrotermia, reducción solvo-térmica y la reducción fotoquímica [3]. Debido a que en los procesos de síntesis de los nanomateriales se emplean en su gran mayoría agentes reductores y estabilizantes de origen químico, estos pueden ocasionar efectos genotóxicos, todo ello en relación con las tendencias de aglomeración física, agregación y el revestimiento de la superficie, las cuales, inciden en la captación celular del nanomaterial [4].

Basado en lo anterior, es importante tener en cuenta que el uso de nanomateriales para aplicaciones clínicas, es susceptible a un aumento de efectos adversos causado por un incremento en la captación de nanoestructuras a nivel subcelular, ya que una vez que se presente la interacción célula-nanomaterial, es posible que esta sea internalizada y ocasione alteraciones en las vías de señalización bioquímica celular e interactúe con el núcleo, lo cual ocasiona modificaciones y daños en el ADN, para conocer como la interacción entre nanomaterial y célula el ensayo cometa se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño de ácido desoxirribonucleico (ADN) a causa de dichas interacciones. Este ensayo se basa en la visualización microscópica de las imágenes del ADN después que las células son embebidas en agarosa, lisadas y sometidas a una electroforesis alcalina, la cual, por corrimiento de cargas en campo eléctrico, los bucles de ADN generan una cola, dando una apariencia de cometa a células que han sufrido algún daño en su material genético [5].

En este contexto, la ingeniería de tejidos cardiovascular propone emplear materiales en los que se potencialicen las propiedades fisicoquímicas y mejoren la interacción célula-nanomaterial, permitiendo mejorar la biocompatibilidad de este y manteniendo las propiedades del mismo, dando lugar al desarrollo de una plataforma de estudio biológico en el marco de las vías bioquímicas involucradas en los procesos celulares.

La presente investigación se centró en la determinación del efecto genotóxico de nanopartículas de oro sobre núcleos de cardiomiocitos RL-14, a diferentes concentraciones, con el objetivo de establecer su posible aplicación en el campo de la ingeniería de tejidos cardíaca como estrategia terapéutica para el uso de materiales bioactivos con propiedades ópticas y bioeléctricas. El uso de dichos nanomateriales en interacción con el tejido podría causar efectos genotóxicos alterando las propiedades genéticas y proteómicas de la célula, debido a las características intrínsecas del material, lo cual puede desencadenar eventos adversos tales como inflamación y daños en el ADN derivado de la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la ingeniería de tejidos se ha enfocado en el desarrollo de diferentes tipos de biomateriales a escala micro y nanométrica. Dichos materiales pueden exhibir diversos comportamientos derivados de sus propiedades físico-químicas en interacción con modelos biológicos, lo cual puede promover respuestas inflamatorias, citotóxicas y genotóxicas dependientes del proceso de fabricación.

Los materiales nanoestructurados son foco de estudio para la IT debido a sus propiedades intrínsecas, con las cuales se busca mejorar la funcionalidad biológica. Estos materiales incluyen características como el área superficial, rugosidad, carga eléctrica, topografía, morfología y composición química. Con base en lo anterior y en relación al desarrollo de nuevos materiales con posible aplicación en el campo de la medicina cardiovascular, se evidencia la necesidad de valorar mediante técnicas *in vitro* los efectos secundarios ocasionados por la interacción nanomaterial – célula.

Es por esto, que diversos grupos de investigación han evaluado en modelos *in vitro* empleando diferentes tipos celulares la interacción con nanopartículas para determinar el efecto genotóxico asociado al diámetro de las partículas, concentración, morfología y potenciales de oxidación. Lo que, para su uso en el campo de la medicina, más en concreto en campo cardiovascular, se busca evaluar el efecto genotóxico de las nanopartículas de oro obtenidos por síntesis verde con un modelo de cardiomiocitos ventriculares humanos RL-14, para poder conocer esta interacción que puede causar a nivel de roturas en ADN y así poder evaluar su posterior uso como terapias para las diferentes enfermedades cardiovasculares.

Este proyecto aportó conocimiento acerca de los efectos secundarios derivados de la interacción célula-nanomaterial, temática de estudio que se involucra con las áreas de interés del Grupo de Dinámica Cardiovascular. Donde la línea de investigación de ingeniería de tejidos y prótesis cardiovascular ha trabajado en el desarrollo de biomateriales a escala nanométrica para la generación de estructuras con propiedades mejoradas como posibles tratamientos a enfermedades cardiovasculares, como el daño tisular o recuperación de la motilidad parietal del miocardio, y es por esto que se hace necesario conocer dicha interacción bajo un protocolo estandarizado para las células cardiacas.

**Pregunta de investigación:** ¿Cuál es el efecto genotóxico de nanopartículas de oro obtenidas por síntesis verde evaluadas en un modelo *in vitro* de cardiomiocitos RL-14?

## 1.3 MARCO TEÓRICO

### 1.3.1 Cardiomiocitos

El tejido muscular cardíaco está conformado por los cardiomiocitos, los cuales son células contráctiles que poseen un tamaño aproximado de 20  $\mu\text{m}$  para las cámaras auriculares y 140  $\mu\text{m}$  para las cámaras ventriculares. Dentro de las diferentes subestructuras celulares que tienen los cardiomiocitos se encuentran las miofibrillas, las cuales ocupan aproximadamente el 50 % del volumen celular y conforman los elementos contráctiles (filamentos de miosina y actina) conformando así los sarcómeros (estructura fundamental de contracción) [6].

Los cardiomiocitos, son células especializadas cuya función principal es generar la contracción de las paredes cardíacas. Este proceso se da a través de proteínas membranales, las cuales poseen canales de apertura y cierre que actúan en respuesta a cambios en el potencial de la membrana [7], por lo tanto, la conducción eléctrica se origina espontáneamente y se transmite célula a célula mediante las uniones gap. La propagación entre estas células a través de las vías de conducción es sincrónica y genera la activación ordenada de las distintas regiones del corazón; dando origen a la despolarización y repolarización celular cardíaca [8].

### 1.3.2 Núcleo celular

El núcleo celular es una estructura organizada compuesta de proteínas, nucleótidos, carbohidratos y lípidos, la cual está encargada de múltiples funciones dentro de la célula como la replicación y transcripción de ácidos nucleicos, el almacenamiento de información genética que se transmitirá a las células hijas y la división celular [9-10].

En la célula el núcleo está limitado por el citoplasma con una doble membrana denominada envoltura nuclear, la cual se encuentra separada por la cisterna perinuclear. La membrana externa del núcleo contiene ribosomas unidos al retículo endoplasmático y exhibe permeabilidad asociada a los poros, los cuales son un complejo de proteínas encargadas de permitir el paso y salida de sustancias [11]. En el interior del núcleo se encuentra la cromatina, que consiste en hebras de moléculas de ADN de doble hélice, al igual de subunidades estructurales repetitivas denominadas nucleosomas [12].

El núcleo logra la síntesis de componentes y productos celulares mediante la transcripción del ADN al ARN y el procesamiento del ARNm, proceso que se lleva cabo mediante señales externas o internas de la célula [13].

### 1.3.3 Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son partículas a escala nanométrica, cuyas dimensiones van de 1 a 100 nm [3]. Estas, muestran propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas que mejoran

la función biológica. En la naturaleza las NPs pueden ser encontradas en el ambiente, resultantes tanto de procesos naturales como industriales. En estos últimos, se producen mediante diferentes métodos químicos, denominados síntesis Top-down y síntesis Bottom-up [14]. Según la composición de las NPs, estas se clasifican en tres grupos, el primero son NPs inorgánicas tales como NPs de óxido entre las que se incluyen la NPs de SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, NPs metálicas de oro (Au) o plata (Ag) y puntos cuánticos (QD). El segundo grupo incluye NPs orgánicas, las cuales se sintetizan con compuestos orgánicos como las nanopartículas de quitosano, seda, ferritina, poli-e-lisina y N-alamina y finalmente, el tercer grupo incluye NPs basadas en carbono, como las nanofibras y los nanotubos de carbono [15].

#### **1.3.4 Interacción nanopartícula – célula**

Las NPs según su tamaño pueden atravesar la membrana celular por mecanismos de endocitosis (receptores) o difusión (poros) y posteriormente anclarse en el núcleo, permitiendo la interacción con subestructuras celulares, que tienen tamaños similares, como proteínas y otras macromoléculas [2]. Una vez las NPs se encuentran en el interior del citoplasma, estas pueden interactuar directamente con los poros nucleares y a su vez con las moléculas o proteínas del ADN [3].

La interacción NPs - células puede conllevar a respuestas fisiológicas entre las que se encuentran alteraciones en el ADN, estrés oxidativo, inflamación y respuesta a señalización aberrante [16]. Debido a esto, es importante destacar que las propiedades de las NPs como tamaño, forma, pureza y carga superficial, pueden influir en la respuesta celular. Algunos de los comportamientos que pueden conducir a daños en el ADN derivado de las propiedades específicas de cada tipo de NPS, son los contaminantes residuales, los cuales generan alteraciones en el ADN. Así mismo, la carga superficial de NPs también juega un papel importante en el control de la absorción celular, debido a que la membrana plasmática y el ambiente intracelular están cargados negativamente, por lo tanto, las NPs aniónicas pueden ser endocitadas contrario a lo presentado con las NPs catiónicas [3].

#### **1.3.5 Genotóxicidad**

La genotóxicidad es la capacidad que ejercen agentes químicos, físicos y biológicos para ocasionar alteraciones en el ADN, lo cual puede conllevar a mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas, desencadenando efectos biológicos adversos [4].

En los últimos años se han identificado numerosos agentes genotóxicos en la mayoría de las actividades relacionadas con el hombre: laboral, farmacéutica, alimenticia o estilo de vida, lo que lleva a que el daño en el ADN por agentes genotóxicos pueda ser derivados de procesos de oxidación, alquilación e hidrólisis de bases, como 7,8-dihidroxi-guanina (8-oxo-G), 7-metilguanina, la depurinación y depirimidinación. Los agentes genotóxicos pueden generar la incorporación de errores en el apareamiento de las bases nitrogenadas, induciendo la producción excesiva de radicales libres, las cuales son moléculas de oxígeno

inestable, parcialmente reducidas y altamente reactivas, que causan estrés en la célula y pueden ocasionar daños directos en la cadena de ADN [17].

Entre los agentes químicos, se encuentran las NPs, las cuales al estar en contacto con la célula pueden interactuar con el material genético y causar efectos genotóxicos. Estos efectos, pueden clasificarse como genotoxicidad primaria o secundaria, siendo la primaria aquellos efectos que no causan inflamación y la secundaria aquellos efectos causantes de inflamación. La inflamación es un proceso fisiológico que se presenta en respuesta a una lesión tisular, mediado por células inflamatorias que secretan factores solubles como las citosinas, factores de inhibición de la migración, especies reactivas de nitrógeno y oxígeno a nivel intracelular (ROS) [14]. Así mismo, estos factores también promueven el daño en el ADN en forma de fragmentación cromosómica, mutaciones y formación de aductos de ADN [18].

### **1.3.6 Ensayo Cometa**

El ensayo de electroforesis alcalina de células individuales embebidas en gel, se conoce como ensayo Cometa, el cual permite medir cualitativa y cuantitativamente las roturas de cadena simple y doble de ADN a nivel celular de forma no invasiva. Este ensayo, es sensible a bajos niveles de daño a diferencia de otras pruebas de citogenéticas clásicas, lo que ha permitido su amplio uso en modelos *in vitro* e *in vivo* para la evaluación de diferentes agentes genotóxicos [19].

En el ensayo Cometa, las células luego de ser expuestas a un agente genotóxico son encapsuladas en una capa delgada de gel de agarosa dispuesta sobre portaobjetos para su posterior lisis, para exponer el núcleo celular a procesos de electroforesis mediados por corrimiento de cargas en un campo eléctrico. Posterior al proceso de electroforesis, se espera observar la formación de cometas derivados de la fragmentación del ADN, en donde se muestran cabezas con formación intacta o difusas y colas asociadas al material de ADN afectado en los núcleos celulares que presentan alteraciones, y en células sin daño se espera obtener solo cabezas o núcleos sin alteraciones y la inexistencia de colas [20].

La categorización del cometa se da en cinco clases (0-4), casi todos reportados según el ADN en cola y se reporta en unidades arbitrarias. Esto también puede ser interpretado reportándose la proporción de células con daño (cola del cometa), midiéndose la extensión de la migración del ADN como radio longitud /ancho con las células que no exhiben migración como grado 1 [5], por lo que dicho método es variable y según sea el criterio en los últimos años se han diseñado softwares para el análisis de las imágenes, generando parámetros como el momento Olive, el cual se define como el producto del porcentaje del ADN en el cometa (intensidad) y la media de la distancia entre la cabeza y la posición de la cola, este parámetro toma en cuanto el tamaño de los fragmentos (longitud de la cola) y el número de fragmentos (intensidad de la cola) [5].

El ensayo Cometa presenta amplio uso en la evaluación nanoestructuras metálicas o agentes externos para múltiples disciplinas científicas como la toxicología genética, el bio-monitoreo ambiental, la investigación clínica y la epidemiología molecular [21]

## 1.4 ESTADO DEL ARTE

En los últimos años, en el área de la nanotecnología el desarrollo de nanopartículas (NPs) para posibles aplicaciones en el área médica ha sido foco de estudio de diversos grupos investigativos, conllevando a la valoración del efecto genotóxico de estas en interacción con modelos *in vitro* e *in vivo*.

Pruskia y colaboradores evaluaron en erizos de mar los daños estructurales y de la cromatina nuclear ante exposición a radiación ultravioleta (UV-B) y diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, empleando las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y el ensayo de electroforesis de una sola célula para visualizar cambios morfológicos y alteraciones en el ADN. En este estudio se encontró que la morfología de los espermatozoides se afectó significativamente ante la exposición a radiación UV. Así mismo, mediante el ensayo Cometa se evidenciaron alteraciones en el ADN de la cola en un 23.7 % con un aumento significativo en la rotura de la cadena del ADN, comportamiento que incrementó en función a las diferentes concentraciones del peróxido de hidrógeno [22].

El grupo de Oliviero estudió los cambios presentados en el ADN en espermatozoides de erizos de mar de la especie *Paracentrotus lividus* expuestos a nanopartículas de óxido de Zinc de diferentes tamaños (14 nm, 100 nm y mayores a 200 nm) empleando el ensayo Cometa. En los resultados se observó que los espermatozoides expuestos a las nanopartículas presentaron alteraciones en sus núcleos y aumento en la longitud de la cola, la cual incrementó en relación a la concentración de las nanopartículas y el tamaño. Donde, las NPs de 14 nm generaron mayor alteración en los núcleos [23].

El grupo investigador de Sario evaluó los efectos genotóxicos de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub> NPs) a concentraciones de 8, 40, 80 y 800 µg / ml en neuroblastos de mosca *Drosophila melanogaster* mediante el ensayo Cometa. Como resultado de este estudio se encontró que a concentraciones de 8 y 40 µg/mL de NPs TiO<sub>2</sub> se presentó aumento en el daño del ADN y una reducción de este a concentraciones de 80 y 800 µg/mL en comparación con su control negativo [24].

Carmona y colaboradores estudiaron la actividad genotóxica en hemocitos de mosca *Drosophila melanogaster* expuestos a nanopartículas de anatasa de TiO<sub>2</sub> a concentraciones de 0.08, 0.4, 0.8 y 1.6 mg/mL para detectar posibles alteraciones en el ADN. Se evaluó mediante el ensayo Cometa la interacción de los hemocitos con micro y nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. En este estudio se encontró daños en el ADN de los hemocitos expuestos a las NPs, contrario al comportamiento presentado con las micropartículas; concluyendo que las características físicas de las NPs pueden inducir daño en el ADN [25].

Turna y su grupo investigador analizaron los efectos genotóxicos generados por nanopartículas de SAS (estructura del dióxido de titanio - SO<sub>2</sub>) de 6, 15, 30 y 55 nm a concentraciones de 0.1, 1, 5 y 10 mM en moscas *Drosophila melanogaster*. Para este

estudio se realizó el ensayo Cometa en hemocitos, encontrando que con todos los tamaños de NPs de SAS se presentó aumento en los niveles de rotura del ADN. Sin embargo, este daño fue más notorio a concentraciones de 5 y 10 mM, debido al estrés oxidativo causado por las NPs al estar en interacción con el ADN [26].

Haza y colaboradores estudiaron los efectos genotóxicos de nanopartículas de oro (AuNPs) en células tumorales de leucemia humana (HL-60) y células de hepatoma humano (HepG2). En esta investigación se empleó el ensayo Cometa para evaluar las alteraciones en el ADN, encontrando que las AuNPs de 30, 50, y 90 nm generaron en ambas líneas celulares un aumento significativo en el daño del ADN después de 24 horas de interacción, presentando para la línea celular HepG2 un aumento del 32 % y para la línea HL-60 un aumento del 27 % [27].

Navoni y su grupo investigador evaluaron en células HepG2 mediante el ensayo Cometa los efectos genotóxicos de la diosgenina, materia prima para la síntesis química de hormonas esteroidales. En este estudio se evidenció que a concentraciones de 40 y 60  $\mu\text{M}$  de diosgenina, las células HepG2 presentaron un aumento significativo en el daño del ADN dada la presencia de cometas con cabeza difusas y colas alargadas, comportamiento relacionado a la interacción con la diosgenina, la cual presenta estructura similar a las hormonas esteroideas del cuerpo debido su composición lipídica, facilitando la entrada al interior de la célula y su interacción con el núcleo celular, conllevando a cambios estructurales en el ADN [28].

El grupo de Wang evaluó el rol de la proteína Nrf2, proteína mediadora de la respuesta antioxidante, para disminuir el daño del ADN en células HepG2 expuestas a nanopartículas de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$  NPs) a concentraciones de 0.1, 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  durante periodos de 0 a 24 horas. Para la evaluación de las alteraciones en el ADN se empleó el ensayo Cometa analizando el momento Olive (OTM). Se observó que los niveles de OTM en las células tratadas a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{TiO}_2$  NPs mostraron aumento en el daño del ADN después de 12 horas de tratamiento, y la proteína Nrf2 redujo la susceptibilidad al daño en el ADN inducido por las  $\text{TiO}_2$  NPs [29].

Cirillo y colaboradores estudiaron las alteraciones presentadas en las cadenas de ADN de linfocitos de sangre periférica humana (PBL) y macrófagos murinos (Raw264.7), ante la interacción con AuNPs de 5 nm y 15 nm a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$  empleando el ensayo Cometa. Como resultado se observó que las PBL fueron más sensibles a las NPs de 5 nm y 15 nm en comparación con las Raw264.7. Así mismo, mediante el análisis del momento Olive se encontró que a concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$  se presentó un aumento en el daño del ADN de 3.6 veces para las PBL y de 2.7 veces para las Raw 264.7 en comparación con su control, comportamiento evidenciado después de 24 h de exposición de las células a las AuNPs, lo que sugiere que características como el tamaño, la concentración y la forma de las NPs influyen en la interacción partícula-célula [30].

Martínez y su grupo investigador analizaron la genotoxicidad generada por nanopartículas de oro (AuNPs) estabilizadas con dendrímeros de poliamidoaminas (PAMAM) o citrato de sodio en células HEPG2 y células humanas mononucleares de sangre periférica (PBMC), a concentraciones de AuNPs de 1 y 50  $\mu\text{M}$  empleando el ensayo Cometa para evaluar el daño en el ADN causado por las AuNPs. Los resultados mostraron que las células HepG2 tratadas tanto con PAMAM como con citrato de sodio a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  presentaron un aumento significativo en el daño del ADN aproximadamente del 67 %, mientras que a concentraciones 1  $\mu\text{M}$  se evidenció un mayor daño en las tratadas con PAMAM comparado con las tratadas con citrato. Del mismo modo, las células de PBMC tratadas con PAMAM no presentaron un daño significativo en el ADN a ningunas de las concentraciones a diferencia de las tratadas con citrato en las cuales se presentó un daño aproximado del 65 % [31].

George y colaboradores estudiaron la genotoxicidad de nanopartículas de oro (AuNP) de 14 nm a concentraciones de 6.2, 12.5, 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), empleando el ensayo Cometa. Se encontró que las AuNPs ocasionaron daño en el ADN, el cual fue dependiente de la concentración y expresado según el tamaño de las colas generadas ante la interacción con las NPs [32].

Kumar y colaboradores investigaron el daño oxidativo en el ADN de la línea celular HepG2 generado por la exposición a nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . Se evaluaron concentraciones de 1, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{g/mL}$  de las NPs  $\text{TiO}_2$  durante un periodo de interacción de 24 h. El daño en el ADN se evaluó mediante el ensayo Cometa, evidenciando en este que las NPs  $\text{TiO}_2$  indujeron daño oxidativo en el ADN, el cual se incrementó conforme aumentó la concentración de las NPs [33].

Demir y su grupo investigador evaluaron las respuestas genotóxicas de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$  y  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$  en linfocitos de sangre periférica humana (PBM) y células renales embrionarias (HEK 293) mediante el ensayo Cometa. Los resultados mostraron que las nanopartículas de  $\text{ZrO}_2$  y  $\text{Al}_2\text{O}_3$  no generaron genotoxicidad significativa en las células HEK 293 y en las PBM. Sin embargo, las células tratadas con NPs  $\text{TiO}_2$  a concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  presentaron daño genotóxico, mientras que las tratadas con concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  no mostraron daños significativos en el ADN. Estos resultados se relacionaron con la naturaleza de las NPs entre estas la electronegatividad del tipo de ion [33].

Xia y colaboradores estudiaron el efecto genotóxico de nanopartículas de oro comerciales con tamaños de 5, 20 y 50 nm a concentraciones de 12.5, 5 y 1.67  $\mu\text{g/mL}$  en un modelo células de carcinoma hepatocelular (HepG2) y células de fibroblastos de pulmón de hámster chino (CHL), utilizando el ensayo Cometa. El grupo investigador determinó que AuNP de 20 y 50 nm no indujeron un daño evidente en el ADN en las células HepG2 a las concentraciones estudiadas, mientras que las NPs de 5 nm indujeron un incremento dependiente de la dosis en el daño del ADN después de 24 h de exposición [34].

Schulz y su grupo de investigación evaluaron la genotoxicidad de diferentes tamaños de nanopartículas de oro (2, 20 and 200 nm) administradas por sonda hasta los pulmones con una dosis única de 18 g a ratas Wistar machos adultos, donde encontraron que para tamaños de 20 y 200 nm no se observaron daños relevantes en el ADN, mientras que, para las NPs de 2 nm el daño fue mayor y se aumentó el número de células muertas después del tratamiento [35].

Kim e investigadores realizaron una evaluación *in vitro* e *in vivo* de los efectos genotóxicos del nitrato de amonio cérico (CAN) y 1,3-propano sultona (1,3-PS) en hámster chino (CH) y en un modelo *in vitro* de células de pulmón de hámster chino se evaluaron concentraciones de 17.5, 35, 75 µg/mL en periodos de 2 horas y 24 horas de exposición. Los resultados mostraron que el CAN presentó respuestas negativas en todos los ensayos de genotoxicidad *in vitro* y en la combinación *in vivo* con los ensayos micronúcleos. Mientras tanto, 1,3-PS se obtuvo resultados positivos en todos los ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* [36].

Arrebola y colaboradores evaluaron la respuesta genotóxica de ciclofosfamida y bleomicina en ratones Balb/c mediante el ensayo Cometa alcalino en de linfocitos de sangre periférica derivados del modelo animal a periodos de evaluación de 24 y 48 horas antes de la eutanasia del animal. Dichos resultados mostraron que el mayor valor de inducción de daño en el ADN se obtuvo con el uso de la ciclofosfamida y bleomicina, ambas en el diseño de administración de 48 y 24 horas antes de la eutanasia [37].

La valoración de los efectos genotóxicos de nanopartículas metálicas en interacción con modelos *in vitro*, contribuirá a la comprensión de como las propiedades fisicoquímicas de las NPs tales como el tamaño, el área superficial, la composición, forma y concentración podrían afectar el núcleo celular de los cardiomiocitos RL-14.

## **1.5 OBJETIVOS**

### **1.5.2 Objetivo General**

Determinar el efecto genotóxico de nanopartículas de oro sobre núcleos de cardiomiocitos RL-14.

### **1.5.3 Objetivos Específicos**

- Estandarizar un protocolo de ensayo Cometa para cardiomiocitos ventriculares humanos RL-14 en interacción con nanopartículas de oro.
- Establecer el daño morfológico en los núcleos de cardiomiocitos RL-14 expuestos a nanopartículas de oro.
- Evaluar la genotoxicidad de nanopartículas de oro en núcleos de cardiomiocitos RL-14.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Reactivos utilizados

Para el desarrollo de este proyecto se manejaron los siguientes reactivos Tris (hidroximetil) aminometano ((CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>), Triton X100 BioChemica (C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>) y agarosa de bajo punto de fusión grado Biología Molecular de Fisher Chemical, cloruro de sodio grado farmacéutico (NaCl) y dimetilsulfóxido puro (DMSO) (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS) de PanReac, agarosa de punto de fusión normal tipo II-A, hidróxido de Sodio en lentejas (NaOH), Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) en puro en polvo, Bromuro de Etidio al 95%, Sal N-Lauroil Sarcosinato sodio(C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>NNaO<sub>3</sub>), tripsina EDTA al 0.25 % de Sigma-Aldrich, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y tampón fosfato salino (PBS) de Lonza y azul de tripano de Loba Chemie.

### 2.2 Condiciones del ensayo

Para el desarrollo y análisis de resultados en este estudio experimental se impusieron las siguientes condiciones para discriminar entre casos y controles. Para los cultivos celulares de los cardiomiocitos RL-14 se definió como controles negativos aquellos cultivos que se mantuvieron en condiciones de viabilidad superiores al 90 % y morfología adecuada, y a los cuales no se les realizó ninguna intervención. Como control positivo se emplearon cultivos de cardiomiocitos RL-14 tratados con un agente genotóxico conocido que permitió obtener viabilidades superiores al 70% con variaciones en su morfología. Y se determinó como casos: aquellos cultivos que se sometieron a intervención mediante la interacción directa con nanopartículas de oro.

### 2.3 Síntesis nanopartículas

Las nanopartículas de oro (AuNPs-ChHMW) fueron obtenidas a través de síntesis verde, empleando 2.5 mM de ácido cloráurico (HAuCl<sub>4</sub>) como agente precursor y 6.92 mg/mL de quitosano de alto peso molecular como agente reductor y estabilizante. Las soluciones fueron almacenadas en recipientes de vidrio color ámbar y llevadas a refrigeración a temperaturas entre 4 – 7 °C. Dicha síntesis fue realizada por los investigadores del Grupo de Dinámica Cardiovascular.

### 2.4 Modelo *in vitro*: línea celular de cardiomiocitos ventriculares fetales humanos RL-14

El modelo *in vitro* que se empleó durante los experimentos consistió en un cultivo de células de la línea de cardiomiocitos ventriculares fetales humanos RL-14. Línea celular inmortalizada de cardiomiocitos humanos derivados de un cultivo primario post- mitótico.

Los cultivos de cardiomiocitos RL-14 fueron mantenidos a 37 °C en medio de cultivo Dulbecco's Modificado Eagle (DMEM) al 10 % (vol/vol) de suero bovino fetal (SBF),

suplementado con penicilina y estreptomicina e incubados al 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de O<sub>2</sub> y humedad relativa de 95 %. El medio de cultivo fue cambiado cada 3 días.

## 2.5 Interacción célula-nanopartículas

Se sembró una densidad celular de cardiomiocitos de  $15 \times 10^3$  por pozo en placas de 24 pozos, luego de 24 horas se trataron con diferentes concentraciones de las nanopartículas de oro (AuNPs-ChHMW), tal como se observa en la tabla 1. Los cultivos celulares tratados fueron evaluados a periodos de incubación de 24 y 72 horas bajo condiciones controladas de 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de O<sub>2</sub> y humedad relativa de 95 %. Se emplearon como control positivo (C+), células tratadas con 50 µM de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y como control negativo (C-), células con medio de cultivo sin tratamiento con las AuNPs-ChHMW.

**Tabla 1.** Concentraciones volumétricas de AuNPs-ChHMW utilizadas durante el ensayo y su respectiva abreviatura.

Tratamiento AuNPs-ChHMW	Concentración volumétrica (%v/v)
D1	10
D2	20
D3	30
D4	40
D5	50
D6	60
D7	70
D8	80
D9	90
D10	100

## 2.6 Densidad y viabilidad celular

Para conocer la densidad y viabilidad celular de cada muestra, se procedió con el retiro del medio de cultivo con o sin tratamiento y se realizó un lavado con cloruro de sodio (NaCl) al 0.9 %v/v, luego se descartó y se adicionó tripsina EDTA al 0.01 % v/v durante tres minutos. Seguidamente, las células fueron desprendidas mecánicamente y se agregaron en una relación 1:1 con medio de cultivo en un tubo *Eppendorf*. Finalmente, los cardiomiocitos fueron centrifugados a 1200 rpm durante cuatro minutos, luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.

Mediante la tinción con azul de tripano (AT) se identificó las células viables de las no viables (muertas), empleando una relación de 1:1 de suspensión celular y AT, luego se tomó 10 µL

de la mezcla y se depositó en un hemocitómetro y se procedió a contar dentro de los cuatro cuadrantes de la cámara las células vivas (traslucidas) y muertas (teñidas con azul). Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de viabilidad celular, de acuerdo a la siguiente ecuación[38]:

$$\%Viabilidad = \frac{No.Células Vivas}{No.Células Vivas+No.Células Muertas} * 100 \% \quad \text{Ecuación 1}$$

Para conocer la densidad celular del pozo, se tomó el número total de células contadas y se calculó empleando la ecuación 2[38]:

$$\frac{No.células}{mL} = \frac{Total\ de\ Células}{4} * 10^5 (factor\ de\ dilución) \quad \text{Ecuación 2}$$

## 2.7 Evaluación genotóxica: Ensayo Cometa

Se empleó el ensayo Cometa siguiendo el protocolo de Collins [19] bajo modificaciones para la evaluación genotóxica de las nanopartículas de oro (AuNPs-ChHMW) en interacción con los cardiomiocitos RL-14 y establecimiento del daño morfológico en los núcleos de las células.

A los cultivos celulares expuestos a los diferentes tratamientos de las AuNPs-ChHMW luego de conocer su viabilidad y densidad celular, se les calculó los  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular necesarios para contar con  $3 \times 10^3$  cardiomiocitos por cada tipo de *caso o control*.

Para realizar el ensayo Cometa, se pretrataron portaobjetos con agarosa de punto de fusión normal (NMA) al 0.1 % w/v para generar una capa delgada, la cual brinda soporte a las células. Luego, los portaobjetos fueron almacenados a 4 ° C. Posteriormente, se preparó agarosa de bajo punto de fusión (LMA) a una concentración de 0.5 % w/v en PBS al 1X y se llevó a una temperatura de 60° C durante 30 segundos. Después, se realizó una mezcla de los  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular con LMA obteniendo una solución final de 100  $\mu\text{L}$  y se depositó en forma de gotas sobre los portaobjetos pretratados, finalmente, las muestras fueron llevadas a 4 ° C en oscuridad durante 10 minutos.

Las muestras fueron depositadas en un buffer de lisis a 4 ° C en oscuridad durante 17 horas (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 nM Tris, 1 % Triton X-100 a un pH 10), para lisar las membranas celulares y permitir la migración de los fragmentos del ADN. Luego, se sumergieron en la cámara de electroforesis en un buffer alcalino (10 M NaOH, 200 nM EDTA a un pH 13) a 4 ° C durante 30 minutos, para procesos de desnaturalización del ADN. Seguidamente, se realizó la electroforesis a condiciones de 25 voltios, 300 miliamperios, 30 minutos y a una temperatura entre 4 – 6 ° C. Después del corrimiento de cargas, los portaobjetos se lavaron con solución neutralizante (0.4 M Tris a un pH 7.5) y se fijaron con metanol al 10 % v/v. Para la lectura, los portaobjetos fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración 0.02 mg/mL para la identificación de cadenas de ADN. Finalmente,

fueron registrados en un microscopio con módulo de fluorescencia a una magnificación de 20X.

## 2.8 Procesamiento de imágenes

Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los núcleos de cardiomiocitos RL-14 en interacción con las AuNPs-ChHMW, fueron procesadas y analizadas empleando los softwares de CometScore® (*open source*), el cual es una herramienta que permite calcular parámetros biológicos de forma semiautomática y OpenComet® (*open source*), el cual es un sistema de validación automático para modelos biológicos. Mediante los softwares usados se analizaron parámetros como el porcentaje de ADN en cabeza y cola, es decir la cantidad de ADN fragmentado que migró en el proceso de electroforesis, el momento Olive (OTM), basado en el tamaño de la cola del cometa más la fracción de ADN total desde el centro de la cabeza hasta el final de la cola, y el momento de la cola (TM), el cual es la longitud de la migración del ADN fuera del núcleo conformado por la cola del cometa.

Para determinar los daños morfológicos en los núcleos de los cardiomiocitos RL-14 se emplearon los softwares mencionados, los cuales permitieron obtener datos relacionados con la longitud de cabeza y de cola de cada cometa. Luego, con estos datos se relacionó la unidad de pixeles con micrómetros, en donde a una magnificación de 20X, 100 pixeles equivalen a 480,0042  $\mu\text{m}$ . Para conocer la magnitud del daño en el núcleo los cometas fueron clasificados por niveles [39] como se observa en la tabla 2, en donde el criterio de selección fue el porcentaje de ADN en cola, siendo cometas tipo 1, núcleos con el menor porcentaje daño y cometas tipo 5, núcleos con mayor porcentaje de daño.

**Tabla 2.** Clasificación de los diferentes tipos de cometa según su porcentaje de ADN en cola.

Clasificación tipo de Cometa	
<b>Tipo 1</b>	Menor a 5 % ADN en cola
<b>Tipo 2</b>	Entre 6 – 25 % ADN en cola
<b>Tipo 3</b>	Entre 26 – 60 % ADN en cola
<b>Tipo 4</b>	Entre 61 – 94 % ADN en cola
<b>Tipo 5</b>	Mayor a 95 % ADN en cola

## 2.9 Análisis estadístico

Se empleó el software Statgraphics Centurion XVIII®, para realizar un análisis ANOVA simple, el cual permitió determinar la desviación estándar, medias poblacionales, prueba de múltiples rangos, diferencias mínimas significativas y significancias estadísticas con valores  $P < 0.05$  %. Para este estudio se consideró un n poblacional de 3, el cual se llevó a

cabo por triplicado en momentos independientes. Los resultados fueron comparados con relación a sus controles.

## **2.10 Consideraciones éticas**

El presente trabajo apuntó a una investigación con riesgo mínimo debido a su naturaleza experimental, en la cual el objeto de estudio se dirigió a la implementación del ensayo Cometa en un modelo *in vitro* de cardiomiocitos en interacción con nanopartículas metálicas de oro. Se declara que durante la ejecución de este proyecto no se realizaron pruebas en humanos ni en animales y en ninguna etapa del proyecto se contempló la interacción con pacientes. Las muestras derivadas del estudio fueron imágenes de fluorescencia, de las cuales se obtuvo el porcentaje de ADN fragmentado como resultado del proceso de electroforesis, momento Olive (OTM) y momento de la cola (TM), y no se aplicaron a un sujeto humano de estudio o paciente. No se realizó ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de individuos. Se pone de manifiesto que para el desarrollo de la investigación estos procedimientos fueron regidos por las directrices establecidas en la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia.

### **Insumos biológicos, radiaciones u otros factores de riesgo:**

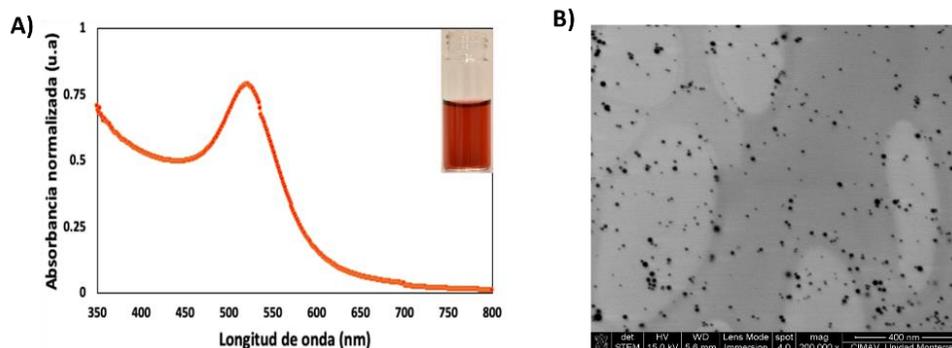
Los investigadores no manejaron elementos biológicos peligrosos y no fueron sometidos a radiaciones ionizantes u otras emisiones nocivas. El personal de investigación asociado guardó estricto cumplimiento de las normas de bioseguridad para la manipulación de material biológico y químico. Así mismo, se dispuso de los residuos de riesgo según las normas Nacionales e Internacionales establecidas para tal fin. Todo el equipo de investigación tiene capacitación para la manipulación de este material y del uso de los equipos asociados a la investigación.

Además, se implementaron cultivos celulares de la línea celular de cardiomiocitos RL-14 comercializado por American Type Culture Collection (ATCC®) para determinar las alteraciones y cambios morfológicos ante exposición a nanopartículas metálicas de oro.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización de las nanopartículas de oro

Después de realizada la síntesis de las AuNPs-ChHMW por los investigadores del Grupo de Dinámica Cardiovascular, estas fueron caracterizadas y analizadas. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 1, en donde se muestra el espectro de absorción correspondiente a la resonancia del plasmón de superficie característico del ion metálico de oro, donde la resonancia generada por el incremento en el movimiento electrónico de los electrones libres en la banda de conducción, permitió evidenciar la presencia o ausencia de dichas nanoestructuras. Además, se muestra la micrografía de las nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano de alto peso molecular, donde se encontró que el diámetro de partícula promedio es  $17 \pm 5$  nm (ver Fig. 1 b).



**Figura 1.** Espectros de absorción UV-Visible (A) y micrografías (B) de AuNPs-ChHMW obtenidas mediante síntesis verde.

### 3.2 Estandarización de protocolo de ensayo Cometa para cardiomiocitos RL-14 ante interacción con AuNPs-ChHMW

El ensayo de electroforesis alcalina de células individuales embebidas en gel, conocido como ensayo Cometa, se utiliza ampliamente como herramienta de biomonitorio para evaluar el daño del ADN, como lo son las roturas de cadena simple y doble del ADN. Este ensayo se basa en la capacidad de las roturas del ADN para relajar el super enrollamiento, lo que permite que los bucles de ADN se extiendan bajo un campo eléctrico para formar una cola similar a un cometa [40]. Dicho ensayo está diseñado para ser utilizado con cualquier modelo celular animal, pero el modelo comúnmente utilizado es el de linfocitos de sangre periférica, por lo que muchos de los protocolos diseñados se basan en esta tipología celular para determinar el efecto genotóxico de agentes externos.

Por ello, dependiendo del modelo celular a utilizar y el agente genotóxico a valorar, a continuación, se presentan las modificaciones en el protocolo para el ensayo Cometa de cardiomiocitos ventriculares humanos RL-14. La versión convencional del ensayo Cometa alcalino incluye una serie de fases de las cuales es necesario mantener todas las variables bajo control, ya que de esto depende la reproducibilidad y sensibilidad del ensayo. Después de obtener la suspensión celular, las fases básicas del ensayo incluyen la preparación de los portaobjetos, la lisis celular, la desnaturalización, la electroforesis, la fijación y por último la tinción de las muestras [41].

### **3.2.1 Preparación de los portaobjetos**

En esta fase del ensayo Cometa se realizó pretratamiento de los portaobjetos con un recubrimiento de agarosa de punto de fusión normal (NMA), puesto que, si se embeben las gotas (agarosa+células) directamente sobre la superficie del vidrio se generan pérdidas de las mismas durante las fases posteriores del ensayo, mientras que los portaobjetos pretratados disminuyen las pérdidas de la muestra de estudio y garantizan reproducibilidad a lo largo del diseño experimental.

Para esta estandarización se empleó agarosa NMA al 1 % w/v, según las recomendaciones de los diferentes protocolos del estado del arte [40]. Como variación se modificó el tipo de solvente, empleando PBS al 1X y agua destilada, donde se encontró que la solución de agarosa disuelta en agua disminuye la tensión superficial con el portaobjetos inhibiendo la capacidad de adhesión de las gotas de estudio. Mientras que, la agarosa NMA en PBS aumenta la capacidad de adhesión del pretratamiento generando pocas pérdidas durante el ensayo.

Para el proceso de recubrimiento, existen varias técnicas, como lo es el arrastre de la agarosa a lo largo del portaobjetos [21], en esta técnica se utiliza una cantidad específica de agarosa y se lleva a lo largo del portaobjetos, tratando de generar una capa uniforme, la cual fue descartada, puesto que se obtuvieron capas heterogéneas, gruesas y granuladas que generaron poca adherencia y ocasionaron pérdida de las gotas de estudio durante el ensayo. Otra técnica reportada por Collins, sugiere sumergir los portaobjetos en la agarosa, la cual fue la empleada en este estudio puesto que permitió obtener capas uniformes y delgadas, lo que mejoró la adherencia de la agarosa al portaobjetos.

Tres características a tener en cuenta para llevar a cabo un pretratamiento exitoso son i) los portaobjetos de vidrio deben estar libres de grasa y polvo, con el fin de que al momento de sumergirlos en la agarosa, no exhiban incrementos en la tensión superficial que generen pérdida de capas finas del pretratamiento, ii) la temperatura de almacenamiento de los portaobjetos previo al pretratamiento deben conservarse a temperatura ambiente entre 19 – 20 °C, lo cual mejora la generación de una capa uniforme de agarosa y iii) la temperatura de la agarosa debe estar por encima de los 42 °C, debido a que a temperaturas

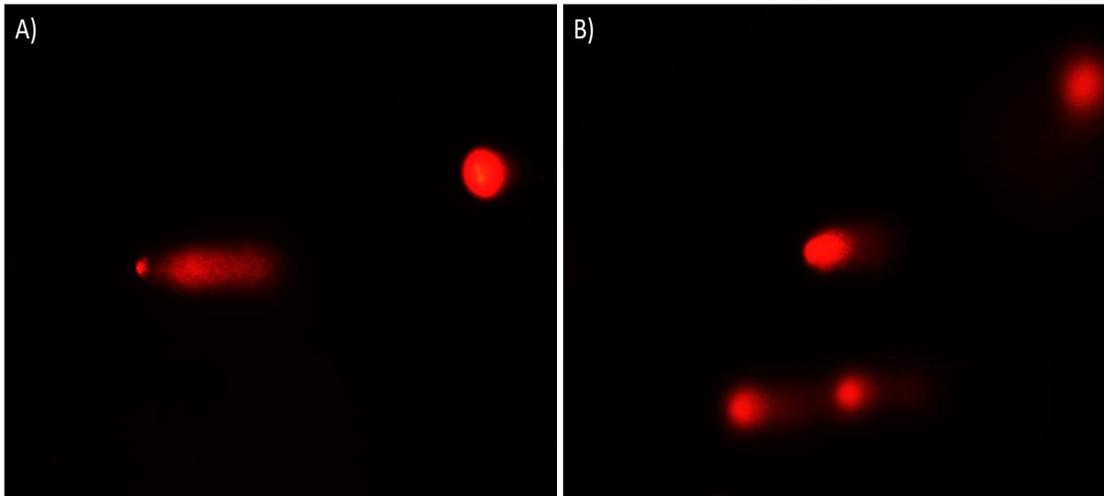
inferiores se obtienen capas gruesas, no uniformes e inicio del proceso de gelificación de la NMA.

Al finalizar el proceso de pretratamiento de los portaobjetos, estos deben ser secados a una temperatura de 60 °C entre 15 – 20 minutos para favorecer la deshidratación y fijación de la capa fina de la agarosa que actuará como soporte de adhesión para las muestras de estudio.

### **3.2.2 Incorporación de cardiomiocitos RL-14 en agarosa**

Como un proceso tradicional de electroforesis, el gel de agarosa proporciona un medio para el movimiento del ADN desde un punto fijo, para esto las células son embebidas en agarosa de bajo punto de fusión (LMA) con concentraciones entre 0.5 y 0.7 % w/v para un sesenta por ciento de los ensayos cometas reportados [40], dichas concentraciones son ideales para permitir el movimiento libre de los núcleos durante el proceso de electroforesis. En este ensayo se utilizó una concentración de agarosa LMA al 0.5 % w/v, la cual se preparó en PBS para favorecer una mayor capacidad de adhesión entre las capas de agarosa del pretratamiento del portaobjeto y la agarosa que contiene la suspensión celular de cardiomiocitos sin o con tratamiento.

Para determinar la densidad celular óptima de los cardiomiocitos se llevó a cabo un análisis de la población de células entre 3 - 3.5 x 10<sup>3</sup> células/mL, donde se encontró que a una densidad de 3 x 10<sup>3</sup> se presentó una distribución de núcleos sin solapamiento del desplazamiento del ADN (ver Fig. 2a). Mientras que, a densidades superiores a 3 x 10<sup>3</sup>, se redujo el libre movimiento del contenido genético durante la electroforesis y aumentó la probabilidad de encontrar cometas superpuestos afectando el correcto procesamiento de los datos (ver Fig. 2b).



**Figura 2.** Cometas de núcleos de cardiomiocitos RL-14 a densidades poblaciones de (A)  $3 \times 10^3$  células/mL y (B)  $3.5 \times 10^3$  células/mL. Tomado a 20X.

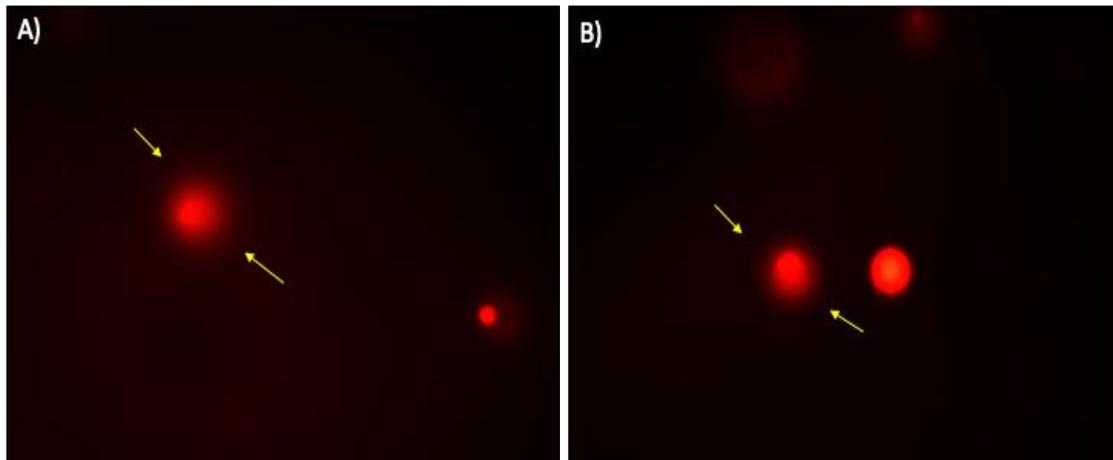
### 3.2.3 Lisis

El proceso de lisis buscó degradar las membranas plasmáticas y nucleares, para esto se utilizó altas concentraciones de sales y detergentes, por lo que se empleó una solución madre de NaCl, EDTA, Tris y Lauryl (ver especificaciones en anexo 1: protocolo detallado), la cual una vez preparada se almacenó a una temperatura a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso. La solución de trabajo de lisis, estuvo compuesta por solución madre, Triton X100 y DMSO (ver especificaciones en anexo 1: protocolo detallado), con el fin de degradar las membranas plasmáticas, esta solución se llevó a valores de pH 10, característica que favoreció la detección de rupturas de cadena doble y la formación de sitios álcali lábiles. Se resalta, que la solución de trabajo de lisis, se preparó 60 minutos antes y se almacenó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, dicho procedimiento se realizó para asegurar la integridad de las gotas que contenían los cardiomiocitos sin o con tratamiento. De otro lado, se destaca que el tiempo de lisis en este estudio fue una variable fija de 17 horas en oscuridad a una temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dichos parámetros favorecieron la degradación completa de las membranas plasmáticas y nucleares, evitaron daños adicionales al ADN y contribuyeron a la conservación física de la integridad de la muestra.

### 3.2.4 Desnaturalización

Para el ensayo Cometa se utilizan soluciones alcalinas con valores de  $\text{pH} \geq 13$ , ya que permiten detectar roturas y sitios lábiles álcali de las cadenas del ADN. De otro lado, se considera que el tiempo de incubación alcalina se encuentra entre 20 y 40 minutos [42], el cual promueve una desnaturalización del ADN sin exhibir cambios externos que no sean generados por el agente genotóxico. Mientras que, un tiempo superior al indicado no solo

promueve la desnaturalización del ADN, sino que genera daños adicionales por la desnaturalización descontrolada de las cadenas del ADN exhibiendo nubes difusas derivadas de la fragmentación del contenido genético (ver Fig. 3a) y contornos poco definidos o partes de ADN dispersos en la muestra (ver Fig. 3b). Por ello, para este estudio se determinó que el tiempo de incubación de la solución alcalina fue de 30 minutos, tiempo que garantizó la desnaturalización del ADN de los núcleos cardiomiocitos RL-14 sin o con tratamiento.



**Figura 3.** Cometas de núcleos de cardiomiocitos RL-14 con tiempo mayores de desnaturalización donde (A) nubes difusas y (B) contornos poco definidos. Tomado a 20X. Las flechas amarillas indican el comportamiento descrito.

### 3.2.5 Electroforesis

La electroforesis es una técnica que permite la separación de biomoléculas según la movilidad de estas mediante la inducción de un campo eléctrico a través de una matriz porosa (agarosa), lo cual favorece el desplazamiento de cargas (positivas y negativas) de la muestra contenida en la agarosa [41]. Dentro de los parámetros que pueden generar cambios en la respuesta de la cinética del cometa, se encuentra la variación en el voltaje de corrida. En el estudio que realizó Azqueta y colaboradores [42], se encontró que durante el corrimiento del ensayo Cometa voltajes inferiores a 10 V, no presentaron la formación de cometas, mientras que, a voltajes mayores a 30 V, se observó que no solo los tratamientos sino también los controles negativos exhibieron cometas con colas pronunciadas, pero entre voltajes mayores a 20 V y menores a 30 V, se evidenció aumento en la intensidad de las imágenes de los cometas, lo cual favoreció la medición y procesamiento de la información. Por otro lado, el tiempo de corrida fue un factor influyente durante el proceso de generación de cometas efectivos, en este estudio se determinó que un tiempo entre 20 y 40 minutos no generó variaciones en el porcentaje de ADN en cola [42].

Basado en lo anterior, el voltaje empleado en este estudio fue de 25 V, el cual permitió obtener cometas con migración en el ADN sin afectar los controles negativos, así mismo,

se encontró que, a un tiempo de 30 minutos de electroforesis, se observó la formación de cometas sin afectar la cinética del ensayo. Dichos parámetros se encuentran dentro del rango de obtención de cometas sin alteraciones externas propias de las fases del ensayo Cometa, los cuales en cambio exhiben el comportamiento generado por el agente genotóxico de estudio.

Finalmente, el volumen de la solución de corrida en la cámara de electroforesis tiene un impacto en la corriente que pasa a través de la agarosa, por lo que es importante mantener un nivel constante entre cada experimento, garantizando que la corriente se desplace entre los poros de la agarosa que contienen la muestra de estudio y no sobre el perfil de la superficie de la gota, comportamiento que no ocasiona movimientos de cargas positivas y negativas a través de la cadena del ADN lo que inhibe la formación de cometas.

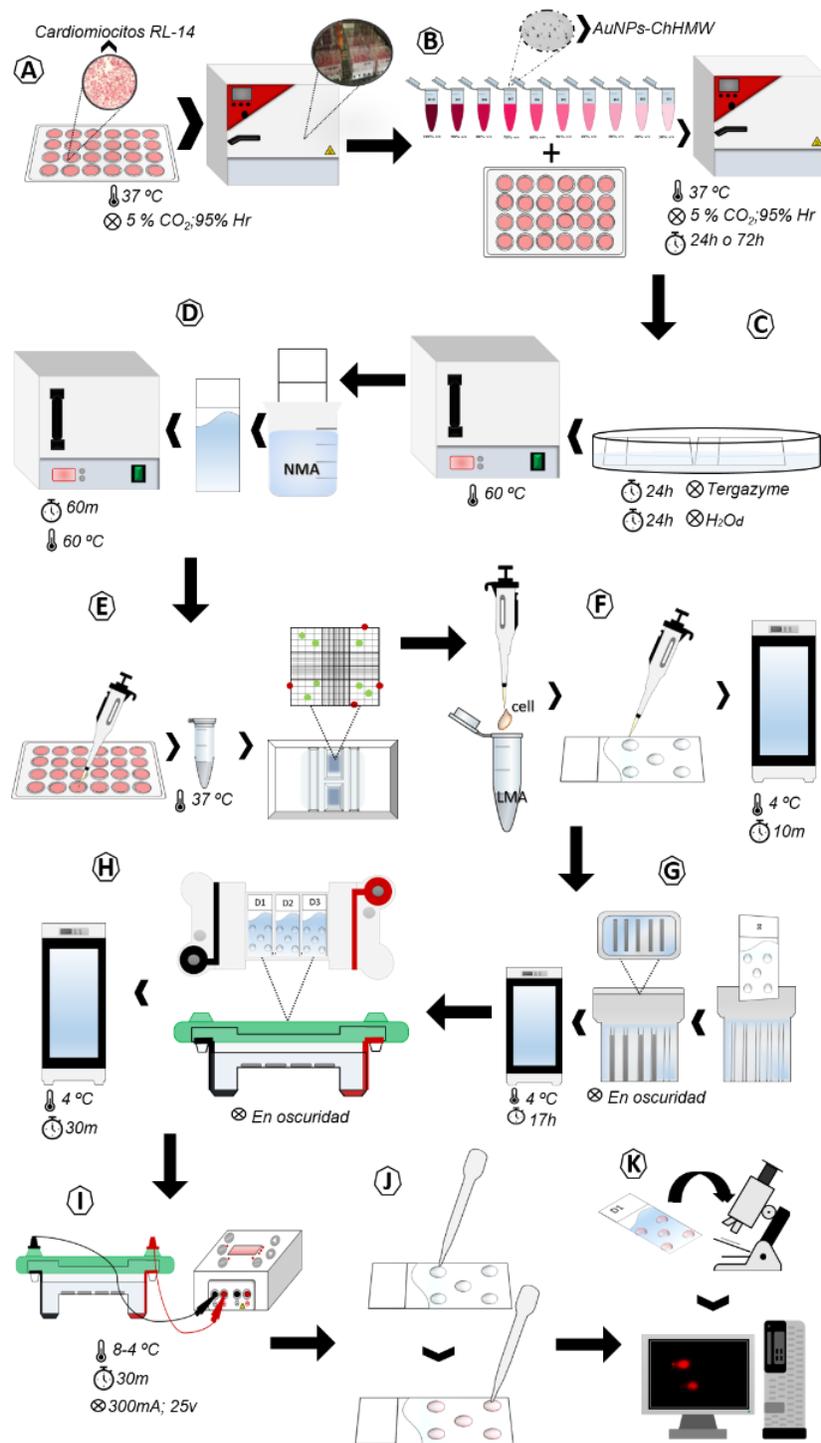
### **3.2.6 Neutralización, fijado y tinción.**

Esta etapa se lleva a cabo para neutralizar los álcalis presentes en los geles de agarosa, con el fin de obtener cometas con cabezas y/o colas definidas, por lo que generalmente se realizan tres lavados con buffer Tris con valores de pH 7.5 y una duración entre lavados de 5 minutos [21]. Dicha fase posibilita la obtención de cometas definidos y disminuye la presencia de halos alrededor de la muestra, si no se controla este último efecto se dificultará en la fase de procesamiento la identificación del porcentaje de ADN en cabeza y cola.

El fijado, es un paso necesario para permitir la deshidratación de la muestra garantizando la impregnación del colorante (bromuro de etidio) en ella, para dicho proceso de empleo como agente fijador metanol al 10 % v/v y Tritón al 1X, para mejorar el ruido de fondo al momento de excitar la muestra a la longitud de onda del fluoróforo. Por último, para la fase de tinción, se utiliza un colorante fluorescente específico para el ADN, es decir sus fluoróforos se adhieren a las cadenas de ADN de la muestra [43], dentro de estos se encuentra el bromuro de etidio, el cual es un agente intercalante que se inserta entre los pares de bases nitrogenadas adyacentes en la doble cadena [5].

### **3.2.7 Protocolo final**

El protocolo final que se obtuvo como resultado del proceso de estandarización permitió establecer lo múltiples parámetros para llevar a cabo el ensayo Cometa para cardiomiocitos RL-14 ante exposición directa con nanoestructuras esféricas de oro. En la Figura 4, se presenta el protocolo de forma detallada de cada una de las fases y condiciones que se llevaron a cabo para la obtención de cometas que exhiban el efecto de AuNPs-ChHMW (ver Anexo 1).



**Figura 4.** Protocolo de ensayo Cometa para cardiomiocitos RL-14. (A) cultivos control de cardiomiocitos RL-14. (B) interacción de las AuNPs-ChHMW con los cardiomiocitos RL-14. (C) lavado de los portaobjetos. (D) Pre-tratado de los portaobjetos con agarosa NMA. (E) vialidad y densidad celular. (F) Incorporación de las células en agarosa. (G) Lisis. (H) Desnaturalización. (I) Electroforesis. (J) Neutralización, fijado y tinción. (K) lectura y procesamiento de imágenes obtenidas.

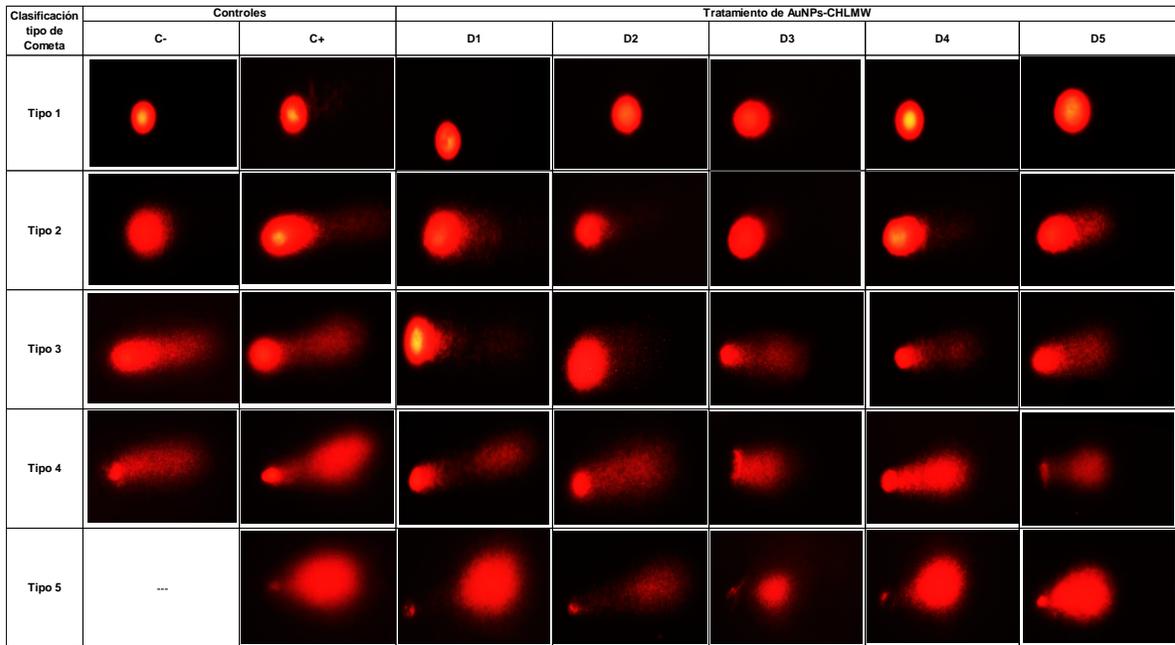
### **3.3 Alteraciones morfológicas de los núcleos cardiomiocitos RL-14 expuestos a AuNPs-ChHMW**

Para establecer la alteración morfológica en los núcleos de los cardiomiocitos RL-14 expuestos a nanopartículas de oro, se realizó una clasificación de la tipología de los cometas según el porcentaje de ADN en cola, lo cual está relacionado con daños en el material genético ocasionado por la interacción directa con las AuNPs-ChHMW a diferentes periodos de incubación. Dicha clasificación es similar a la reportada por Collins [39] y Augusto [44] donde a partir de la fragmentación del ADN se obtuvo clases de cometas en función al daño genotóxico del agente externo.

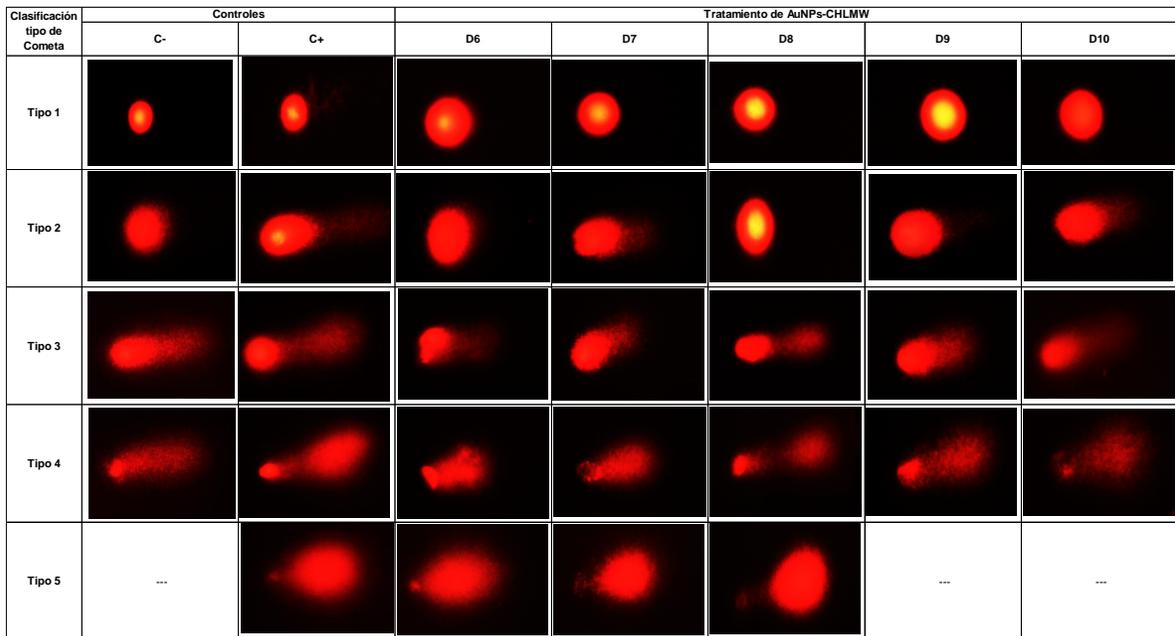
En las Figuras 5, 6, 7 y 8 se muestran los diferentes tipos de cometas obtenidos para cada tratamiento a periodos de incubación de 24 y 72 horas, donde se observa diferentes morfologías según el tipo de cometa.

A un periodo de incubación de 24 horas los cardiomiocitos RL-14 sin y con tratamiento exhibieron diferentes tipos de cometas, encontrándose cometas tipo 1, los cuales presentaron núcleos íntegros con tendencia a la esfericidad; cometas tipo 2, donde se observó una cabeza definida e inicio de formación de colas de ADN; cometas tipo 3 con presencia de cabezas elípticas y aumento en la longitud de la cola con respecto a la tipología anterior; cometas tipo 4 donde se denotó una disminución en el tamaño de la cabeza exhibiendo alteraciones morfológicas con pérdida de la información genética lo que ocasionó un alargamiento de las colas superior al 60 % y cometas tipo 5 que presentaron cabezas pequeñas y difusas con colas pronunciadas, lo cual está relacionado con fragmentación de ADN superior al 95 %. Se resalta que a este periodo de incubación el control negativo y los tratamientos D9 y D10 no presentaron cometas en tipología 5.

Por otro lado, se evidenció que la morfología de los cometas obtenidos para un periodo de incubación de 72 horas presentó similitudes con el periodo de 24 horas, en donde para los cometas tipo 1 se observaron núcleos íntegros y a medida que aumentó el daño en el ADN se denotó cabezas difusas y de menor tamaño y colas alargadas con incremento del material genético. Además, se destaca que en los cometas tipo 4, a diferencia de los exhibidos en el periodo de 24 horas, estos presentaron colas con mayor longitud y reducción en el tamaño de las cabezas a diferencia de los cometas tipo 3. Es así que, para ambos rangos de tiempo de incubación de los tratamientos se obtuvo morfologías similares según el tipo de cometa como las reportadas en las investigaciones de Augusto [44] y Collins [43].



**Figura 5.** Tipos de morfologías presentadas durante el ensayo Cometa de cardiomiocitos RL-14 expuestos a. a tratamientos de D1 a D5 de AuNPs-ChHMW durante 24 horas y sus respectivos controles negativo y positivo ( $H_2O_2$ ). Tomado a 20X



**Figura 6.** Tipos de morfologías presentadas durante el ensayo Cometa de cardiomiocitos RL-14 expuestos a. a tratamientos de D6 a D10 de AuNPs-ChHMW durante 24 horas y sus respectivos controles negativo y positivo ( $H_2O_2$ ). Tomado a 20X.

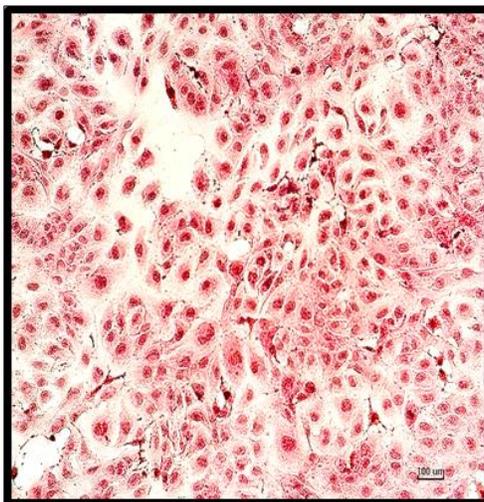
Clasificación tipo de Cometa	Controles		Tratamiento de AuNPs-CHLMW				
	C-	C+	D1	D2	D3	D4	D5
Tipo 1							
Tipo 2							
Tipo 3							---
Tipo 4					---		
Tipo 5	---				---	---	

**Figura 7.** Tipos de morfologías presentadas durante el ensayo Cometa de cardiomiocitos RL-14 expuestos a. a tratamientos de D1 a D5 de AuNPs-ChHMW durante 72 horas y sus respectivos controles negativo y positivo ( $H_2O_2$ ). Tomado a 20X.

Clasificación tipo de Cometa	Controles		Tratamiento de AuNPs-CHLMW				
	C-	C+	D6	D7	D8	D9	D10
Tipo 1							
Tipo 2							
Tipo 3							
Tipo 4							
Tipo 5	---		---	---			---

**Figura 8.** Tipos de morfologías presentadas durante el ensayo Cometa de cardiomiocitos RL-14 expuestos a. a tratamientos de D6 a D10 de AuNPs-ChHMW durante 72 horas y sus respectivos controles negativo y positivo ( $H_2O_2$ ). Tomado a 20X.

Es de destacar que los cardiomiocitos son células mononucleadas derivadas de tejido muscular esquelético y poseen núcleos que se encuentran en posición central como se observa en la Figura 9. Según el estadio fisiológico o fisiopatológico el tamaño de los cardiomiocitos pueden variar exhibiendo aumento o disminución de la longitud entre 80 a 100  $\mu\text{m}$  y un diámetro promedio de 15  $\mu\text{m}$  [45].



**Figura 9.** Morfología de los cardiomiocitos RL-14

A partir de la clasificación por tipos de cometas, se estableció el daño morfológico de los núcleos de cardiomiocitos RL-14 expuestos a las AuNPs-ChHMW, lo cual permitió identificar el tamaño de las cabezas y la longitud de las colas de cada uno de los cometas obtenidos.

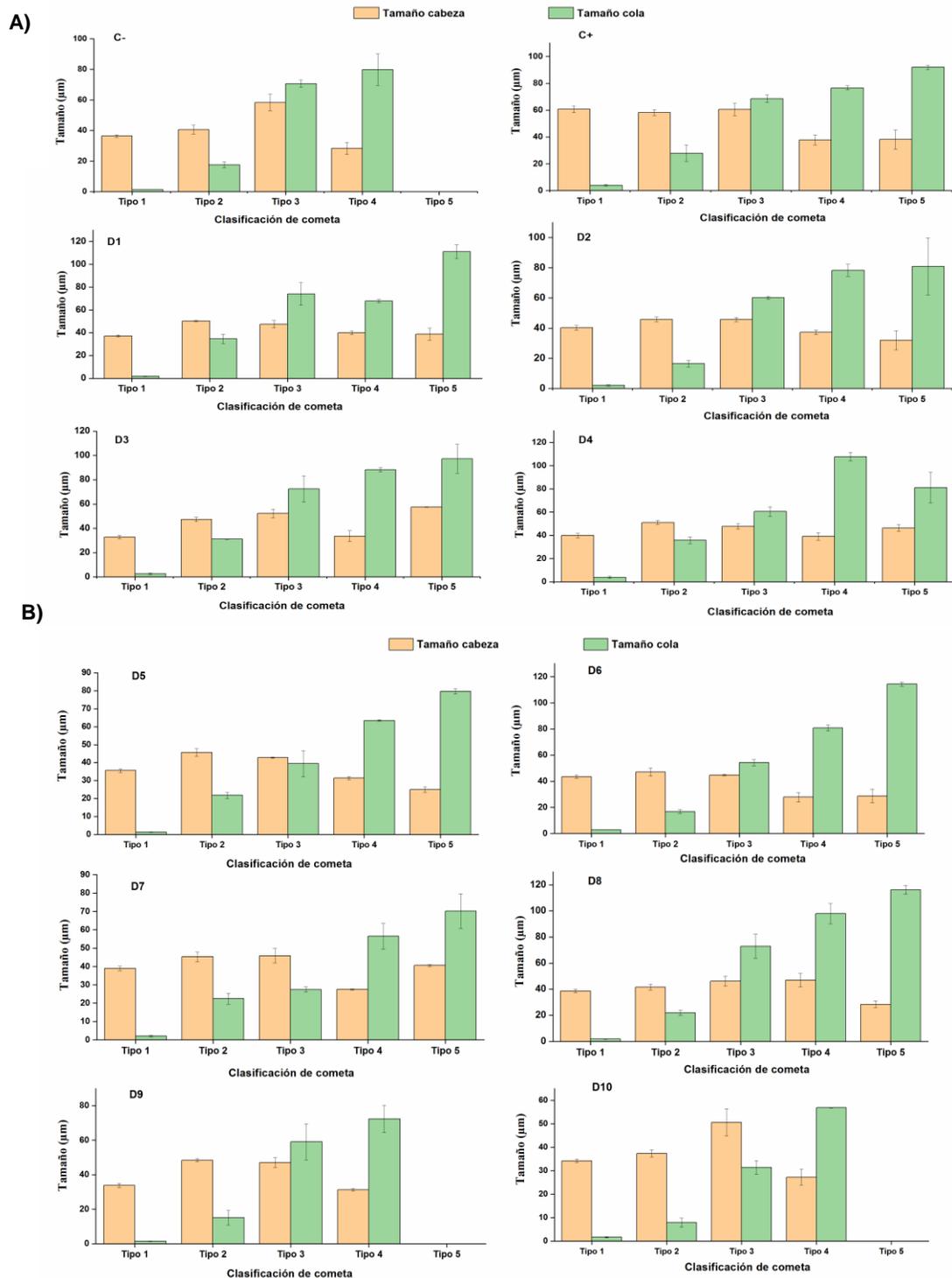
Para cada uno de los tratamientos se obtuvieron cometas con diferentes morfologías, en donde se presenta una tendencia que, a medida que el daño aumenta el tamaño de la cabeza disminuye y por ende el tamaño de la cola aumenta, siendo estadísticamente significativo la longitud de la cola de los cometas tipo 5 con respecto a los cometas tipo 1, indicando que los cometas tipo 5 exhiben colas alargadas que representan la alta fragmentación del ADN consecuencia de las roturas de cadenas.

Como se puede observar en la Figura 10a el control negativo careció de cometas tipo 5, lo cual indica que el daño en estas células fue insuficiente para exhibir este tipo de cometas, además la morfología del núcleo promedio para el tipo 1 fue de 37  $\mu\text{m}$ , tamaño similar al reportado por Orozco y colaboradores [46] de núcleos de cardiomiocitos RL-14 con ADN compactado sin interacción con agentes externos. Mientras que, en el control positivo, se obtuvo todos los niveles de daño y el promedio de tamaño del núcleo fue de 60  $\mu\text{m}$ , comportamiento relacionado con alteraciones genotóxicas derivadas de la interacción con el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo cual podría generar cambios en el tamaño en respuesta a especies reactivas del oxígeno ocasionado por estrés celular inducido por el agente

genotóxico que ocasionaría una sobreactivación de la función nuclear de los cardiomiocitos RL-14 [47].

En la Figura 10a se observa que para los tratamientos D1 a D4 a un periodo de incubación de 24 horas, el promedio de tamaño de la cabeza varió entre 35 y 40  $\mu\text{m}$  para los cometas tipo 1, lo cual es similar al tamaño promedio del control negativo el cual fue de 37  $\mu\text{m}$ . Además, se observó que la longitud de las colas de los diferentes tratamientos aumentó según el tipo de cometa, siendo el tipo 5 los cometas que presentaron mayor longitud, comportamiento que está relacionado con la interacción directa de AuNPs-ChHMW con los cardiomiocitos RL-14, el cual ocasiona alteraciones en la morfología del núcleo asociándose al tipo de daño y fragmentación del ADN [48]. Por otro lado, en el tratamiento D4 se encontró que los cometas tipo 4 presentaron longitudes mayores en la cola comparado con los cometas tipo 5, esto se debe a que en este tratamiento se identificaron cometas con un mayor porcentaje de ADN en la cola, sin embargo, en los cometas tipo 5 se presentaron cabezas de menor tamaño y colas que formaron una circunferencia de fragmentación del ADN menor a la longitud de las colas exhibidas en los cometas tipo 4 pero con mayor diámetro (ver Fig. 5).

Como se muestra en la Figura 10b, los tratamientos D5 a D10 evidenciaron una similitud con los tratamientos de D1 a D4, en donde los cometas tipo 1 presentaron tamaños de cabeza similares al control negativo, encontrando tamaños promedio entre 35 y 43  $\mu\text{m}$  y aumentos en la longitud de la cola a medida que el daño en el ADN se incrementa. Se resalta que los tratamientos D9 y D10 presentaron ausencia de cometas tipo 5, indicando un menor daño en el ADN para estos tratamientos, similares al comportamiento exhibido en el control negativo.



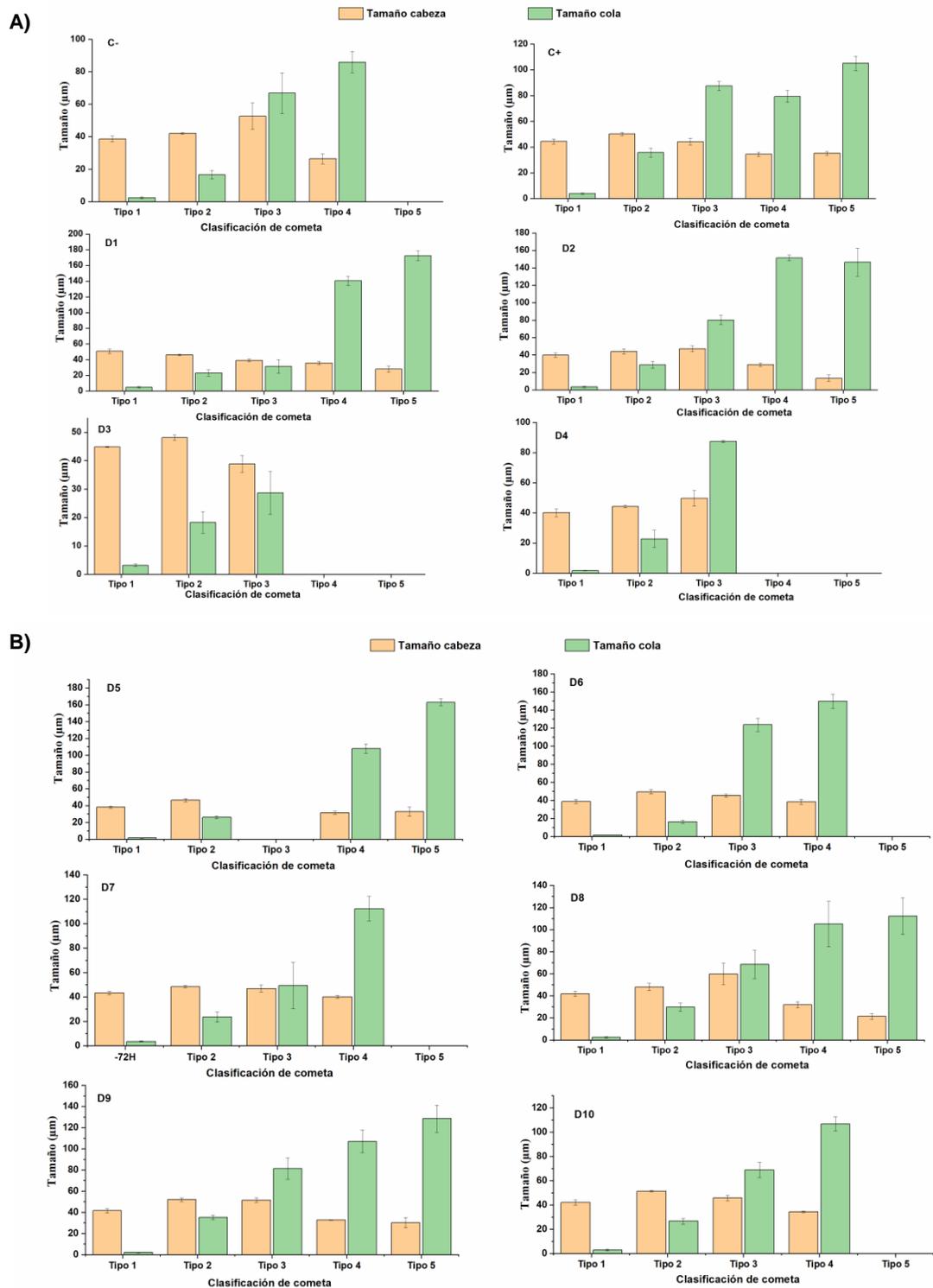
**Figura 10.** Tamaño de cabeza y cola ( $\mu\text{m}$ ) en comparación con el tipo de cometa, a un periodo de 24h donde se tiene en (A) control positivo, negativo y tratamientos D1 a D4 y (B) tratamientos D5 a D10. Los valores se presentan como  $\pm$  el error estándar con un  $n=3$ .

En la Figura 11a, para el periodo de incubación de 72 horas los controles positivos y negativos presentaron un comportamiento similar al evidenciado en el periodo de 24 horas. Además, para el tratamiento D1 el tamaño promedio del núcleo para los cometas tipo 1 fue de 51  $\mu\text{m}$ , lo que indica que a concentraciones bajas de las AuNPs-ChHMW, las cuales se encuentran en una solución acuosa, puede presentarse aumentos en el tamaño del núcleo por el exceso de agua en el espacio extracelular a lo largo de un periodo mayor de incubación, pero en los demás tratamientos el tamaño de los núcleos se encuentra cercano al control negativo, es decir, los tratamientos de D2 a D4 mostraron tamaños promedios de 40 y 44  $\mu\text{m}$  y el control negativo un tamaño promedio de 38  $\mu\text{m}$ . Se destaca que, en los tratamientos D3 y D4 no se exhiben cometas tipo 4 y 5, lo que podría estar relacionado con un menor daño en el ADN.

En cuanto a la Figura 11b se denotó que todos los tratamientos presentaron cometas tipo 1 con morfologías similares al control negativo, así mismo, los tratamientos de D5 a D10 mostraron tamaños de las cabezas de los núcleos con promedios entre 38 y 43  $\mu\text{m}$  mientras que en los demás tipos de cometas se encontró que las longitudes de las colas mostraron un comportamiento directamente proporcional donde la longitud de la cola aumenta a medida que incrementa el daño en el ADN.

Dentro del comportamiento presentado por los núcleos de las cardiomiocitos, se resalta que el tratamiento D5 mostró cometas tipo 1, 2, 4, 5 y ausencia de tipo 3, mientras que el tratamiento D7 en el tipo 3 evidenció tamaños en cola y cabeza con diferencias mínimas entre ellas, es decir para este tipo de tratamientos las cabezas fueron elípticas y achatadas con colas de longitud similar a las cabezas. Por otro parte, los tratamientos D6, D7 y D10, carecieron de cometas tipo 5, lo cual indica que el daño en el ADN fue bajo.

Según lo reportado por Wang [49] se indica que el tratamiento con AuNPs inducen aumento significativo en las roturas de la cadena y daño oxidativo del ADN dependiente de la duración de la exposición, el tamaño e identidad biológica de las nanopartículas y el tipo de línea celular. Resultados que son consistentes con los obtenidos en esta investigación, los cuales indicaron que las AuNPs-ChHMW generan un menor daño comparado con el agente genotóxico ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) empleado como control positivo.



**Figura 11.** Tamaño de cabeza y cola ( $\mu\text{m}$ ) en comparación con el tipo de cometa, a un periodo de 72 h donde se tiene en (A) control positivo, negativo y tratamientos D1 a D4 y (B) tratamientos D5 a D10. Los valores se presentan como  $\pm$  el error estándar con un  $n=3$ .

### 3.4 Evaluación de la genotoxicidad de nanopartículas de oro en núcleos de cardiomiocitos RL-14

Para evaluar la genotoxicidad de nanopartículas de oro en interacción con cardiomiocitos RL-14, se evaluó el porcentaje de ADN en cola y cabeza, el momento Olive y momento de cola, a periodos de incubación de 24 y 72 horas expuestos a 10 concentraciones de AuNPs-ChHMW.

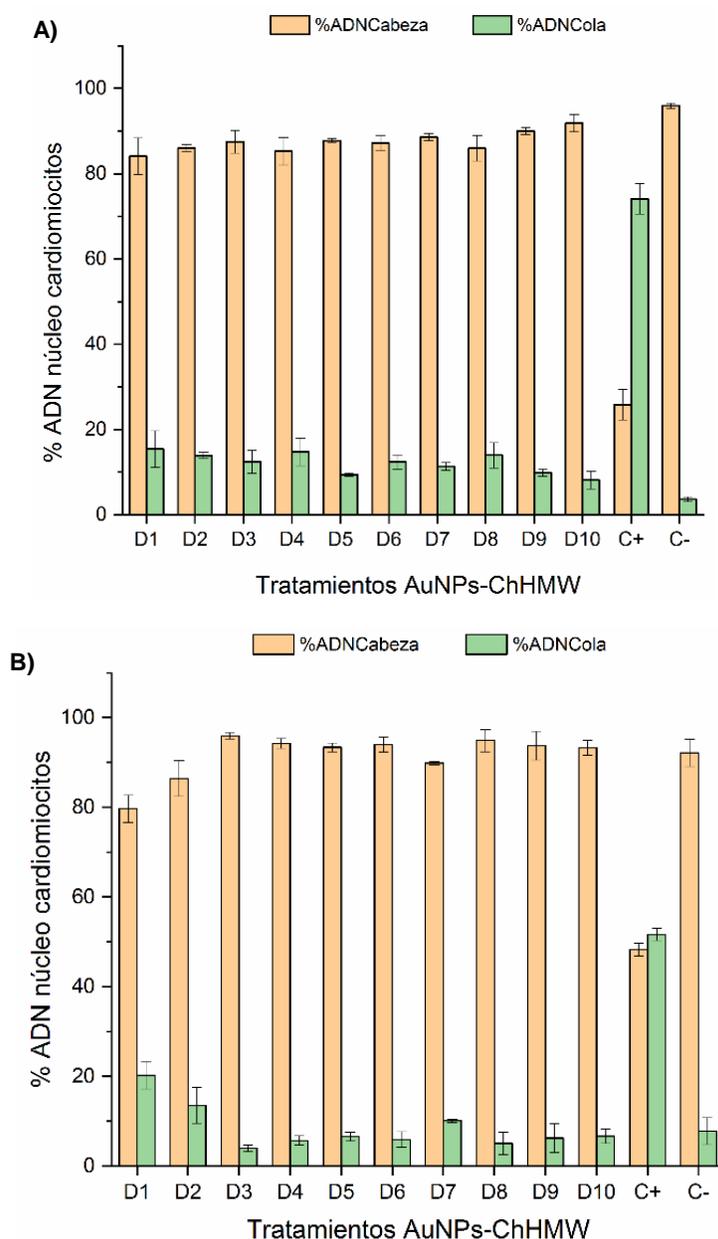
Como se observa en la Figura 12a existe una diferencia significativa entre el control positivo con los diferentes tratamientos en el porcentaje de ADN en cola, donde este exhibe un 74 % mientras que, en los tratamientos fue entre 8 y 16 %, lo cual indica que las nanopartículas de oro ocasionan bajas migraciones en el ADN de los cardiomiocitos. Por otro lado, todos los tratamientos a un periodo de incubación de 24 horas presentaron un porcentaje de ADN en cabeza entre el 84 y 92 %, comparado con el control negativo que exhibe un porcentaje del 96 %, indicando que las diferencias entre los tratamientos con el control están entre 4 y 12 %, lo cual relaciona que las NPs generaron migración del ADN correspondiendo con roturas y sitios lábiles álcali generados a partir de la interacción con las nanoestructuras.

Para un periodo de incubación de 72 horas (ver Fig. 12b), el control positivo exhibió un porcentaje de ADN en cola del 54 %, lo cual podría estar relacionado con los procesos de reparación intrínsecos de las células luego de interactuar largos periodos con agentes tóxicos como lo es el peróxido de hidrógeno [50]. Mientras que, los tratamientos de AuNPs-ChHMW presentaron un porcentaje entre el 5 y 20 %, comportamiento que indica que las nanopartículas de oro generan un daño gradual en el núcleo de los cardiomiocitos a medida que aumenta el periodo de incubación, lo cual podría estar relacionado con el tipo de agente reductor empleado en la síntesis, donde este le confiere identidad biológica y por ende disminución de generación de daño a nivel nuclear [51].

Se destaca que a concentraciones más bajas de las AuNPs-ChHMW es donde se obtiene los mayores porcentajes de ADN en cola, esto puede deberse al disolvente usado (agua), el cual estaba a una mayor relación volumétrica en comparación con el porcentaje de nanopartículas, y esto podría causar procesos hipotónicos en las células ocasionados por la alteración de la osmolaridad del espacio intracelular por el exceso del disolvente en interacción con los cardiomiocitos, afectando el proceso de funcionamiento normal, lo que podría ocasionar roturas de ADN a lo largo de la cadena [52].

Las AuNPs-ChHMW obtenidas mediante procesos de síntesis verde en interacción con los cardiomiocitos presentaron un comportamiento favorable, ya que muestran porcentajes de ADN en cabeza mayor que en la cola, a diferencia de las AuNPs cubiertas con citrato de sodio o dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) quienes indujeron daño en el ADN, como indicativo de genotoxicidad [31], comportamiento que podría deberse a la diferencia en el proceso de síntesis en comparación con el empleado en esta investigación (reducción y estabilización de las nanoestructuras mediante quitosano de alto peso molecular). Así mismo, Martínez y colaboradores [31] indicaron que la carga o el tamaño de la superficie

de la nanopartícula son un factor determinante que afectan los procesos celulares, lo cual arroja como hipótesis que la estabilidad dada por el agente reductor y estabilizante, quitosano de alto peso molecular, a las AuNPs-ChHMW, proporcionaría una identidad biológica que obraría como una interfaz de comunicación entre la dualidad partícula-célula, lo que indicaría una interacción indirecta entre las nanopartículas y los cardiomiocitos.

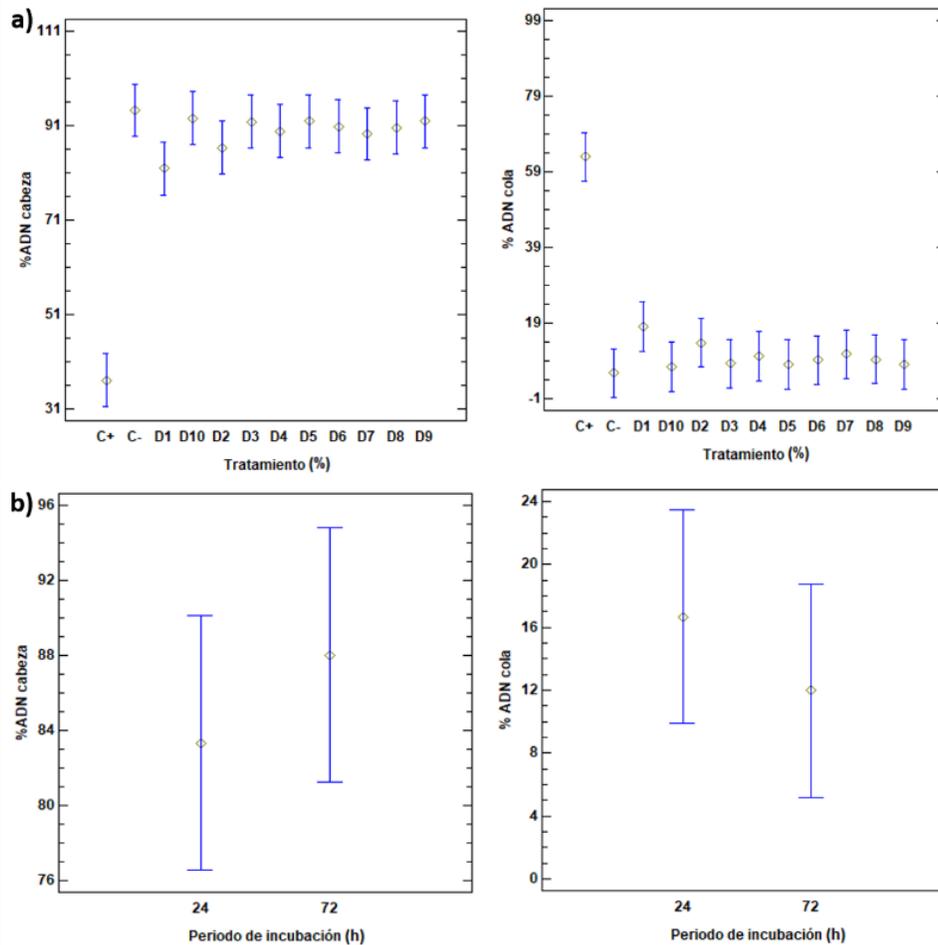


**Figura 12.** Porcentaje de ADN en cabeza y cola de núcleos de cardiomiocitos RL-145 expuestos a en los diferentes tratamientos de AuNPs-ChHMW y sus respectivos controles, para un periodo de (A) 24 h y (B) 72 h. Los valores se presentan como  $\pm$  el error estándar con un  $n=3$

En la Figura 13a, se puede observar que el tratamiento D1 presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo (células sin tratamiento), es decir, generó un menor porcentaje de ADN en cabeza y un mayor porcentaje de ADN en cola, lo cual podría relacionarse con un mayor contenido de solvente ( $H_2O$ ) que podría generar un proceso hipotónico a nivel celular, lo cual conduciría a alteraciones en los núcleos de los cardiomiocitos. Así mismo, se encontró que los tratamientos de AuNPs-ChHMW comparados con el control positivo ( $H_2O_2$  al  $50 \mu M$ ) exhibieron diferencia estadísticamente significativa, relacionándose con que las nanopartículas generaron un menor daño en el núcleo de los cardiomiocitos. Pero al comparar el comportamiento de los tratamientos entre sí, se denotó una variación estadísticamente no significativa.

Basado en lo anterior, el tamaño de las AuNPs podrían influir en la interacción con las células, esto se puede denotar en el trabajo de Xia y colaboradores [34], donde el daño en el ADN es dependiente del tamaño de nanopartículas de oro después de 24 h de exposición, las cuales a tamaños menores a 5 nm indujeron un aumento significativo en el daño del ADN de manera dependiente de la concentración, mientras que, las AuNPs con tamaños entre 20 y 50 nm no exhibieron este comportamiento [34]. Además, en esta investigación reportaron que las AuNPs de 5 nm tenían una internalización celular mayor que las AuNPs de 20 y 50 nm, lo que podría estar asociado con los efectos genotóxicos generados por las AuNPs de 5 nm.

En este contexto, las AuNPs-ChHMW con tamaños promedios de 17 nm, podrían presentar una baja internalización al momento de interactuar con los cardiomiocitos lo que demostraría los bajos porcentajes de ADN en cola, indicando bajas roturas en la cadena de ADN. Los resultados de este estudio fueron congruentes con los reportados por Schulz y su grupo, los cuales encontraron que diferencias en el tamaño de AuNPs (2 nm) evaluadas en células de pulmón, dan como resultado aumentos en la respuesta fagocitótica y mayor daño en el ADN comparados con nanopartículas mayores de 2 nm [35].



**Figura 13.** Gráficos de medias donde (A) porcentaje de ADN en cabeza y cola de núcleos de cardiomiocitos en interacción con las AuNPs-ChHMW y (B) porcentaje de ADN en cabeza y cola a los periodos de incubación de 24 y 72 h.

Por otro lado, en la Figura 13b se evidencia que, al aumentar el periodo de incubación este no influye en la respuesta genotóxica de los cardiomiocitos ante interacción con las AuNPs-ChHMW. Comportamiento que está relacionado con la concentración volumétrica de los tratamientos evaluados. Aunque, se observó un aumento del porcentaje de ADN en cabeza a las 72 horas, lo cual podría estar asociado con que las nanopartículas no generaron un efecto tóxico y permitieron que los cardiomiocitos continuaran su proceso de división celular.

Gracias a que las AuNPs-ChHMW presentaron tamaños superiores a 10 nm, estas generaron una baja respuesta adversa al interactuar de forma directa con los cardiomiocitos RL-14. Sin embargo, se evidenciaron respuestas genotóxicas derivadas de interacciones indirectas o secundarias entre la nanopartícula y la célula, lo que ocasiona producción de las ROS, responsables de afectar las biomoléculas como el ADN, los lípidos y las proteínas

[34]. Por lo cual, el daño indirecto causado por las AuNPs-ChHMW condujo a bajas roturas de la cadena del ADN expresadas en migración de la fragmentación del contenido genético.

Para corroborar los resultados anteriores, se evaluó el momento de cola (MC), el cual está relacionado con la longitud de migración del ADN fuera del núcleo conformado por la cola del cometa, y el momento Olive (MO), asociado con el tamaño de la cola del cometa más la fracción de ADN total desde el centro de la cabeza hasta el final de la cola [40]. Tanto MC como MO presentan relación entre el ADN en cabeza y en cola del cometa, donde se tiene un comportamiento inversamente proporcional en que a mayores valores de ADN en cola, el valor de estas medidas aumenta y pasara lo contrario si el ADN en cabeza es incrementa.

Dicho comportamiento es mostrado en las tablas 3 y 4, donde el control positivo, fue quien exhibió mayor porcentaje de ADN en cola, presentando mayores valores de momento Olive y cola a ambos periodos de incubación. Mientras que, el control negativo evidenció menores valores de MC y MO. Por otro lado, los tratamientos de AuNPs-ChHMW en ambos periodos evaluados, presentaron valores de MC y MO cercanos a los mostrados en el control negativo. Lo cual comprueba que las nanopartículas generan bajo daño genotóxico.

**Tabla 3.** Momento Olive y momento de cola para cada uno de los tratamientos de AuNPs-ChHMW a 24h de evaluación

Tratamiento AuNPs-ChHMW	Momento de Cola (u.a)	Momento Olive (u.a)
C-	10.35 ± 0.4	11.83 ± 4.17
C+	253.15 ± 4.7	150.58 ± 5.6
D1	28.55 ± 3.6	13.36 ± 1.0
D2	43.82 ± 4.6	28.19 ± 2.3
D3	36.12 ± 4.0	23.54 ± 1.6
D4	46.98 ± 5.6	28.14 ± 5.0
D5	27.11 ± 1.0	17.27 ± 0.2
D6	39.43 ± 8.9	27.64 ± 4.8
D7	30.14 ± 5.4	19.88 ± 3.5
D8	36.32 ± 1.5	24.86 ± 0.4
D9	27.84 ± 0.0	17.17 ± 0.9
D10	17.70 ± 1.3	11.80 ± 1.3

**Tabla 4.** Momento Olive y momento de cola para cada uno de los tratamientos de AuNPs-ChHMW a 72h de evaluación

<b>Tratamiento AuNPs-ChHMW</b>	<b>Momento de Cola (u.a)</b>	<b>Momento Olive (u.a)</b>
<b>C-</b>	7.83 ± 3.0	13.42 ± 3.9
<b>C+</b>	204.16 ± 8.1	117.40 ± 1.6
<b>D1</b>	40.22 ± 6.1	22.58 ± 4.3
<b>D2</b>	40.92 ± 4.2	23.44 ± 2.7
<b>D3</b>	13.86 ± 6.6	3.70 ± 0.3
<b>D4</b>	15.52 ± 6.8	6.99 ± 1.6
<b>D5</b>	28.88 ± 4.3	14.73 ± 3.2
<b>D6</b>	43.92 ± 7.3	12.91 ± 4.0
<b>D7</b>	19.18 ± 2.8	19.30 ± 3.7
<b>D8</b>	24.20 ± 8.1	30.77 ± 4.3
<b>D9</b>	32.02 ± 6.8	23.75 ± 5.4
<b>D10</b>	30.63 ± 4.1	19.62 ± 2.8

## 4. CONCLUSIONES

Se logró estandarizar un protocolo de ensayo Cometa alcalino para cardiomiocitos ventriculares humanos RL-14 en interacción con nanopartículas metálicas para determinar el efecto genotóxico del nanomaterial, donde se evaluaron diferentes parámetros como solvente de la agarosa, tipo de pretratamiento del portaobjetos y tiempo de electroforesis.

A partir de los resultados, se obtuvo una clasificación satisfactoria de los diferentes tipos de daños generados durante la realización del ensayo Cometa, donde a medida que se generó un aumento en el daño del ADN se evidenciaron colas alargadas y cabezas pequeñas, dichas características permitieron establecer el tipo de cometa y el daño morfológico en los núcleos de cardiomiocitos RL-14 expuestos a nanopartículas de oro, donde a concentraciones de 10%v/v se presentó un aumento en el tamaño de los núcleos comparados con su respectivo control negativo, mientras que, a concentraciones superiores a 50% v/v de AuNPs-ChHMW el tamaño en el núcleo fue similar al control negativo.

El resultado de las diferentes interacciones directas de las nanopartículas de oro con los núcleos de cardiomiocitos RL-14 permitió evaluar la genotoxicidad de nanopartículas de oro, donde se encontró que a concentraciones entre 10% y 30% v/v de nanopartículas se presentó un mayor daño de ADN comparado con el control negativo a diferencia de las concentraciones entre 40% a 100% v/vs, quienes presentaron menores porcentajes de ADN en cola. Aunque se presentó daño del ADN en los diferentes tratamientos, se puede inferir que el tipo de nanopartículas obtenidas por síntesis verde permite la estabilidad del sistema biológico, lo que proporciona interacciones indirectas entre las NPs y las células, lo cual genera la ausencia de interacciones primarias con el ADN y ocasiona porcentajes inferiores al 20% de ADN en cola lo que indica bajo nivel de roturas y sitios lábiles álcali.

## **5. APORTE DE LA INVESTIGACIÓN**

Por medio de este trabajo de grado se logró establecer un protocolo detallado para implementar un ensayo Cometa que permita la evaluación del efecto genotóxico de nanopartículas metálicas en interacción con cardiomiocitos ventriculares fetales humanos RL-14.

Así mismo, esta estandarización permitió establecer parámetros de valoración funcional de nanoestructuras para posibles aplicaciones en la ingeniería de tejidos cardiovasculares, a través del mejoramiento del ensayo Cometa y cada una de sus fases como lo son: el pre-tratamiento de portaobjetos, la lisis, la desnaturalización, la electroforesis, neutralización, fijación y tinción. Dichas características garantizan la reproducibilidad y repetitividad de la interacción nanomaterial-célula.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] World Health Organization, "WHO | Cardiovascular diseases (CVDs) factsheet," <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>, 2013. .
- [2] W. Jiang, D. Rutherford, T. Vuong, and H. Liu, "Nanomaterials for treating cardiovascular diseases: A review," *Bioact. Mater.*, vol. 2, no. 4, pp. 185–198, 2017.
- [3] L. Goswami *et al.*, "Engineered nano particles: Nature, behavior, and effect on the environment," *J. Environ. Manage.*, vol. 196, pp. 297–315, 2017.
- [4] A. Haase and A. Luch, "Genotoxicity of nanomaterials in vitro: treasure or trash?," *Arch. Toxicol.*, vol. 90, no. 11, pp. 2827–2830, 2016.
- [5] A. Rodríguez-Rey, E. Noris-García, and M. T. Fundora Torres, "Principios y relevancia del ensayo cometa," *Rev. Cuba. Investig. Biomed.*, vol. 35, no. 2, pp. 184–194, 2016.
- [6] L. S. Sun, J. C. Schwarzenberger, and R. Dinavahi, *Fisiología cardíaca*. Elsevier Espa8#241;a, S.L.U., 2019.
- [7] P. J. Kennelly and R. K. Murray, "Músculo y citoesqueleto," in *Harper Bioquímica ilustrada, 31e*, V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, and P. A. Weil, Eds. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2019.
- [8] A. Mattiazzi and E. L. A. Éxcito-contráctil, "Fisiología Del Miocito Cardíaco Síntesis Inicial," pp. 176–182.
- [9] M. R. Bruce Alberts, Dennis Bray, Karel Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, "Introducción A La Biología Celular," p. 900, 2011.
- [10] V. R. Lara and T. I. Fortoul, "La célula: su estructura y función," in *Histología y biología celular, 3e*, D. T. I. Fortoul van der Goes, Ed. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2017.
- [11] D. P. Devos, R. Gräf, and M. C. Field, "Evolution of the nucleus," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 28, no. 1. pp. 8–15, Jun-2014.
- [12] J. A. R. Gordon, R. A. Grandy, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. van Wijnen, and G. S. Stein, "Chromatin," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, Elsevier Inc., 2013, pp. 538–541.
- [13] NIH, "Ácido desoxirribonucleico (ADN) | NHGRI," *National Human Genome Research Institute*, 2019. .
- [14] A. Scherzad, T. Meyer, N. Kleinsasser, and S. Hackenberg, "Molecular mechanisms of Zinc oxide Nanoparticle-induced genotoxicity short running title: Genotoxicity of ZnO NPs," *Materials (Basel)*, vol. 10, no. 12, 2017.
- [15] V. De Matteis, "Exposure to inorganic nanoparticles: Routes of entry, immune response, biodistribution and in vitro/In vivo toxicity evaluation," *Toxics*, vol. 5, no. 4, 2017.
- [16] N. Mahaye, M. Thwala, D. A. Cowan, and N. Musee, "Genotoxicity of metal based

- engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review,” *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, vol. 773, pp. 134–160, 2017.
- [17] G. Razo, “Efecto genoprotector del jugo de toronja mediante la reparación y apoptosis,” *Esc. Nac. Ciencias Biológicas, Sección Estud. Posgrado e Investig.*, 2011.
- [18] N. Singh *et al.*, “NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 23–24. pp. 3891–3914, Aug-2009.
- [19] A. Azqueta and A. R. Collins, “The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair,” *Arch. Toxicol.*, vol. 87, no. 6, pp. 949–968, 2013.
- [20] S. Costa and J. Paulo Teixeira, “Comet Assay,” *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, vol. 1, pp. 1020–1023, 2014.
- [21] Angela Patricia Vergara García, “Estandarización Del Ensayo Del Cometa Alcalino En Células De Sangre Periférica,” 2010.
- [22] A. M. Pruski, S. Nahon, M. L. Escande, and F. Charles, “Ultraviolet radiation induces structural and chromatin damage in Mediterranean sea-urchin spermatozoa,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 673, no. 1, pp. 67–73, 2009.
- [23] M. Oliviero, S. Schiavo, S. Dumontet, and S. Manzo, “DNA damages and offspring quality in sea urchin *Paracentrotus lividus* sperms exposed to ZnO nanoparticles,” *Sci. Total Environ.*, vol. 651, pp. 756–765, 2019.
- [24] S. Sario, A. M. Silva, and I. Gaivão, “Titanium dioxide nanoparticles: Toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster* (SMART eye-spot test and comet assay in neuroblasts),” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 831, no. April, pp. 19–23, 2018.
- [25] E. R. Carmona, B. Escobar, G. Vales, and R. Marcos, “Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay in *Drosophila*,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 778, pp. 12–21, 2015.
- [26] E. Demir, S. Aksakal, F. Turna, B. Kaya, and R. Marcos, “In vivo genotoxic effects of four different nano-sizes forms of silica nanoparticles in *Drosophila melanogaster*,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 283, pp. 260–266, 2015.
- [27] A. Ávalos, A. I. Haza, D. Mateo, and P. Morales, “In vitro and in vivo genotoxicity assessment of gold nanoparticles of different sizes comet and SMART assays,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 120, no. June, pp. 81–88, 2018.
- [28] M. S. Cruz *et al.*, “Diosgenin induces genotoxic and mutagenic effects on HepG2 cells,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 120, no. February, pp. 98–103, 2018.
- [29] Z. Shi *et al.*, “Reduction of DNA damage induced by titanium dioxide nanoparticles through Nrf2 in vitro and in vivo,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 298, pp. 310–319, 2015.
- [30] S. Di Bucchianico *et al.*, “Aneuploidogenic effects and DNA oxidation induced in vitro by differently sized gold nanoparticles,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 2191–2204, 2014.

- [31] R. de C. S. de Oliveira, L. M. G. Antunes, V. Zucolotto, I. M. M. Paino, and V. S. Marangoni, "Cytotoxicity and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells," *Toxicol. Lett.*, vol. 215, no. 2, pp. 119–125, 2012.
- [32] J. M. George, M. Magogotya, M. A. Vetten, A. V. Buys, and M. Gulumian, "An investigation of the genotoxicity and interference of gold nanoparticles in commonly used in vitro mutagenicity and genotoxicity assays," *Toxicol. Sci.*, vol. 156, no. 1, pp. 149–166, 2017.
- [33] D. Gurbani, A. Kumar, R. K. Shukla, A. Dhawan, A. K. Pandey, and S. Singh, "TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells," *Nanotoxicology*, vol. 7, no. 1, pp. 48–60, 2011.
- [34] Q. Xia, H. Li, Y. Liu, S. Zhang, Q. Feng, and K. Xiao, "The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 105, no. 3, pp. 710–719, 2017.
- [35] M. Schulz *et al.*, "Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 745, no. 1–2, pp. 51–57, 2012.
- [36] J. Y. Kim *et al.*, "In vitro and in vivo assessment of the genotoxic effects of ceric ammonium nitrate and 1,3-propane sultone," *Toxicol. Lett.*, vol. 332, no. April, pp. 202–212, 2020.
- [37] D. F. Arencibia Arrebola, A. Vidal Novoa, L. A. Rosario Fernández, Y. E. Suárez Fernández, and L. Delgado Roche, "Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de linfocitos de sangre periférica," *Rev. Toxicol.*, vol. 28, no. 2, pp. 152–157, 2011.
- [38] M. G. González Morán, *Técnicas en biología celular: teoría y práctica*. México: AGT Editor, 1996.
- [39] A. R. Collins, "The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations," *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 3, pp. 249–261, 2004.
- [40] A. Azqueta *et al.*, "Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 843, no. May, pp. 24–32, 2019.
- [41] L. a Z. Venegas, "Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana," *Tesis Dr.*, p. 223, 2009.
- [42] A. Azqueta, K. B. Gutzkow, G. Brunborg, and A. R. Collins, "Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions," *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 724, no. 1, pp. 41–45, 2011.
- [43] A. Collins *et al.*, "Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 30, no. 2, pp. 139–146, 1997.
- [44] L. Ceschi-Bertoli, F. A. P. Vidal, P. J. Balsamo, and F. C. Abdalla, "Comet assay

protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury,” *Chemosphere*, vol. 261, 2020.

- [45] P. M. Megías M, Molist P, “Atlas de histología vegetal y animal. Tipos celulares,” 2019. .
- [46] P. Orozco, Y. Montoya, and J. Bustamante, “Development of endomyocardial fibrosis model using a cell patterning technique: In vitro interaction of cell coculture of 3T3 fibroblasts and RL-14 cardiomyocytes,” *PLoS One*, vol. 15, no. 2, pp. 1–24, 2020.
- [47] A. R. Collins, “Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 2, pp. 794–800, 2014.
- [48] K. L. Pligina, A. K. Zhanataev, E. A. Anisina, N. O. Dauge-Dauge, and A. D. Durnev, “Comet assay on one- and two-cell mouse embryos,” *Toxicol. Lett.*, vol. 331, no. December 2019, pp. 124–129, 2020.
- [49] Y. Wang, H. Zhang, L. Shi, J. Xu, G. Duan, and H. Yang, “A focus on the genotoxicity of gold nanoparticles,” *Nanomedicine*, vol. 15, no. 4, pp. 319–323, 2020.
- [50] A. Azqueta *et al.*, “DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches,” *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, vol. 781, no. March, pp. 71–87, 2019.
- [51] S. Yalcin, “27 - Cytotoxicity and biocompatibility of advanced green materials,” in *Applications of Advanced Green Materials*, S. Ahmed, Ed. Woodhead Publishing, 2021, pp. 705–722.
- [52] K. Y. Chen, J. Lu, and A. Y.-C. Liu, *Chapter II The activation of trans-acting factors in response to hypo- and hyper-osmotic stress in mammalian cells*, vol. 1, no. C. Elsevier B.V., 2000.

## 7. ANEXO 1 METODOLOGÍA Y PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### 7.1 Protocolo de ensayo Cometa para la evaluación de genotoxicidad de nanopartículas metálicas en interacción con cardiomiocitos RL-14

#### 7.1.1 Pretratamiento de portaobjetos con agarosa NMA

*Nota:* para recubrir los portaobjetos es necesario tener en un recipiente en donde se logre cubrir con totalidad los portaobjetos con la agarosa, además ir calentando poco a poco en el microondas, en tiempos de 30 segundos hasta que se encuentre totalmente transparente y se observe una mezcla homogénea.

1. Lavar portaobjetos en un recipiente con Tergazyme durante un mínimo de 12 horas.
2. Dejar en agua destilada durante un mínimo de 12 horas. EL agua destilada se debe cambiar cada cuatro horas.
3. Se realiza un último lavado con agua destilada y se deja durante una hora en etanol frío al 70%.
4. Se llevan las placas a secar al horno a 60°C en bandeja, la cual debe estar libre de suciedades.
5. Retirar las placas del horno y dejara temperar a temperatura ambiente durante un mínimo de una hora.
6. Calentar la agarosa NMA en microondas en intervalos de 30 segundos evitando que esta genere demasiadas burbujas, para no tener pérdidas, una vez esté totalmente transparente, llevar a baño maría a 37°C durante 5 minutos o hasta que la temperatura de la agarosa este entre 50 y 42°C aproximadamente.
7. En una plancha caliente, entre 60°C y 100°C, colocar la agarosa y sumergir las placas limpias en la agarosa.
8. Retira de la placa de la solución de NMA de manera horizontal, dejar en esta posición por un tiempo y con una gasa con alcohol limpiar la parte interior de los portaobjetos y colocar en bandeja cubierta con aluminio.
9. Llevar laminas a secado a 60°C durante 20 minutos, revisando cada 10 minutos, tomando en cuenta que una vez estén secas se deben sacar del horno
10. Dejar temperar placas a temperatura ambiente en recipiente cerrado y guardar a 4°C hasta su uso.

### 7.1.2 Día 1

1. Sacar placas recubiertas de NMA a temperatura ambiente.
2. Realizar la separación por medio de tripsina a 3 minutos y después centrifugar a 4 minutos, retirar sobrenadante sin tocar el botón, homogenizar y realizar los cálculos de viabilidad y densidad celular, una vez terminado dejar tubo a 37°C en oscuridad hasta su uso, es con el fin de generar más daño a las células.
3. Calentar la agarosa LMA en microondas, verificando que no se generen burbujas y calentar hasta observar una solución homogénea y transparente. Tener lista una plancha a 90°C.
4. Sacar la agarosa de las microondas y poner en plancha tapada con aluminio para mantener caliente y en estado líquido.
5. Poner el portaobjetos en sitio limpio, este debe estar a temperatura ambiente.
6. Tomar la suspensión celular, la cual se debe resuspender antes de tomar el volumen, un volumen de células según lo calculado, con el fin de obtener una densidad celular entre 3000 y 3500 células/mililitro
7. Tomar el volumen de agarosa restante para completar un volumen final de 100µL, lentamente hasta observar que en la punta no se observen burbujas y adicionar al tubo de microcentrífuga suavemente, adicionar la suspensión celular, de modo que la punta quede dentro de agarosa y resuspender tres veces.
8. Cambiando la punta con la que se añadió la agarosa al tubo y con una punta nueva, resuspender dos veces la mezcla y suavemente tomar del tubo, de tal manera que no se generen burbujas y depositar las gotas en el portaobjetos pretratado.

*Nota:* es importante no generar burbujas por que pueden quedar en las gotas y estas afectan en la lectura del ensayo. El proceso debe hacerse forma ágil ya que se debe evitar que la agarosa se gelifique en las puntas o antes de depositar el volumen total.

9. Llevar placas con gotas a 4°C durante 10 minutos
10. Adicionar solución de lisis al recipiente coplin y antes de depositar las placas verificar que las gotas estén solidificadas, una vez se verifica depositar las placas en la solución de lisis y dejar a 4°C protegidas de la luz durante 17 horas cronometradas.

### 7.1.3 Día 2

1. Preparar buffer de electroforesis  
*Nota:* este buffer se prepara con mínimo media hora de anticipación antes de que salgan las células del tratamiento de lisis.
2. Pasadas las 17 horas, sacar las placas de la solución de lisis y lavar suavemente dos veces con PBS al 1X

3. Introducir las placas a la cámara de electroforesis, la cual debe estar previamente limpia con etanol y agua desionizada, y adicionar suavemente por los lados de la cámara el buffer de electroforesis.
4. Llevar la cámara sin los electrodos, con las placas a 4°C durante media hora cronometrada.
5. Pasada la media hora sacar la cámara de 4°C y posicionar la cámara en la nevera o bandeja en frío en donde se correrá la electroforesis de tal manera que esta se encuentre entre 4°C a 6°C y alistar los parámetros de corrimiento (25 V, 300 mA, 30 min).

*Nota:* Si el buffer de electroforesis no genera burbujas después del corrimiento significa que no hubo un movimiento de cargas.

6. Lavar suavemente con PBS las muestras y lavar con neutralizante 3 veces durante 5 minutos
7. Lavar con PBS dos veces las placas y dejar 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para secado.
8. Fijar con metanol al 10% durante 10 minutos
9. lavar dos veces con PBS las muestras y dejar secar en oscuridad durante 5 minutos.
10. Lavar con tritón al 1X durante un minuto y medio y lavar dos veces con PBS y dejar cinco minutos en oscuridad para secado.
11. Teñir placas con bromuro al 0.02 mg/mL durante 5 minutos
12. Lavar las placas dos veces con PBS y dejar cinco minutos en oscuridad para secado
13. Por último, en un recipiente cerrado y protegido de la luz dejar las placas en refrigeración a 4°C como mínimo una hora antes de proceder a leer, ya que con esto se mejora la calidad de la imagen tomada.

## **7.2 Soluciones para el desarrollo del ensayo Cometa**

### **7.2.1 Solución de lisis**

Solución stock:

- Cloruro de sodio (NaCl) (2.5 M)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (100 mM)
- Tris (10 mM)
- Lauryl Sarcosinato de Sodio (10 %w/v)

*Nota:* la solución debe estar en un pH entre 10 y 10.5 y se ajusta con NaOH al 10 N o 1 N o HCl al 10N o 1 N

Solución de trabajo

- Solución stock
- DMSO (10 % v/v)

- Triton X100 (1 % v/v)

*Nota: la solución debe estar en valor de pH 10 y se ajusta con NaOH al 10 N o 1 N o HCl al 10N o 1 N*

### **7.2.2 Buffer neutralizante**

Tris hidroximetil aminometano (10mM)

*Nota: la solución debe estar en valor de pH 7.5 y se ajusta con NaOH al 10 N o 1 N o HCl al 10N o 1 N*

### **7.2.3 Buffer de electroforesis**

- NaOH (10 N)
- EDTA (200 mM)

*Nota: la solución debe estar en valor de pH 13 y se ajusta con NaOH al 10 N o 1 N o HCl al 10N o 1 N*

### **7.2.4 Tintes**

Solución stock

- Bromuro de etidio (0.2 mg/mL)

Solución de trabajo

- Bromuro de etidio (0.02 mg/mL)

### **7.2.5 Agarosas**

- Agarosa de punto de fusión normal (1 % w/v)
- Agarosa de Bajo punto de fusión (0.5 % w/v)

*Nota: las agarosas se deben preparar con PBS al 1X*

### 7.3 Producción científica

En el evento *II Workshop de Bioingeniería* se presentó el trabajo titulado “Evaluación genotóxica de nanopartículas de oro en un modelo in vitro de cardiomiocitos RL- 14 implementando ensayo cometa” en categoría de póster (se anexa certificado de participación).

