

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTORA EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TRASLACIONAL

Biocompatibilidad de la interacción de nanopartículas de Titanato de Bario recubiertos con quitosano en cultivos celulares

Área de Investigación:

Nanomateriales - Aplicaciones en Medicina

Autora:

Castillo Díaz, Ruth Elizabeth

Jurado Evaluador:

Presidente: Caballero Alvarado, José Antonio
Secretario: Guerrero Hurtado, Juana Del Carmen
Vocal: Angelats Silva, Luis Manuel

Asesora:

Córdova Paz Soldán, Ofelia Magdalena
Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5290-0620>

TRUJILLO – PERÚ 2024

Fecha de sustentación: 2024/06/24

Tesis Ruth 2024



INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

15%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	rev.aetox.es	Fuente de Internet	3%
2	repositorio.uchile.cl	Fuente de Internet	2%
3	www.dspace.unitru.edu.pe	Fuente de Internet	2%
4	www.researchgate.net	Fuente de Internet	2%
5	sedici.unlp.edu.ar	Fuente de Internet	2%
6	produccioncientifica.ucm.es	Fuente de Internet	1%
7	flore.unifi.it	Fuente de Internet	1%
8	kupdf.net	Fuente de Internet	1%
9	repositorio.upao.edu.pe	Fuente de Internet	1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias: < 1%

Excluir bibliografía

Activo

Declaración de originalidad

Yo, Dra. Ofelia Magdalena Córdova Paz Soldán, docente del Programa de Estudio de la escuela de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego, asesor de la tesis de investigación titulada "Biocompatibilidad de la interacción de nanopartículas de Titanato de Bario recubiertos con quitosano en cultivos celulares", autor Ruth Elizabeth Castillo Díaz, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 15 %. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software Turnitin el (02, julio del 2024).
- He revisado con detalle dicho reporte y la tesis "Biocompatibilidad de la interacción de nanopartículas de Titanato de Bario recubiertos con quitosano en cultivos celulares" y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las normas establecidas por la Universidad.

Lugar y fecha: Trujillo, 02 de julio 2024

Ofelia Magdalena Córdova Paz Soldán
Apellidos y nombres del asesor
DNI: 18030344
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-0620>

FIRMA:



Ruth Elizabeth Castillo Díaz
Apellidos y nombres del autor
DNI: 40784093
FIRMA:



En memoria de Miguel Castillo De La Cruz y Miguel Castillo Díaz, los amo eternamente!.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

A Dios todopoderoso a quien agradezco la bendición de poder estudiar y ascender en mi carrera profesional. A Él sea todo honor y toda gloria por siempre y para siempre.

A mis padres Miguel (hoy en el cielo) y Alejandrina por su amor y guía, su dedicación a los suyos son un invaluable ejemplo para mí, les debo todo lo que soy y ruego a Dios me permita retribuirle a mamá, todo lo que hace por mí.

A mis hermanos Miguel (en el cielo junto a papá), Rosa, Onésimo, Carmen, Gladys, César y Eros Miguel, su cariño y amor incondicional son un soporte fundamental en mi vida y en mi desarrollo personal, académico - profesional.

A mis amados sobrinos (as) Diego, Rayza, Gustavo, Alexandra, María de los Ángeles, Guillermo, Miguel Alejandro, Cristopher, Daniel, Miguel Ángel, Astrid, Camila, Leonardo, Sofía y Gabriel; quienes han sido mi sostén con sus sonrisas, abrazos y ternura durante esta etapa, ayudándome a mantenerme firme y llena de amor.

A la Dra. Ofelia Magdalena Córdova Paz Soldán, docente del Departamento Académico de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego - UPAO por su apoyo y disposición incondicional para el asesoramiento y desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Luis Manuel Angelats Silva, docente investigador de la Universidad Privada Antenor Orrego - UPAO por su apoyo incondicional en el co-asesoramiento y ejecución de la presente tesis.

Al Dr. Berly Manrique Orrillo, por las facilidades brindadas para que la presente tesis se ejecute en las instalaciones de la Unidad de Genética y Biología Molecular – GEMA del laboratorio Bermanlab.

A la Dra. Patricia Contreras Vera, porque su ejemplo y orientación fortalecen mi pasión por la investigación científica.

Al Dr. José Guillermo González Cabeza, por las facilidades brindadas para el uso de equipos del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad Privada Antenor Orrego – UPAO.

A mis amigos, Tathya Chiguala Marchena y Deyvi Meléndez Rodríguez por su constante apoyo científico, académico y emocional en la ejecución de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por financiar la presente Tesis, enmarcada dentro del proyecto de investigación: *“Desarrollo y producción de nanocompuestos ferroeléctricos biocompatibles basados en titanato de bario con potenciales aplicaciones al diagnóstico de cáncer al pulmón e implantes que aceleren el proceso de osteogénesis”*- SUB PROYECTO 072-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV.

Resumen

Esta investigación evaluó la biocompatibilidad de nanopartículas de Titanato de Bario recubiertas con quitosano en cultivos celulares, centrándose en las líneas celulares HeLa y linfocitos humanos. El objetivo general fue determinar el impacto de estas nanopartículas en la viabilidad celular y la integridad cromosómica.

Se realizaron ensayos para establecer la concentración óptima que no genere citotoxicidad, determinar la dosis letal media y analizar la viabilidad celular mediante el ensayo MTT y la observación de aberraciones cromosómicas. Los resultados indicaron que las nanopartículas de BaTiO₃@quit mostraron una biocompatibilidad favorable hasta una concentración de 100 µg/ml en células HeLa, sin afectar significativamente la viabilidad celular ni la estructura cromosómica de los linfocitos.

Este estudio concluye que las nanopartículas de BaTiO₃ recubiertas con quitosano no presentan efectos citotóxicos ni genotóxicos significativos en los modelos celulares evaluados, sugiriendo su potencial aplicación en aplicaciones biomédicas y bioelectrónicas.

Palabras clave: Nanopartículas de Titanato de Bario, Quitosano, biocompatibilidad, Viabilidad celular.

Abstract

This research evaluates the biocompatibility of barium titanate nanoparticles coated with chitosan in cellular cultures, focusing on HeLa cell lines and human lymphocytes. The general objective was to determine the impact of these nanoparticles on cell viability and chromosomal integrity.

Tests were conducted to establish the optimal concentration that does not generate cytotoxicity, determine the median lethal dose, and analyze cell viability using the MTT assay and observation of chromosomal aberrations. The results indicated that BaTiO₃@chitosan nanoparticles showed favorable biocompatibility up to a concentration of 100 µg/ml in HeLa cells, without significantly affecting cell viability or chromosomal structure in lymphocytes.

This study concludes that BaTiO₃ nanoparticles coated with chitosan do not present significant cytotoxic or genotoxic effects in the evaluated cellular models, suggesting their potential application in biomedical and bioelectronic fields.

Keywords: Barium Titanate Nanoparticles, Chitosan, Biocompatibility, Cell Viability.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
Resumen	7
Abstract.....	8
1. Introducción	12
2. Marco teórico	16
2.1 Objetivo general.....	17
2.2 Objetivos específicos	18
3. Población y método.....	18
3.1 Población	18
3.2 Método.....	19
3.3 Procedimientos y técnicas.....	20
4. Resultados	30
5. Discusión	37
6. Recomendaciones	41
7. Conclusiones	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reducción del MTT a Formazan por la acción de una enzima mitocondrial	24
Figura 2. Diagrama principio MTT.....	25
Figura 3. Imágenes por microscopía electrónica de BaTiO ₃ @quit. En A, Imagen TEM - Talos Thermo Fisher FC200-. En B, Imagen SEM - TESCAN VEGA 3 LMU	30
Figura 4. Resultado de la absorbancia a 540nm de la exposición de células HeLa a tratamientos de 0ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml de BaTiO ₃ @quit durante 24, 48 y 72 horas.	30
Figura 5. A: Viabilidad celular mediante MTT de células HeLa expuestas durante 24, 48 y 72h a diferentes concentraciones (0 ug/ml, 10 ug/ml, 20 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml) de BaTiO ₃ @quit	31
Figura 6. Viabilidad celular de las células HeLa, evaluado por la técnica de Milles-Misra, expuestas durante 24, 48 y 72h a diferentes concentraciones (0 ug/ml, 10 ug/ml, 20 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml) de BaTiO ₃ @quit. Los datos se proporcionan como media ± DE de tres experimentos independientes (n = 3).....	31
Figura 7. Viabilidad celular mediante MTT de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de BaTiO ₃ y BaTiO ₃ @quit.....	32
Figura 8. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del control negativo del trabajo realizado	33
Figura 9. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del tratamiento 5 ug/ml de BaTiO ₃ @quit.....	34

Figura 10. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del tratamiento 10 ug/ml de BaTiO3@quit.....	34
Figura 11. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del tratamiento 20 ug/ml de BaTiO3@quit.....	35
Figura 12. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del tratamiento 50 ug/ml de BaTiO3@quit.....	35
Figura 13. Cariotipo humano 46, XY obtenido del tratamiento 100 ug/ml de BaTiO3@quit.....	36
Figura 14. Observación de la no replicación celular en el tratamiento positivo 30ug/ml de Kr2Cr2O.....	36

1. Introducción

Las investigaciones sobre las propiedades de las nanopartículas en la biología y medicina empezaron aproximadamente en la última década, las propiedades únicas, como la no linealidad óptica que conduce a la posibilidad de generación del segundo armónico (SGH) (Stanley, 2014), y los altos valores de la piezorespuesta (Habib et al, 2011) de estos materiales han incentivado interés en los investigadores para futuras aplicaciones biomédicas como los son diversos tipos de sensores biomédicos (fluorescentes y otros tipos de microscopía de células y tejidos biológicos (Méndez-Rojas et al, 2018), tomografía por microondas de tumores malignos (Hussain et al, 2013) e implantes de huesos que estimulan la proliferación celular (Martínez-Carmona et al, 2018).

Es importante resaltar que las nanopartículas ferroeléctricas de titanato de bario son las más utilizadas en estudios biológicos y médicos (Fu-Cheng et al, 2022). Esto gracias al hecho que el titanato de bario es uno de los materiales ferroeléctricos más estudiados y no contiene plomo, lo que favorece su biocompatibilidad.

Uno de los problemas importantes de la aplicación práctica de las nanopartículas es la posibilidad de estabilizarlos en medios biocompatibles, principalmente soluciones acuosas, ya que de no ser así conduciría a efectos indeseables (Huang et al, 2012). El principal método que evita estos efectos, es el de crear en la superficie de las nanopartículas, diversos tipos de recubrimientos orgánicos, incluyendo compuestos biocompatibles (ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido poliaspártico, ácido fosfónico (aminometil), poly-L-lysine, etc.) (Issa et al, 2013).

En los últimos años, se han publicado muchas investigaciones acerca de las aplicaciones en la medicina de las nanopartículas (NP), como por ejemplo, su uso como vehículos para fármacos, vacunas, antimicrobianos y para nanodiagnóstico (Gao et al, 2016; Lan et al, 2017). Pese a ello, aún existen diversos obstáculos para la transferencia tecnológica en aplicaciones clínicas. En evaluaciones toxicológicas de nanomateriales, se ha reportado que, las NP causan efectos adversos sobre el organismo.

Estas investigaciones van desde los estudios que demuestran que NP de óxido de níquel (NiO) causan inflamación en los pulmones de ratas (Shinohara et al, 2017) o puntos cuánticos de telururo de cadmio (CdTe) que causan nefrotoxicidad tanto en células de riñón embrionario humano (HEK 293) como en ratones (Jiang et al, 2018). Aun así, los mecanismos moleculares de la nanotoxicidad inducida por diversos nanomateriales no se conocen completamente (Missaoui, et al, 2018).

El uso de las NP tiene un futuro prometedor al considerárselas una herramienta esencial en la nanomedicina sin embargo, entre los principales desafíos con los que se encuentra es demostrar su biocompatibilidad. Algunos investigadores mencionan que, la caracterización de las NP solas o bioconjugadas es de suma importancia, ya que permitirá no solo conocer su tamaño y composición, sino también la predicción y/o evaluación de los efectos tras la interacción con el organismo. Estos autores, sugieren que, el tamaño de una NP es suficientemente pequeño para entrar en una célula; independientemente de la vía de exposición que se haya realizado y provocar algún efecto debido a la interacción con un sistema biológico (Wang et al, 2009; Egusquiaguirre et al, 2012).

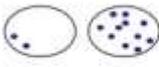
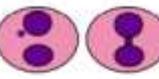
La aplicación de NP en el campo de la medicina, representan un escenario complicado, debido a los eventos que pueden originarse después de la exposición a las NP. Esta interacción NP-organismo, está totalmente basado en términos de características fisicoquímicas de las NP, dosis, frecuencia y vía de administración. El que las NP sean seguras, es uno de los grandes retos en el desarrollo de nanoterapias, por ello se recomienda

hacer estudios de su biocompatibilidad y así conocer si tiene efectos secundarios y adversos (Mura & Couvreur, 2012).

Un aspecto importante de la identificación del peligro incluye la posibilidad de que un nuevo agente pueda inducir genotoxicidad, daños en el material genético que puede resultar en la inducción o promoción de carcinogénesis, además de efectos reproductivos si se ve comprometido ADN de células germinales (Doak et al, 2012). Un mecanismo bastante descrito es la capacidad de los nanocompuestos (NMs) para causar estrés oxidativo (Doak et al, 2012), pero también otros mecanismos pueden estar implicados, incluyendo las interacciones directas y alteraciones del huso mitótico y sus componentes. Además existe la posibilidad de que los NMs puedan causar inestabilidad genómica a través de mecanismos epigenéticos (Karlsson et al, 2015).

La vigilancia de los efectos genotóxicos de los carcinógenos en los seres humanos se aplica cada vez más para fines de identificación de peligros o de evaluación de riesgos (Albertini et al 2000). Existen algunos sistemas para la evaluación del potencial genotóxico. En la Tabla 1 se muestran las pruebas para evaluar la genotoxicidad de NMs, fundamento, tipo de daño e interpretación de resultados.

Tabla 1. Pruebas empleadas para evaluar la genotoxicidad de NMs.

Prueba	Tipo de daño	Fundamento	Interpretación de resultados	Ref.
 <p>Test de Ames</p>	Evalúa el potencial mutagénico	Cepas de la bacteria <i>Salmonella typhimurium</i> llevan diferentes mutaciones en varios genes, haciéndolos incapaces de sintetizar el aminoácido histidina.	En medios sin histidina, solo crecerían las bacterias que adquieren una retromutación debido a mutaciones inversas provocadas por el compuesto prueba.	(Musgrove y Camps, 2012)
 <p>Ensayo del cometa</p>	Roturas en el ADN de una y de doble cadena a nivel de células individuales.	Las células individuales en un portaobjetos con agarosa se lisan y el ADN se somete a electroforesis.	A mayor migración de los fragmentos de ADN, mayor daño en éste.	(Tice et al., 2000; Hartmann et al., 2003; Brendler-Schwaab et al., 2005; Olive y Banáth, 2006)
 <p>Micronúcleos</p>	Daño cromosómico de tipo clas-togénico (fragmentación cromosoma) o del modo aneugénico (la pérdida del cromosoma entero).	Las células en división en presencia de una sustancia de ensayo que produzca daño generarían micronúcleos	La frecuencia de núcleos más pequeños en las células binucleadas, da una medida de genotoxicidad.	(Fenech et al., 1999; Norppa y Falck, 2003; Fenech, 2007)
 <p>Aberraciones cromosómicas</p>	Detecta alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales.	Un experto en citogenética es capaz de diferenciar los cromosomas normales de los alterados en células en metafase.	La cantidad de alteraciones observadas es proporcional al potencial carcinógeno del compuesto de prueba	(Natarajan, 2002)
 <p>gH2AX</p>	La presencia de gH2AX es un indicador sensible de daño de doble cadena del ADN.	Las células eucariotas superiores, presentan la variante de histona H2A que es fosforilada en serina 139, en respuesta el ADN de doble filamento se rompe. Puede ser detectado por microscopía de inmunofluorescencia y westernblot.	La fosforilación de histona H2A en serina 139 es proporcional al daño causado por el compuesto prueba.	(Nakamura et al., 2006; Valdiglesias et al., 2013)
 <p>HPRT</p>	Mutaciones en genes de células de mamíferos	HPRT cataliza la formación de inosina o guanosina monofosfato de hipoxantina o guanina. El tratamiento con 6-tioguanina genera monofosfato de 6-tioguanina (6-TGM), que es citotóxico para las células de tipo salvaje.	La frecuencia de supervivencia formando colonias indica la frecuencia de mutaciones deletéreas puntuales a una dosis dada del compuesto de prueba	(Albertini et al., 2000)

Se pueden derivar efectos genotóxicos de las interacciones directas con el ADN después de la internalización de células, que se define como genotoxicidad directa, o por la capacidad de las partículas para inducir una reacción inflamatoria y para generar un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) (genotoxicidad indirecta). Las ROS pueden ser generadas por los NMs, por sus iones en el caso de las nanopartículas de metal, las impurezas e incluso por los macrófagos tras la fagocitosis frustrada de NMs (Aye et al, 2013; Tajani, 2013).

Las características de los modelos biológicos estudiados, presentaron diferencias en la composición de las membranas celulares, la cual está diseñada para proveer fuerza, rigidez, forma y proteger de daños mecánicos y cambios osmóticos a la célula. La interacción de las NPs con la membrana de la célula se lleva a cabo por medio de interacciones

electrostáticas y la disrupción de la integridad de la membrana (Thill et al., 2006). El modelo por ejemplo *E. coli* es menos susceptible que *B. subtilis* y *S. aureus* a las NPs de CuO y la diferencia entre estos microorganismos es la composición de la membrana celular de cada uno (Baek & An, 2011).

2. Marco teórico

En el 2011 en España, el estudio realizado por María Alcaide denominado "Biocompatibilidad ""in vitro"" de biomateriales con distinta aplicación en ingeniería de tejido óseo", quien analizó distintos parámetros relacionados con la morfología y funcionalidad de diversos tipos celulares (fibroblastos L929, osteoblastos Saos-2 y linfocitos T) y puso a punto la detección de nuevos marcadores de biocompatibilidad *in vitro* con el fin de evaluar la interacción célula-biomaterial que desempeña un papel clave en el conocimiento de la biocompatibilidad de todo material destinado a Ingeniería de Tejidos.

En Chile el 2013, Beltrán en su investigación "Estudio de biocompatibilidad de compositos poliméricos con nanopartículas de cobre", concluyó que estos no son tóxicos en condiciones evaluadas ni para células normales de tejido de ratón ni para células cancerígenas específicamente de tiroides.

Argueta-Figueroa y colaboradores, en el 2018, analizaron en la ciudad de México el impacto biológico y la toxicidad de las nanopartículas de Dióxido de titanio en la producción de especies reactivas de oxígeno, y reportaron que observaron un ligero aumento en el número de células metabólicamente activas al estar en contacto con las nanopartículas de titanio; sin embargo, a ciertas dosis la viabilidad celular decrece, concluyendo que aunque puede clasificarse como un material con citotoxicidad ligera o incluso biocompatible, no puede ser considerado completamente inocuo.

En el 2018, Urrejola y colaboradores, en Santiago de Chile evaluaron un sistema de nanopartículas poliméricas utilizadas para la biodetección y monitoreo de glucosa en Diabetes, bioimágenes para nanooncología, terapia génica, así como Ingeniería de tejidos, haciendo énfasis en regeneración ósea; obteniendo resultados positivos que se proyectan a mejorar la calidad de vida de muchas personas.

Es fundamental conocer las respuestas biológicas que las nanopartículas presentan en función de su naturaleza y de la duración del contacto con la célula, por ello se considera importante someter a diferentes concentraciones de dichas moléculas y hallar la óptima interacción célula- nanopartícula, para probar la biocompatibilidad, para ello se pueden emplear cultivos celulares y animales de experimentación. Los efectos citotóxicos debido a estas nanopartículas pueden ocurrir a altas concentraciones, por lo que es importante determinar la dosis letal mínima media y a partir de ella probar con diferentes concentraciones la biocompatibilidad.

Considerando lo anteriormente mencionado, nos planteamos la siguiente interrogante:

¿Son biocompatibles las nanopartículas de Titanato de Bario recubiertas con quitosano en interacción con los cultivos celulares?

Los objetivos de esta investigación fueron:

2.1 Objetivo general:

Evaluar la Biocompatibilidad del mecanismo de interacción de las nanopartículas de Titanato de Bario recubiertas con quitosano, con cultivos celulares.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar la concentración óptima de las nanopartículas de Titanato de Bario recubiertas con Quitosano que permita medir la citotoxicidad celular.
- Determinar la dosis letal media de las nanopartículas de Titanato de Bario recubiertos con Quitosano en interacción con cultivos celulares.
- Analizar la viabilidad celular de la interacción de las nanopartículas de Titanato de Bario recubiertas con Quitosano identificando la integridad de sus estructuras celulares.

3. Población y método:

3.1 Población

3.1.1 Población objetivo/estudio: La población estará constituida por las líneas celulares: HeLa y linfocitos, que interaccionaron con las nanopartículas de Titanato de Bario recubiertos con quitosano.

3.1.1 Muestra: Cultivos celulares que cumplan los criterios de inclusión y exclusión respectivos.

3.1.2 Unidad de Muestreo: Subcultivo celular en interacción con las nanopartículas de Titanato de Bario recubierto con quitosano.

3.1.2.1 Criterios para ser incluidos en el estudio

Líneas celulares viables con formación de monocapas de proliferación celular.

3.1.2.2 Criterios para ser excluidos del estudio:

- Cultivos celulares que evidencian células exfoliadas y no formación de monocapas celular.
- Cultivos celulares contaminados.

3.1.3 Muestreo: Al azar

3.2 Método

3.2.1 Tipo de estudio: cuantitativo, observacional, longitudinal, analítico y retrospectivo.

3.2.2 Diseño de investigación: Diseño de bloques totalmente al azar.

3.2.3 Variables y operacionalización de variables:

3.2.3.1 Variables

3.2.3.1.1 Concentración de nanopartículas: cantidad exacta de nanopartículas de titanato de bario que se emplearon en la exposición a cultivos celulares (Albertini et al, 2000; Aye et al, 2013).

3.2.3.1.2 Tiempo de exposición: tiempo medido en la exposición a los tratamientos (Tajani, 2013).

3.2.3.2 Operacionalización de variables

Definición conceptual:

Biocompatibilidad: Capacidad de un biomaterial para desempeñar la función deseada de acuerdo con un tratamiento médico, sin provocar ningún efecto indeseable, pero al mismo tiempo generando la mejor respuesta celular o del tejido en esa situación específica

Interacción entre nanopartículas y células: Acción que se ejerce recíprocamente entre nanopartículas y células.

Definición operacional:

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO	ESCALA	INDICADORES	INDICES
Biocompatibilidad	Porcentaje de células viables sin evidencia de efecto citotóxicos post tratamiento.	Cuantitativa	Razón	Grado de citotoxicidad	G0 G1 G2 G3
Interacción entre nanopartículas y células	Contacto nanopartícula-célula, evidenciada por microfotografía	Cualitativa	Nominal	Presencia de interacción nanopartícula-célula.	Sí-No

3.3 Procedimientos y técnicas:

Se procedió a solicitar la aprobación por la Escuela de Posgrado de la UPAO y la aprobación por el Comité de Ética de la universidad.

Los resultados obtenidos de la repetibilidad de los tratamientos de acuerdo al protocolo elaborado durante el ensayo fueron registrados en una tabla de Excel y sometidos a análisis estadísticos.

A. Obtención de los nanocompuestos de Titanato de bario recubiertas con quitosano (BaTiO₃@quit):

Como insumo primario se emplearon nanopartículas de Titanato de bario (Sigma Aldrich) de forma esférica con un diámetro promedio de aproximadamente 50nm, inicialmente en una fase cúbica paraeléctrica. Para la modificación superficial se usaron peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% (J. T. Baker), quitosano

extraído de exoesqueleto de langostino (*Penaeus vannamei*). Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura (mili-Q). Como materiales de vidrio fueron empleados matraces y vasos pyrex de 500 mL, los cuales fueron lavados primero con detergente Alconox, seguido de un enjuague con agua corriente y agua de-onizada y, secados finalmente en una estufa a 120 °C.

Para la transformación a la fase ferroeléctrica, se colocaron 10 g de nanopolvo de BaTiO₃ en un crisol y sometido a un tratamiento térmico de recocido a 900 °C durante 6.5 horas, dejando enfriar luego hasta la temperatura ambiente. Este proceso garantiza la formación de una estructura cristalina tetragonal, con propiedades ópticas no-lineal (generación de segundo armónico), que funcionarían como fluoróforos inorgánicos.

Modificación superficial de nanopartículas de titanato de bario (BaTiO₃), fase tetragonal, con grupos -OH mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂):

Con el propósito de enlazar eficientemente las nanopartículas de BaTiO₃ con quitosano, se realizó proceso de derivación de grupos funcionales -OH en las superficies de las nanopartículas, mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En un vaso de precipitación de 600 mL de capacidad, se disolvió 0.4 g de BaTiO₃ (con fase tetragonal) en 160 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% (Concentración = 2.5 mg/mL), bajo agitación magnética a una temperatura de 106 °C, durante un tiempo de reacción aproximado de 02 horas o hasta que el H₂O₂ se haya consumido casi en su totalidad. La muestra húmeda fue colocada en una placa Petri de 10 cm de diámetro y secada en una estufa a 100 °C hasta observarse polvo de nanopartículas libre de humedad.

Proceso de obtención de los nanocompuestos de titanato de bario recubiertos con quitosano (BaTiO₃@quit):

En un matraz de 125 mL, se preparó una solución de 0.125 g de quitosano de bajo peso molecular (Sigma Aldrich) (Low Molecular Weight) en 50 ml de ácido acético al 0.5% (v/v) bajo agitación magnética a una temperatura de 40 °C durante 22 horas. Luego, a la solución se reguló el pH hasta 4.7 empleando una solución de hidróxido de sodio al 10% (p/v). A fin de homogeneizar, la solución fue filtrada con filtros para jeringa hipodérmica de 0.45 µm. A continuación, al matraz se agregó 0.1 g de nanopartículas ferroeléctricas de titanato de bario (fase tetragonal) previamente modificadas con grupos OH (hidroxiladas). La mezcla fue sometida a agitación magnética por un tiempo de 4 horas y a una temperatura de 40 °C.

Paralelamente, se prepararon una solución de tripolifosfato de sodio (STPP) a la concentración de 0.4 mg/mL, las que fueron agitadas magnéticamente por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se reguló el pH hasta 11 mediante hidróxido de sodio al 10% (p/v), seguido de una agitación ultrasónica por 20 minutos a temperatura ambiente. La solución fue vertida en una bureta (50 mL), para luego dejar caer gota a gota (10uL/s) sobre la solución de quitosano conteniendo nanopartículas de BaTiO₃-OH, preparadas anteriormente. La mezcla resultante fue sometida a ultrasonido por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a la separación de los nanocompuestos (BaTiO₃@quit) por medio de centrifugación por un tiempo de 30 minutos, a la temperatura de 4°C y 9000 rpm. El nanocompuesto recuperado fue secado en estufa a 60°C por 3 horas y el sobrenadante fue almacenado y etiquetado para su posterior estudio.

B. Obtención de los cultivos celulares:

Para evaluar la biocompatibilidad de la interacción Nanopartículas-célula, se trabajó con células HeLa, mantenidos en medio de cultivo DMEM completo (Hennes et al, 2013), y linfocitos humanos cultivados en medios RPMI-1640 en estufa a 37°C con 5% CO₂.

Se estudió la proliferación y la genotoxicidad de nanocompuestos (BaTiO₃@quit), evaluando cariotipos obtenidos a partir de linfocitos humanos genotípicamente normales (Huang et al, 2009).

Para las líneas celulares Hela se utilizó el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo con Suero Fetal Bovino 10%. Este medio es comúnmente utilizado para cultivo de diferentes células de mamíferos como fibroblastos, neuronas, células de musculo liso, HeLa, osteoblastos, etc. Contiene 4 veces más aminoácidos que el medio mínimo Eagle original y no contiene lípidos, factores de crecimiento o proteínas. Por esta razón requiere ser complementado con suero bovino. Además, tiene un sistema buffer de bicarbonato (3,7 g/L), por lo que requiere una atmosfera de 5-10% de CO₂ para mantener el pH en valores fisiológicos (Jiang et al, 2009).

Para los linfocitos humanos, se utilizó el medio RPMI-1640, el medio Roswell Park Memorial Institute, comúnmente conocida como RPMI, es una forma de instrumento utilizado en el cultivo de células y cultivo de tejidos. Tradicionalmente se ha utilizado para el crecimiento de células humanas linfoide. Este medio contiene una gran cantidad de fosfato y está formulado para su uso en una atmósfera de dióxido de carbono 5%.

C. Preparación de las diluciones de nanocompuestos (BaTiO₃@quit):

Se prepararon los nanocompuestos en 5 concentraciones diferentes de 0, 10ug/ml, 20 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml, realizando las pesadas en una balanza analítica Mettler Toledo, de nanocompuestos (BaTiO₃@quit), y se sometieron a diluciones en agua ultrapura (Mili-Q); posteriormente se colocaron a la acción de un ultrasonicador Branson 2510 por 30 minutos.

D. Ensayo de viabilidad celular MTT:

Este ensayo tiene por objetivo determinar el efecto citotóxico del compuesto en este caso, los nanocompuestos (BaTiO₃@quit) sobre líneas celulares tumorales o cultivos de células normales.

Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5 difeniltetrazólico (MTT), que tiene una coloración amarilla, a su forma insoluble formazan (compuesto de color púrpura), cuyas estructuras se muestran en las Figuras 1 y 2. Esta acción es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de formazan formado es el indicador de viabilidad celular en este ensayo (Gupta & Perumal, 2014).

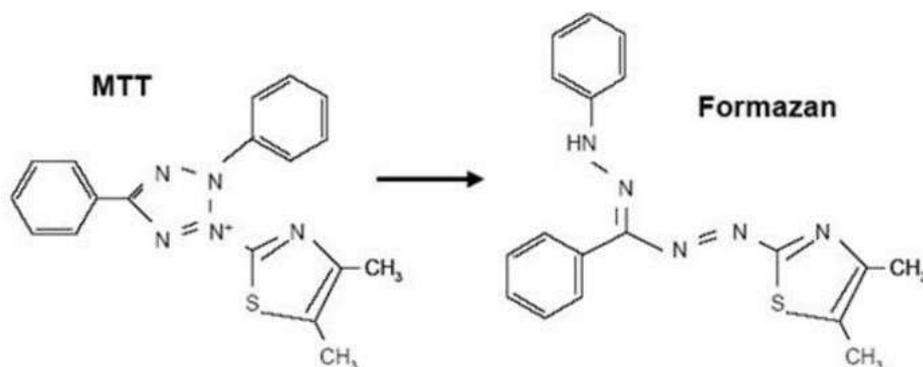


Figura 1. Reducción del MTT a Formazan por la acción de una enzima mitocondrial.

Los Cristales de formazan formados quedan retenidos por la célula. El formazan se disuelve en isopropanol y luego es cuantificado midiendo la absorción en un espectrofotómetro a 540 [nm].

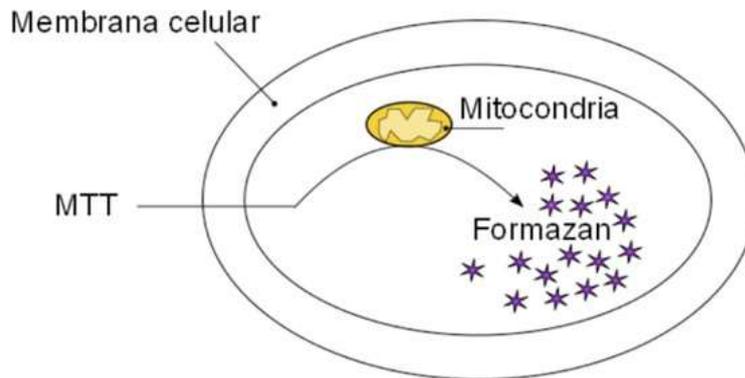


Figura 2. Diagrama principio MTT.

Preparación del reactivo MTT.

Se prepararon 0.2 mg/mL de la sal de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) disuelta en medio DMEM suplementado. La sal de MTT se disolvió por agitación hasta observar completamente disuelto el reactivo.

El medio de cultivo fue aspirado con ayuda de una micropipeta y se agregó 100 μ L de MTT a cada pocillo de cultivo; se dejó incubar de 24 – 72h a 37 $^{\circ}$ C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Durante ese lapso, se iba supervisando en el microscopio para monitorear la formación de los cristales de formazán, esto es, cuando se forme un precipitado de color morado, una vez que esto sucedió, el formazán fue disuelto al eliminar el medio con la sal de MTT y agregar 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO). La placa con los tratamientos, fueron colocados en el espectrofotómetro, previamente se agitó por 10 segundos y se hizo la lectura de absorbancia (densidad óptica) a 540 nm.

Análisis estadístico. Una vez que se obtuvieron las lecturas de absorbancia se procede a calcular la viabilidad celular

E. Ensayos de exposición a los nanocompuestos de Titanato de bario recubiertas con quitosano (BaTiO₃@quit):

La exposición a los nanocompuestos de BaTiO₃@quit se realizó en placas de cultivo por 96 pocillos con un volumen final de 500ul en los diferentes medios biológicos, con un inóculo inicial de 1x10⁹ células/mL. Las concentraciones de los NPs fueron en el rango de 0 a 100 ug/mL. Se colocaron por triplicado células sin exposición a nanocompuestos de BaTiO₃@quit (C-) y cada una de las concentraciones de nanocompuestos de BaTiO₃@quit que se evaluaron. Todos los tratamientos fueron incubados a 37°C por 72 h. En este tiempo de exposición se tomaron muestras en diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). La viabilidad celular se midió en porcentaje por el conteo de células (técnica de Milles-Misra) con la determinación de la relación del número de células expuestas a NPs (células/mL) entre el número de células sin exposición a NP (Ec. 1).

$$Viabilidad\ celular = \frac{\text{Número de células expuestas a NPs}}{\text{Número de células sin exposición a NPs}} * 100 \text{ Ec.1}$$

Colocación de la muestra en la cámara de Neubauer.

Se colocó un cubreobjetos en la superficie central de la cámara de Neubauer. Con una micropipeta se tomó 10 µL de la muestra de los tratamientos y se pipeteó cuidadosamente en uno de los extremos del cubreobjetos evitando vaciar exceso de muestra. Se evitó la presencia de burbujas para que no haya dificultades a la hora de la lectura. Se realizó el conteo por exclusión de azul tripano, este método cuantifica el número de células que no se tiñen por el colorante y este se realiza al tomar 10 µL de la muestra de los tratamientos y 10 µL de azul de tripano en un tubo de Eppendorf y posteriormente llevar 10 µL a la cámara de Neubauer. Este método aseguró un número real de células viables.

Se colocó la cámara de Neubauer en el microscopio, y se procedió a enfocar utilizando el binocular y los ajustes. Una vez que las células ya estuvieron enfocadas, esto es, que se vean nítidas, se procedió a realizar el conteo en cada uno de los cuadros que son en total: A, B, C, y D (Ver Anexo 4). Cuando se obtuvo la cantidad de células contabilizadas en los cuatro cuadros se determinó la viabilidad celular.

F. Evaluación de la genotoxicidad en linfocitos:

Para este proceso se utilizaron linfocitos humanos, extraídos de muestra sanguínea de un donador de sexo masculino, de 29 años de edad en buen estado de salud general y sin enfermedades graves o infecciones activas que puedan afectar la viabilidad de los linfocitos.

Para el cultivo de los linfocitos, previamente se limpió, desinfectó y esterilizó la Cabina de Seguridad Biológica (CSB) aplicando desinfectantes adecuados y manteniendo encendida por 15 minutos la lámpara de UV de la CSB.

En la CSB se dispensó 10mL del medio RPMI 1640 previamente descongelado, en frascos para cultivo celular (Falcon flask glass). Para los tratamientos se consideró las concentraciones señaladas en el Cuadro 01. Se adicionó 400ul de Fitohemaglutinina (PHA). Se agregó a cada frasco 2ml de Suero Bovino Fetal (SBF).

Se adicionó al frasco de cultivo 2 ml de la muestra, es decir, más o menos 20 gotas de sangre total, por las paredes (lado plano) del frasco.

Se mezcló suavemente y se cerró el frasco de cultivo y se llevó a incubar en estufa de CO₂ a 37°C por 72 horas.

Cosecha De La Muestra: Cumplidas las 72 horas se retiraron los frascos de cultivo de la estufa y trasvasaron a tubos de centrifuga cónico con tapa rosca. Se agregó 200 µl de Colcemid, cerramos

cada tubo. Mezclamos suavemente varias veces por inversión. Se incubó en estufa a 37°C por 30 minutos. Se centrifugó a 1000 RPM por 10 min.

Luego utilizando una pipeta Pasteur descartable estéril, eliminamos el sobrenadante y homogenizamos el sedimento o pellet.

Agregamos 6 mL de Cloruro de Potasio KCl - 0.075M, agitamos bien el Pellet usando la pipeta Pasteur. La solución de KCl estuvo a 37°C. Colocamos los tubos a 37°C durante 25 minutos.

Retiramos los tubos de la estufa y centrifugamos a 1600 rpm por 5 minutos. Eliminamos el sobrenadante y agregamos 5 mL de fijador Carnoy (recién preparado), y dejamos a temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugamos a 1000 rpm por 10 min. Utilizando una pipeta Pasteur eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet con 6 mL de Carnoy.

Eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet usando una pipeta Pasteur. Adicionamos 5 ml de fijador y nuevamente centrifugamos a 1000 rpm. Se repitió este paso 3 veces a manera de lavados con fijador.

Finalmente, resuspendimos los pellets obtenidos en 2 ml de fijador hasta obtener una suspensión opalescente.

Coloración: Para observar los cromosomas en el cariotipador se usó una gota de cada muestra en 10 láminas diferentes, se coloreó con una solución de Giemsa 4 ml de solución stock y 23 mL de buffer PBS. Se llevó a observar al cariotipador con la evaluación y elaboración de los respectivos cariotipos según sea la concentración trabajada.

Tratamientos	Control negativo	Control positivo	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5
	0 ug/ml de BaTiO ₃	30ug/ml de Kr ₂ Cr ₂ O	5 ug/ml de BaTiO ₃	10 ug/ml de BaTiO ₃	20 ug/ml de BaTiO ₃	50 ug/ml de BaTiO ₃	100 ug/ml de BaTiO ₃

Cuadro 1: Tratamientos con las concentraciones de nanocompuestos (BaTiO₃@quit) en 10ml de medio RPMI para cultivo de linfocitos.

G. Plan de análisis de datos:

Los datos se expresaron como media \pm error estándar. Se utilizó el test de *Kruskal-Wallis* y *Mann-Whitney* para evaluar la existencia de diferencias significativas entre grupos. La existencia de posibles relaciones de dosis – respuesta se evaluó mediante el coeficiente de correlación de *Spearman*. Se consideró como significativo un $p < 0.05$.

El registro de datos que están consignados en las correspondientes hojas de recolección de datos y fueron procesados utilizando el paquete estadístico SPSS V 25.0.

H. Aspectos éticos:

Los datos recolectados fueron tratados respetando el principio de confidencialidad. Cada actividad realizada para la ejecución del presente trabajo, se consideraron los principios de bioseguridad, dado que es un estudio experimental.

I. Presupuesto:

El presente estudio de investigación fue financiado por el proyecto 072-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV.

4. Resultados

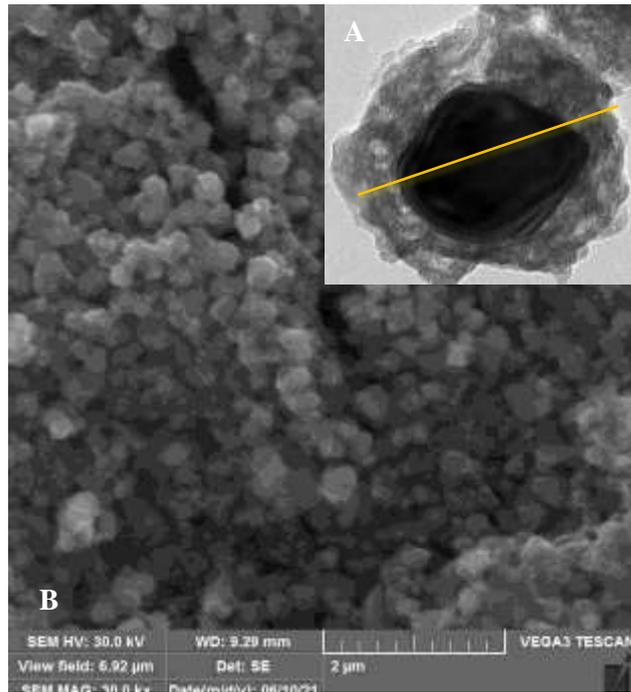


Figura 3. Imágenes por microscopía electrónica de BaTiO₃@quit. En A, Imagen TEM - Talos Thermo Fisher FC200-. En B, Imagen SEM - TESCAN VEGA 3 LMU

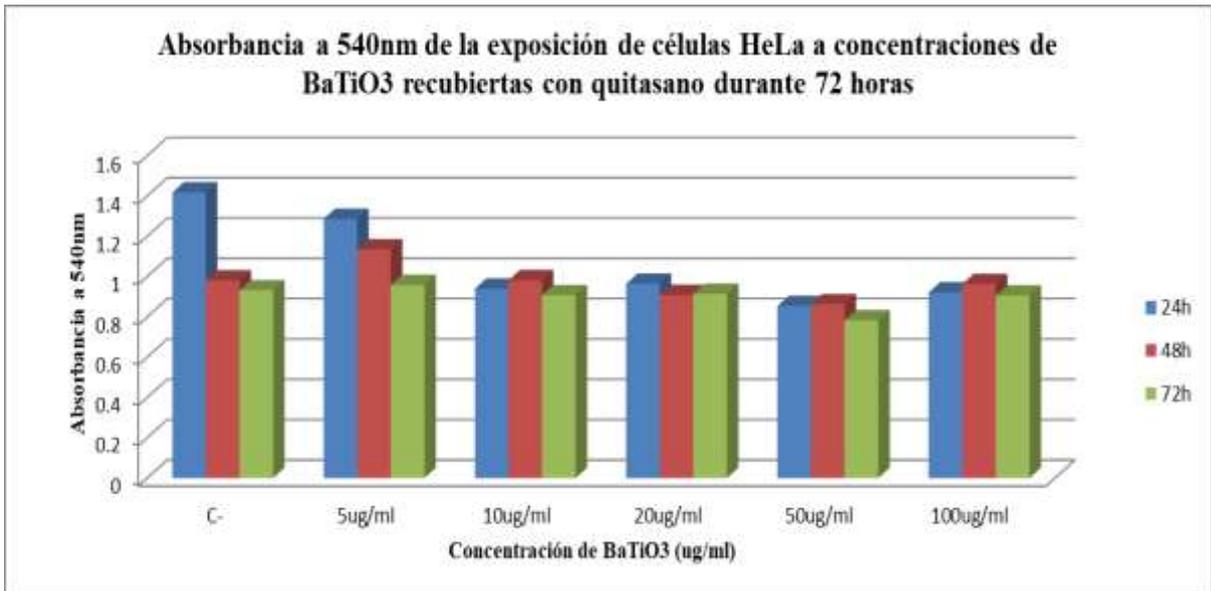


Figura 4. Resultado de la absorbancia a 540nm de la exposición de células HeLa a tratamientos de 0ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml de BaTiO₃@quit durante 24, 48 y 72 horas.

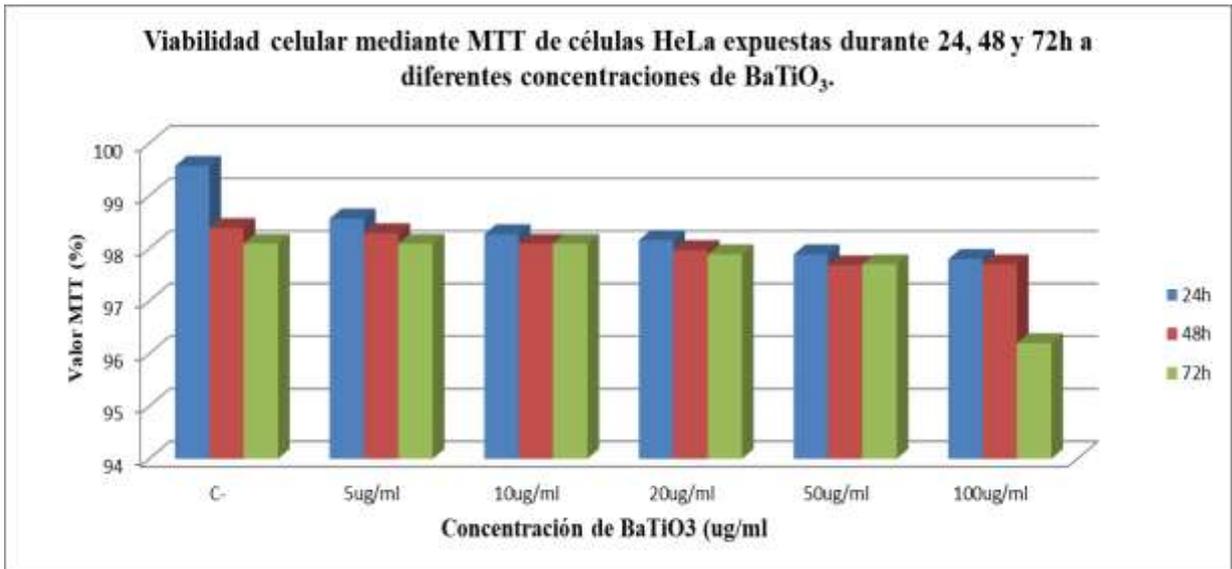


Figura 5. A: Viabilidad celular mediante MTT de células HeLa expuestas durante 24, 48 y 72h a diferentes concentraciones (0 ug/ml, 10 ug/ml, 20 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml) de BaTiO₃@quit.

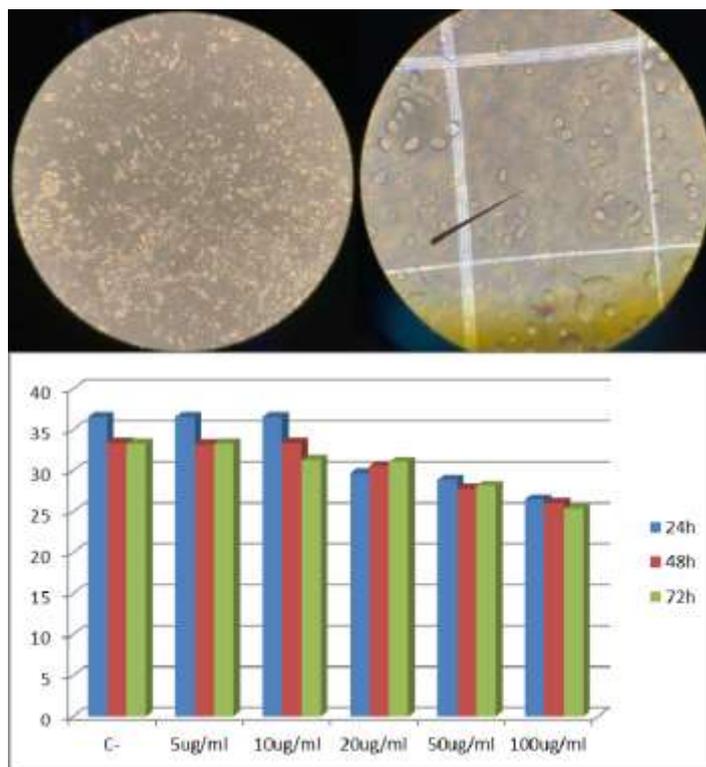


Figura 6. Viabilidad celular de las células HeLa, evaluado por la técnica de Milles-Misra, expuestas durante 24, 48 y 72h a diferentes concentraciones (0 ug/ml, 10 ug/ml, 20 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml) de BaTiO₃@quit. Los datos se proporcionan como media \pm DE de tres experimentos independientes (n = 3).

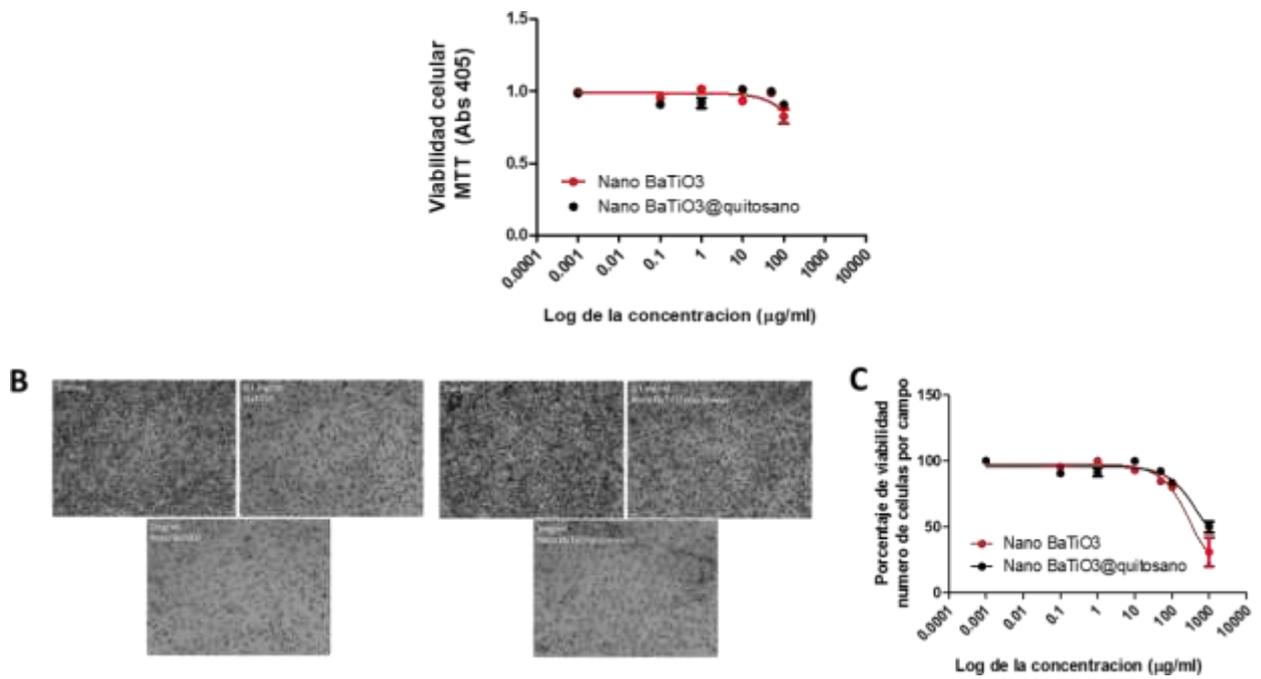


Figura 7. Viabilidad celular mediante MTT de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de BaTiO₃ y BaTiO₃@quit.

En A, una curva para concentraciones crecientes de BaTiO₃ de 0 a 0,1 mg/ml, sugiere un DL50 de 0,681 mg/ml. En B, microfotografías de células expuestas a BaTiO₃. En C una curva para concentraciones crecientes de BaTiO₃ de 0 a 0,1 mg/ml, sugiere un DL50 de no ajustable. Las curvas son 3 experimentos independientes, cada uno con 3 réplicas, los puntos son promedio ± SEM

De la exposición de nanopartículas de BaTiO₃@quit en linfocitos:

Evaluación	Control negativo	Control positivo	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5
	0 ug/ml de BaTiO ₃ @quit	30ug/ml de Kr ₂ Cr ₂ O	5 ug/ml de BaTiO ₃ @quit	10 ug/ml de BaTiO ₃ @quit	20 ug/ml de BaTiO ₃ @quit	50 ug/ml de BaTiO ₃ @quit	100 ug/ml de BaTiO ₃ @quit
Cariotipo	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓

Leyenda:

- ✓ Cariotipo normal
- X No se observaron metafases

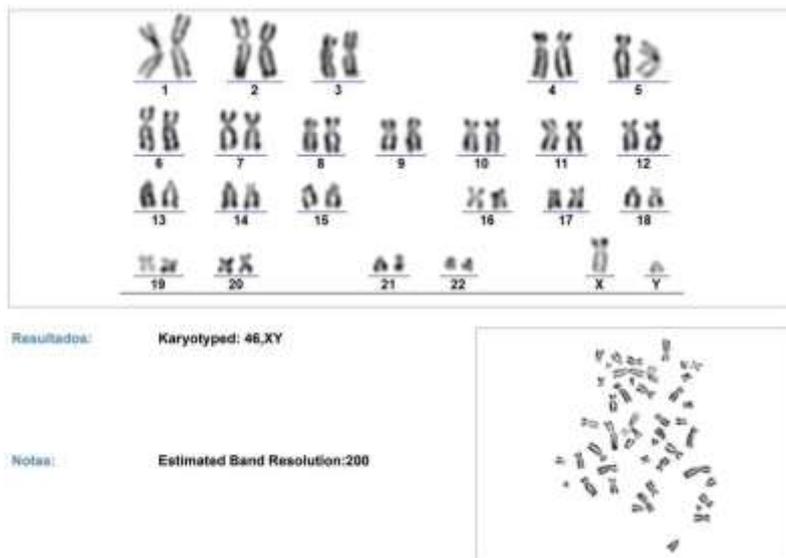
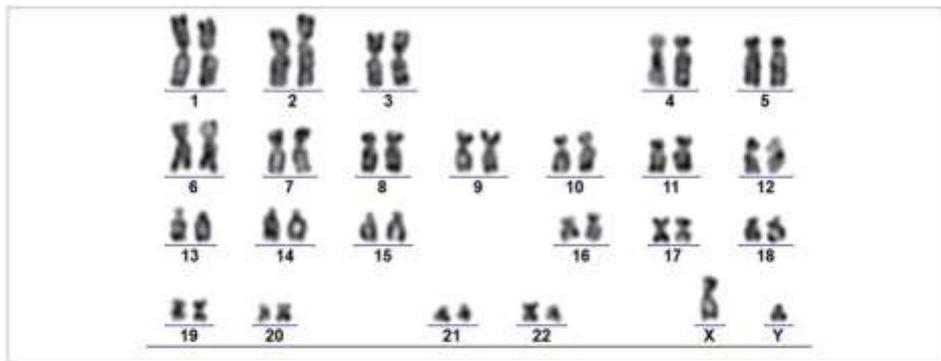


Figura 8. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del control negativo del trabajo realizado.

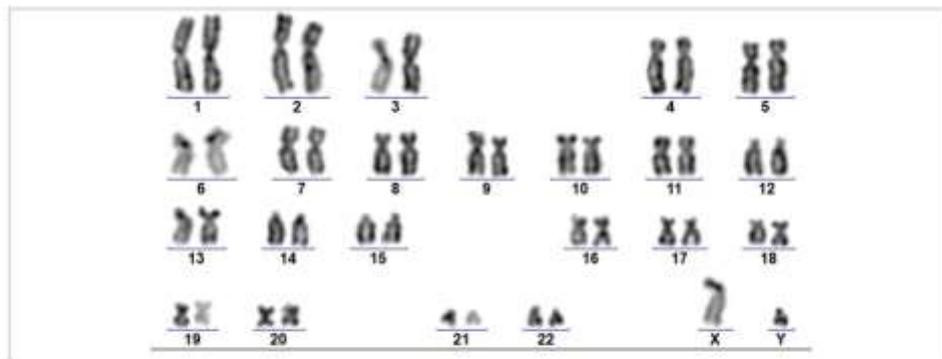


Resultados: Karyotyped: 46,XY

Notas: Estimated Band Resolution:200



Figura 9. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del tratamiento 5 ug/ml de BaTiO₃@quit.



Resultados: Karyotyped: 46,XY

Notas: Estimated Band Resolution:250



Figura 10. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del tratamiento 10 ug/ml de BaTiO₃@quit.

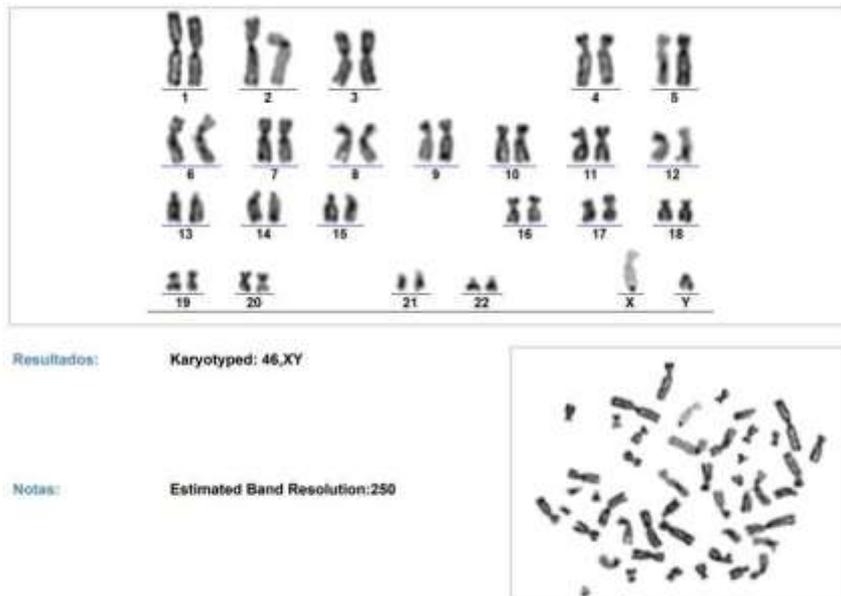


Figura 11. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del tratamiento 20 ug/ml de BaTiO₃@quit.

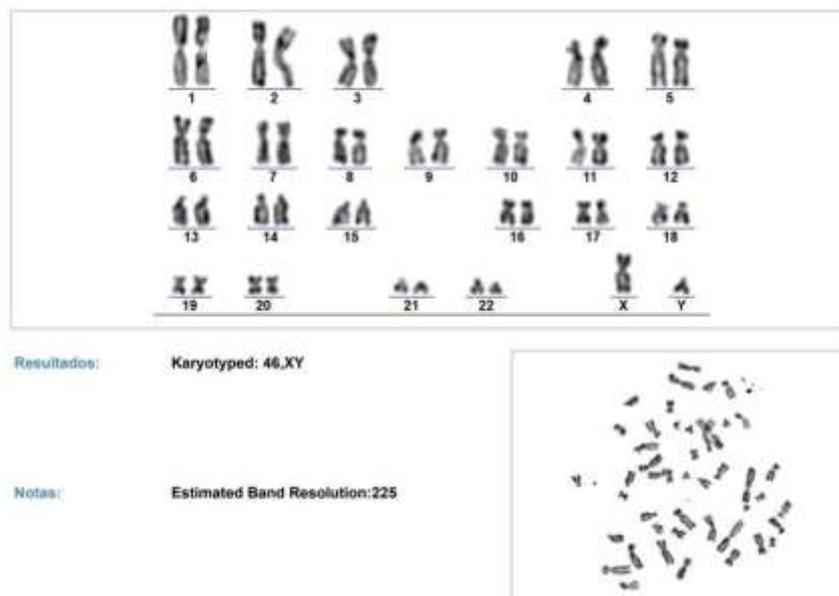


Figura 12. Cariotipo humano 46, XY obtenidos del tratamiento 50 ug/ml de BaTiO₃@quit.

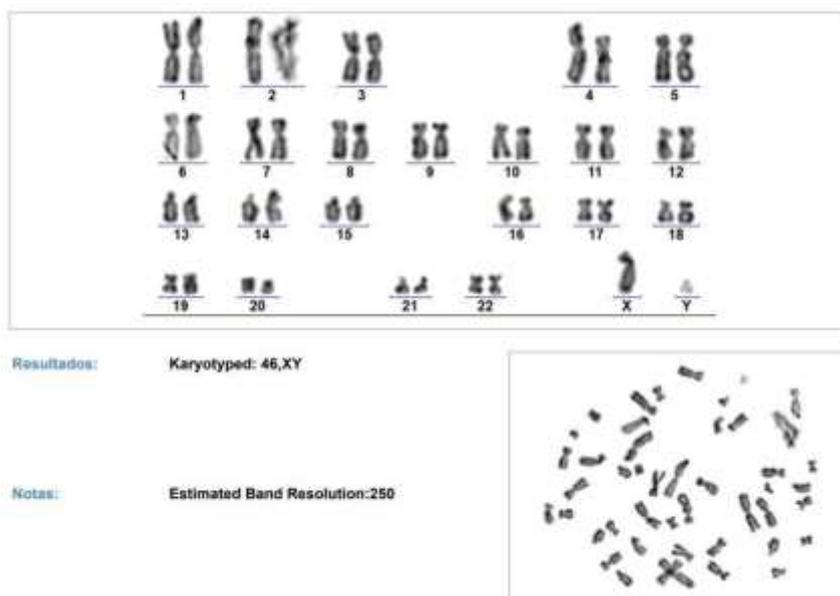


Figura 13. Cariotipo humano 46, XY obtenido del tratamiento 100 ug/ml de BaTiO₃@quit.

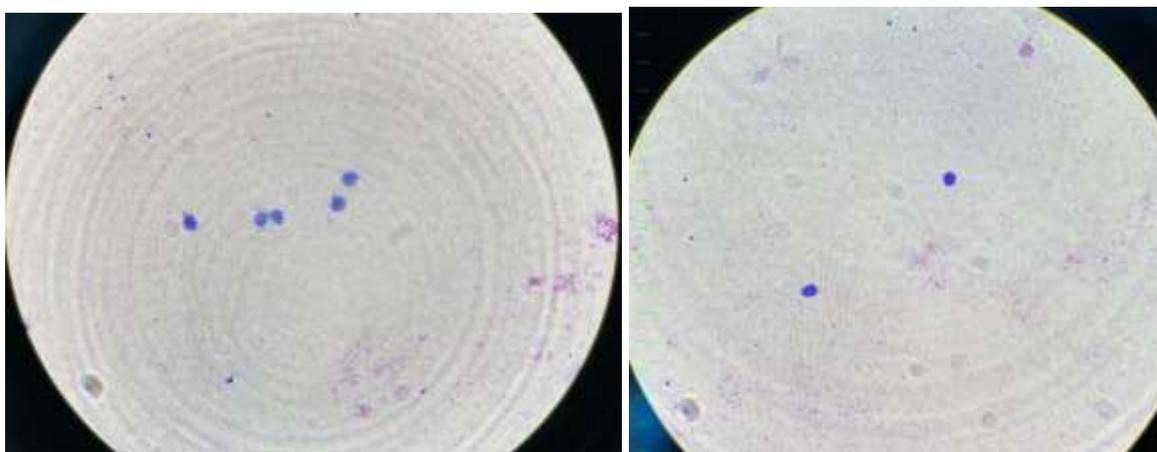


Figura 14. Observación de la no replicación celular en el tratamiento positivo 30ug/ml de Kr₂Cr₂O.

5. Discusión

Las nanopartículas (NPs) por su composición, tamaño, durabilidad en el organismo, transporte, pueden ser causantes de efectos adversos a la salud humana (Xiong et al., 2022). Por lo tanto, en este proyecto se estudió el efecto que pueden ocasionar estos nanomateriales a la línea celular HeLa y en linfocitos humanos, mediante ensayos de viabilidad celular por MTT y aberraciones cromosómicas debido que es conocido que los diferentes mecanismos químico-celulares en la fase de la proliferación celular el material genético juega un papel importante, en la trasmisión de información. Errores en el ciclo celular conllevaría a enfermedades u otras anomalías. Por tanto, su conservación es importante por lo que la evaluación de la conservación íntegra de los cromosomas es de vital importancia por ello su evaluación in vitro (Shukla et al., 2021).

En la Figura 3, se observan las nanopartículas de BaTiO₃@quit tomadas a través del microscopio electrónico (Anexo 1), lo cual nos cerciora la síntesis de estas nanopartículas que serán posteriormente utilizadas en experimentos de evaluación de la viabilidad celular, donde se enfrentarán a las células HeLa (Mohammed et al., 2017).

En la figura 4 y 5; con respecto a la viabilidad celular evaluada mediante el ensayo MTT se puede observar los picos de absorbancia a longitud de onda de 540nm y el porcentaje de MTT. En el control negativo, se observó una Ab de 1.4 y 100% de MTT, al agregar los nanocompuestos de BaTiO₃@quit a concentraciones de 5ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml, 50ug/ml y 100ug/ml tenemos una Ab entre 0.9 y 0.87 con 97% de MTT aproximadamente en estos cinco tratamientos. Lo que indica que no hay diferencia significativa entre la viabilidad celular en estas cinco concentraciones. A su vez, en la figura 4 se puede observar que a la concentración máxima de 100ug/ml de NPs de BaTiO₃@quit no hay diferencias significativas en la viabilidad celular teniendo como resultados absorbancias entre 0.9 y de 97 % de MTT en estas NPs lo que nos permite

deducir que el quitosano no interfiere en la viabilidad celular. Matalqah et al., 2020 reportaron que el quitosano por sus propiedades fisicoquímicas actúa como un protector de drogas por lo tanto las nanopartículas, deberían tener el efecto correcto. En la presente investigación lo que podemos deducir es que las NPs de BaTiO₃@quit no presentan citotoxicidad a las concentraciones evaluadas. A la concentración de 100ug/ml de las NPS de BaTiO₃@quit las Ab y el % de MTT son relativamente diferentes deduciendo que a concentraciones elevadas de NP de BaTiO₃@quit la viabilidad es disminuida. Pero hay que considerar que la absorbancia se ve disminuida no necesariamente por la disminución de la viabilidad celular; si no porque las nanopartículas de BaTiO₃@quit podrían interferir en la absorbancia, esto lo demostraron (Liu et al.,1997; Ghasemi et al.,2021). Resultados similares de citotoxicidad lo reportan (Ahamed et al., 2020) quienes mencionan que a concentraciones de 5 – 10 ug/ml NPs de BaTiO₃@quit no existe una diferencia significativa en la disminución de la viabilidad celular, pero si reportaron que a dosis entre los 25-200 ug/ml la viabilidad celular es dependiente de la concentración y el tiempo de dichas NPs, otros autores como (Yoon et al., 2020) obtuvieron resultados similares demostrando que las NPs de BaTiO₃ presentaron citocompatibilidad, acumulándose en el citosol de estas células cancerosas y no ocasionaron efecto citotóxico. Por el contrario, reportaron un efecto antitumoral por la respuesta agonista con el tratamiento TTfields. Debido a la acumulación de las NPs en el citosol, estas responden a fuerzas dielectroforéticas y ayuda a la eliminación de estas células cancerosas, esto es debido a que las NPs de BaTiO₃ presentan una alta constante dieléctrica y propiedades ferro - piezoeléctricas y piroeléctricas (Jiang et al., 2019). Otros estudios anticáncer lo menciona (Marino et al., 2019) quienes usaron nanopartículas de BaTiO₃ marcado con un anticuerpo contra el receptor de transferrina (TfR) la cual mediante el uso del ultrasonido permitió reducir significativamente in vitro la proliferación de células de glioblastoma. En otros estudios de ausencia de citotoxicidad con otro tipo de NPs, se reportaron que las NPs de oro mostraron actividad anticancerígena en la línea celular de cáncer de hígado Hep2 a su vez se demostró un efecto no tóxico en la línea celular VERO (Priya M R & Iyer, 2020).

En la figura 5, se observa la viabilidad celular mediante la evaluación del % de MTT luego de los diferentes tiempos de exposición evaluadas a las 24, 48 y 72 horas se puede concluir que en la exposición de las nanopartículas de BaTiO₃@quit en cultivo celular, no presentan diferencias significativas en tiempo ni dosis, lo cual indica que a estas concentraciones de BaTiO₃@quit. no genera cambio en la viabilidad celular ni en el aumento de MTT con respecto a las nanopartículas de BaTiO₃@quit. Esto indica que las nanopartículas de BaTiO₃ no tienen efecto citotóxico. Cabe resaltar que al estudiar la viabilidad celular basándonos en los valores de la absorbancia y los valores de MTT en el ensayo, podemos encontrar sesgos no deseados como por ejemplo la concentración de las nanopartículas que puede dar un sesgo no deseado por la interferencia en la absorbancia de estas partículas (de la Fuente-Jiménez et al., 2023; López et al., 2020).

En las figuras 6 y 7 se aprecia que las NPs de BaTiO₃@quit no generan cambios estructurales en la forma de las células HeLa; a su vez que no se aprecian diferencias significativas en la viabilidad celular con respecto al control negativo en el conteo de las células viables mediante la tinción con azul de tripano y la técnica de May-Grunwald y Giemsa. Sin embargo, a partir de 100ug/ml se puede apreciar una ligera disminución de la viabilidad celular que no es significativa (Figura 6 y 7). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Ahamed et al., 2020. Otras investigaciones con respecto a viabilidad celular fueron evaluadas con NPs de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION) reportando que a concentraciones de 60ng/ml y con tiempo de exposición de 48 horas se observa disminución de la viabilidad celular (Jarockyte et al., 2016).

En el ensayo de aberraciones cromosómicas a concentraciones de 0, 10, 20, 50 y 100 ug/ml de BaTiO₃@quit en linfocitos humanos no se apreciaron cambios morfológicos en los cromosomas humanos comparados con el control negativo (Figura 8-13). Sin embargo, en el control positivo no se pudo evaluar los cromosomas por que el compuesto químico de Kr₂Cr₂O a una concentración de 30ug/ml inhibió la división celular y provocó la inviabilidad a la mayoría de las células en vitro impidiendo observar

metafases celulares. Estos resultados que demuestran cromosomas intactos tanto en su morfología y cantidad, nos permiten inferir que los efectos citotóxicos y genotóxicos podrían ser nulos. Resultados similares reportaron Pérez-Amor et al., 2022; quienes mencionan que no encontraron daño a nivel de la estructura de los cromosomas por las NPs de oro que utilizaron en su estudio. Para un mayor análisis se recomendaría en próximas investigaciones la evaluación de micro deleciones entre genes o locus para evaluar el cambio o pérdida de material genético entre los locus de los cromosomas (Bridge, 2014).

Estudios de NPs que ocasionaron aberraciones cromosómicas, inestabilidad genética y deleciones de ADN lo reportaron Trouiller et al., 2009 y Wen et al., 2017; quienes trabajaron con NPs de Ag y NPs TiO₂ en células de médula ósea de rata las cuales presentaron aberraciones cromosómicas, micronúcleos y deleciones; adicionales estudios que reportaron efectos similares fueron publicados por Ahmed et al., 2017; Ali et al., 2022.

En estudios donde evaluaron viabilidad celular con la línea celular HepG2 reportaron que después de la exposición a NP de TiO₂ la viabilidad se ve afectada con respecto al tiempo y la dosis siendo la concentración de 200ug/ml durante 24 horas la que disminuye la viabilidad celular (Bessa et al., 2017). Estos resultados nos dan entender que la citotoxicidad y genotoxicidad son dependientes de las concentraciones, tiempo de exposición y el tipo de NPs con la cual se esté trabajando así se demuestra en esta tesis, por ejemplo, que las NPS de TiO₂ pueden influir en la cantidad de daño al ADN observado en las células HepG2 si son expuestos durante períodos largos de exposición. (Bessa et al., 2017; Jarockyte et al., 2016; Yoon et al., 2020).

Además, se ha demostrado en diversas investigaciones que los compuestos de materiales piezoeléctricos como las NPs de BaTiO₃ han mejorado las propiedades eléctricas, aumentan la tasa del crecimiento celular en osteoblastos y presentan poco efecto citotóxico en fibroblastos

L929 en consecuencia, los diferentes trabajos de investigación sobre las NPs de BaTiO₃ en nanomedicina la sitúan como potentes candidatas para aplicaciones biomédicas y en bioelectrónica portátil para el tratamiento de diversas dolencias y enfermedades (Sood et al., 2023). Todo esto es porque se ha demostrado en diversas investigaciones que los compuestos de materiales piezoeléctricos como las NPs de BaTiO₃ mejoran las propiedades eléctricas, aumentan la tasa del crecimiento celular en osteoblastos, con poco nulo efecto citotóxico en fibroblastos L929, aceleran el desarrollo celular por lo tanto mejoran la reparación ósea (Jacob et al., 2018; Swain et al., 2022; Manohar et al., 2019; Acosta et al., 2017; Das et al., 2021 y Yu et al., 2011).

6. Recomendaciones

- 6.1** Evaluar la concentración mínima de Dicromato de Potasio que no inhiba el crecimiento y división celular in vitro para poder así observar las aberraciones cromosómicas que pudiesen darse.
- 6.2** Incrementar el muestreo evaluando otras absorbancias con el espectrofotómetro para disminuir el sesgo de la absorbancia de las nanopartículas.
- 6.3** Realizar evaluación de micro delecciones entre genes o locus para evaluar el cambio o pérdida de material genético entre los locus de los cromosomas.

7. Conclusiones

- 7.1** Con la lectura de absorbancias en las diferentes concentraciones de nanopartículas de BaTiO₃@quit en cultivos de células HeLa, podemos concluir que no existe diferencias significativas en los tratamientos frente al control negativo, por lo tanto, dichas nanopartículas son biocompatibles a nivel de este cultivo celular.
- 7.2** Se determinó que a la concentración de 100ug/ml de BaTiO₃@quit, se empieza a observar que la viabilidad de células HeLa disminuye.
- 7.3** No se logró determinar la DL50 de las nanopartículas de BaTiO₃@quit, se puede inferir que las concentraciones trabajadas no generaron citotoxicidad.
- 7.4** Con la obtención de cariotipos normales (46, XY) en las diferentes concentraciones de BaTiO₃@quit, se concluye que dichos nanocompuestos no alteran el ciclo celular ni tienen efecto genotóxico sobre los linfocitos humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta M., Novak N., Rojas V., Patel S., Vaish R., Koruza J., Rossetti G.A., Rodel J. BaTiO₃-based piezoelectrics: Fundamentals, current status, and perspectives. *Appl. Phys. Rev.* 2017; 4:041305. doi: 10.1063/1.4990046.

Ahamed, M., Akhtar, M. J., Khan, M. A. M., Alhadlaq, H. A., & Alshamsan, A. (2020). Barium titanate (BaTiO₃) nanoparticles exert cytotoxicity through oxidative stress in human lung carcinoma (A549) cells. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10(11), 2309. <https://doi.org/10.3390/nano10112309>

Ahmed, B., Dwivedi, S., Abdin, M. Z., Azam, A., Al-Shaeri, M., Khan, M. S., Saquib, Q., Al-Khedhairy, A. A., & Musarrat, J. (2017). Mitochondrial and Chromosomal Damage Induced by Oxidative Stress in Zn²⁺ Ions, ZnO-Bulk and ZnO-NPs treated *Allium cepa* roots. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/srep40685>

Albertini, R. J.; Anderson, D.; Douglas, G. R.; Hagmar, L.; Hemminki, K.; Merlo, F.; Natarajan, A. T.; Norppa, H.; Shuker, D. E.; Tice, R.; et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat. Res.* 2000, 463, 111-172.

Ali, S. A., Gooda, S. M., Aboul Naser, A. F., Younis, E. A., Hamed, M. A., Ahmed, Y. R., Farghaly, A. A., Khalil, W. K. B., & Rizk, M. Z. (2022). Chromosomal aberrations, DNA damage, and biochemical disturbances induced by silver nanoparticles in mice: role of particle size and natural compounds treatment. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 27(4), 349-360. <https://doi.org/10.1080/1354750x.2022.2046856>

Aye, M.; Di Giorgio, C.; Mekaouche, M.; Steinberg, J.-G.; Brerro-Saby, C.; Barthélémy, P.; De Méo, M.; Jammes, Y. Genotoxicity of intraperitoneal injection of lipoamphiphile CdSe/ZnS quantum dots in rats. *Mutat. Res.* 2013, 758, 48-55.

Bessa, M. J., Costa, C., Reinoso, J., Pereira, C., Fraga, S., Fernández, J., Bañares, M. A., & Teixeira, J. P. (2017). Moving into advanced nanomaterials. Toxicity of rutile TiO₂ nanoparticles immobilized in nanokaolin nanocomposites on HepG2 cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 316, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.12.018>

Bridge, J. A. (2014). The role of cytogenetics and molecular diagnostics in the diagnosis of soft-tissue tumors. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 27, S80-S97. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.179>

Das A., Dobbidi P. Impedance Spectroscopy and ac Conductivity in Ba_{0.5}Sr_{0.5}TiO₃-Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ Ceramic Composites: An Electrical Approach to Unveil Biocomposites. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2021;7:2296- 2308. doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c00009.

De la Fuente-Jiménez, J. L., Rodríguez-Rivas, C. I., Mitre-Aguilar, I. B., Torres-Copado, A., García-López, E. A., Herrera-Celis, J., Arvizu-Espinosa, M. G., Garza-Navarro, M. A., Arriaga, L. G., García, J. L., García-Gutiérrez, D. I., Dehesa, A. Z., Sharma, A., & Oza, G. (2023). A comparative and critical analysis for in vitro cytotoxic evaluation of magneto-crystalline zinc ferrite nanoparticles using MTT, crystal Violet, LDH, and apoptosis assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12860. <https://doi.org/10.3390/ijms241612860>

Doak, S. H.; Manshian, B.; Jenkins, G. J. S.; Singh, N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat. Res.* 2012, 745, 104-111.

Egusquiaguirre, S. P., Igartua, M., Hernández, R. M., & Pedraz, J. L. (2012). Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 14(2), 83-93. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0766-6>

Fu-Cheng Kao, Hsin-Hsuan Ho, Ping-Yeh Chiu, Ming-Kai Hsieh, Jen-Chung Liao, Po-Liang Lai, Yu-Fen Huang, Min-Yan Dong, Tsung-Ting Tsai & Zong-Hong Lin. Self-assisted wound healing using piezoelectric and triboelectric nanogenerators, *Science and Technology of Advanced Materials*, 2022. 23:1, 1-16, DOI: 10.1080/14686996.2021.2015249

Gao, X., Du, C., Zhuang, Z., & Chen, W. Carbon quantum dot-based nanoprobe for metal ion detection. *Journal of Materials Chemistry C*, 2016. 4(29), 6927-6945. doi:10.1039/c6tc02055k

Gupta, U.; Perumal, O. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*; 1.a ed.; Elsevier, 2014.

Habib A., Stelzer N., Augerer P., Haubner R. Effect of temperature and time on solvothermal synthesis of tetragonal BaTiO₃. 2011.

Hennes, C.; Batke, M.; Bomann, W.; Duhayon, S.; Kosemund, K.; Politano, V.; Stinchcombe, S.; Doe, J. Incorporating potency into EU classification for carcinogenicity and reproductive toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2014, 70, 457-467.

Huang, J.; Zhong, X.; Wang, L.; Yang, L. y Mao, H.: "Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles". *Theranostics*, 2012, 2(1):86-102.

Huang, S.; Chueh, P. J.; Lin, Y. W.; Shih, T. S.; Chuang, S. M. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 241, 182-194.

Hussain M, Tangen C, Higano C, et al. Absolute prostate specific antigen value after androgen deprivation is a strong independent predictor of survival in new metastatic prostate cancer data from Southwest Oncology Group Trial 9346 (INT-0162). *J Clin Oncol.* 2013; 24(6):3984-3990.

Issa, B.; Obaidat, I.M.; Albiss, B.A. y Haik, Y.: "Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications". *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(11):21266-21305.

Jarockyte, G., Daugelaite, E., Stasys, M., Statkute, U., Poderys, V., Tseng, T.-C., Hsu, S.-H., Karabanovas, V., & Rotomskis, R. (2016). Accumulation and toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cells and experimental animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1193. <https://doi.org/10.3390/ijms17081193>

Jiang, B., Iocozzia, J., Zhao, L., Zhang, H., Harn, Y.-W., Chen, Y., & Lin, Z. (2019). Barium titanate at the nanoscale: controlled synthesis and dielectric and ferroelectric properties. *Chemical Society Reviews*, 48(4), 1194-1228. <https://doi.org/10.1039/c8cs00583d>

Jiang, S., Lin, Y., Yao, H., Yang, C., Zhang, L., Luo, B., Lei, Z., Cao, L., Lin, N., Liu, X., Lin, Z., & He, C. (2018). The role of unfolded protein response and ER-phagy in quantum dots-induced nephrotoxicity: an in vitro and in vivo study. *Archives of toxicology*, 92(4), 1421-1434. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2169-0>

Jiang, W.; Mashayekhi, H.; Xing, B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ. Pollut.* 2009, 157, 1619-1625.
Karlsson, H.; Di Bucchianico, S.; Collins, A.; Dusinska, M. Can the Comet Assay be Used Reliably to Detect Nanoparticle-Induced Genotoxicity? *Environ. Mol. Mutagen.* 2015, 56, 82-96.

Lan, L., Yao, Y., Ping, J., & Ying, Y. (2017). Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection. *Biosensors & bioelectronics*, 91, 504-514. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.007>

López, I., Balderas-Rentería, I., Gómez, I., González-Santiago, O., González-Barranco, P., Garza-Ocañas, L., & Ramírez-Cabrera, M. A. (2020). MTT Vs WST-1, efficiency, cost, time, and waste generation: evaluating the silver

nanoparticles cytotoxicity. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina*, 3(1), 3-12. <https://rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/article/view/354>

Marino, A., Almici, E., Migliorin, S., Tapeinos, C., Battaglini, M., Cappello, V., Marchetti, M., de Vito, G., Cicchi, R., Pavone, F. S., & Ciofani, G. (2019). Piezoelectric barium titanate nanostimulators for the treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of Colloid and Interface Science*, 538, 449-461. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.12.014>

Martínez-Carmona M., Lozano D., Colilla M., Vallet-Regí M., Lectinconjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment, *Acta Biomater.* 65 (2018) 393-404.

Matalqah, S. M., Aiedeh, K., Mhaidat, N. M., Alzoubi, K. H., Bustanji, Y., & Hamad, I. (2020). Chitosan nanoparticles as a novel drug delivery system: A review article. *Current Drug Targets*, 21(15), 1613-1624. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200711172536>

Méndez-Rojas, Miguel, Garcia de la Rosa, Luis, Flood-Garibay, Jessica, Veloz Castillo, María. *Investigación y Desarrollo de Nanomateriales para Aplicaciones Biomédicas*. 1. 2018

Missaoui, Robert D. Arnold, Brian S. Cummings, Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know, *Chemico-Biological Interactions*, Volume 295, 2018, Pages 1-12, ISSN 0009-2797, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.015>.

Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2017 Nov 20;9(4):53. doi: 10.3390/pharmaceutics9040053. PMID: 29156634; PMCID: PMC5750659.

Mura, S., & Couvreur, P. (2012). Nanotheranostics for personalized medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 64(13), 1394-1416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.006>

Pérez-Amor, M. Á., Barrios, L., Armengol, G., & Barquinero, J. F. (2022). Differential radiosensitizing effect of 50 nm gold nanoparticles in two cancer cell lines. *Biology*, 11(8), 1193. <https://doi.org/10.3390/biology11081193>

Priya M R, K., & Iyer, P. R. (2020). Antiproliferative effects on tumor cells of the synthesized gold nanoparticles against Hep2 liver cancer cell line. *Egyptian Liver Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s43066-020-0017-4>

Shinohara, N., Zhang, G., Oshima, Y. et al. Kinetics and dissolution of intratracheally administered nickel oxide nanomaterials in rats. *Part Fibre Toxicol* 14, 48 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0229-x>

Shukla, R. K., Badiye, A., Vajpayee, K., & Kapoor, N. (2021). Genotoxic potential of nanoparticles: Structural and functional modifications in DNA. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728250>

Song, L., Zhang, S., & Chen, B. (2009). A novel visible-light-sensitive strontium carbonate photocatalyst with high photocatalytic activity. *Catalysis Communications*, 10(12), 1565-1568. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2009.03.022>

Sood, A., Desseigne, M., Dev, A., Maurizi, L., Kumar, A., Millot, N., & Han, S. S. (2023). A comprehensive review on barium titanate nanoparticles as a persuasive piezoelectric material for biomedical applications: Prospects and challenges. *Small*, 19(12). <https://doi.org/10.1002/smll.202206401>

Stanley S. Biological nanoparticles and their influence on organisms *Current opinion in biotechnology*, 28: 69-74, 2014

Tajani, A. Substance identification of nanomaterials not key to ensuring their safe use. *Nat. Nanotechnol.* 2013, 8, 306-307.

Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., & Schiestl, R. H. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Research*, 69(22), 8784-8789. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-2496>

Wang, Y., Zheng, J., Zhang, Z., Yuan, C., & Fu, D. (2009). CdTe nanocrystals as luminescent probes for detecting ATP, folic acid and L-cysteine in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 342(1-3), 102-106. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.04.020>

Wen, H., Dan, M., Yang, Y., Lyu, J., Shao, A., Cheng, X., Chen, L., & Xu, L. (2017). Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. *PloS One*, 12(9), e0185554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185554>

Xiong, P., Huang, X., Ye, N., Lu, Q., Zhang, G., Peng, S., Wang, H., & Liu, Y. (2022). Cytotoxicity of metal-based nanoparticles: From mechanisms and methods of evaluation to pathological manifestations. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany)*, 9(16). <https://doi.org/10.1002/advs.202106049>

Yoon, Y. N., Lee, D.-S., Park, H. J., & Kim, J.-S. (2020). Barium titanate nanoparticles sensitise treatment-resistant breast cancer cells to the antitumor action of tumour-treating fields. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59445-x>

Yu S.-W., Kuo S.-T., Tuan W.-H., Tsai Y.-Y., Su C.-H. Ion release from three lead-free piezoelectric ceramics and their physical and cytotoxicity characteristics. *Mater. Lett.* 2011;65:3522-3524. doi: 10.1016/j.matlet.2011.07.098.

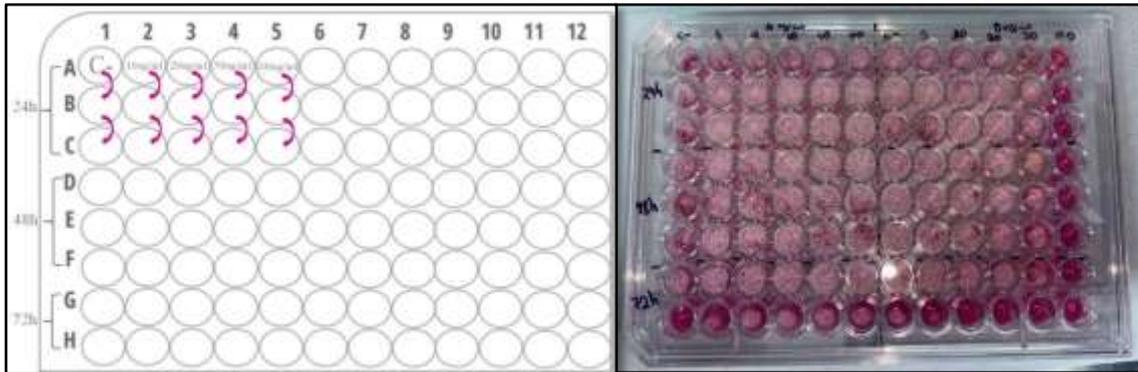
ANEXOS

Anexo 1



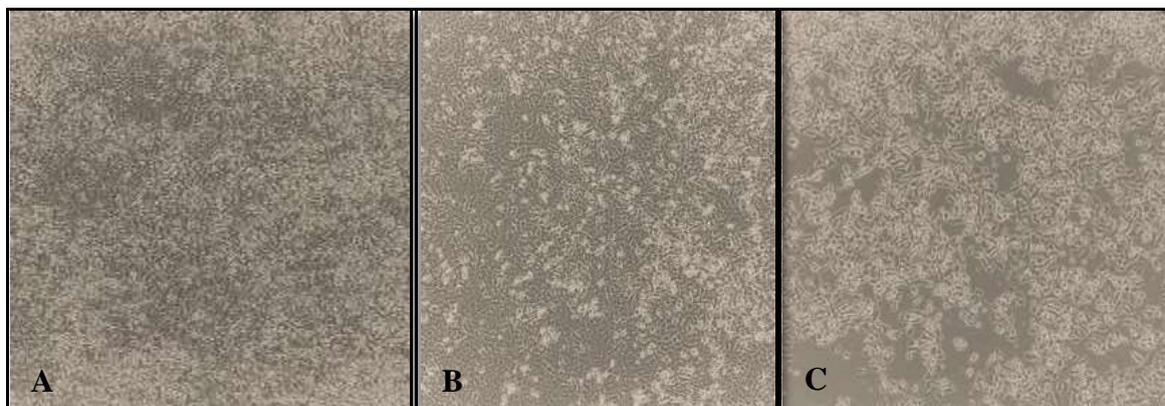
Microscopio electrónico de barrido (SEM) TESCAN VEGA 3 LMU de la Universidad Privada Antenor Orrego con el que se tomaron las imágenes microscópicas de los nanocompuestos de $\text{BaTiO}_3@$ quit utilizados en esta investigación.

Anexo 2

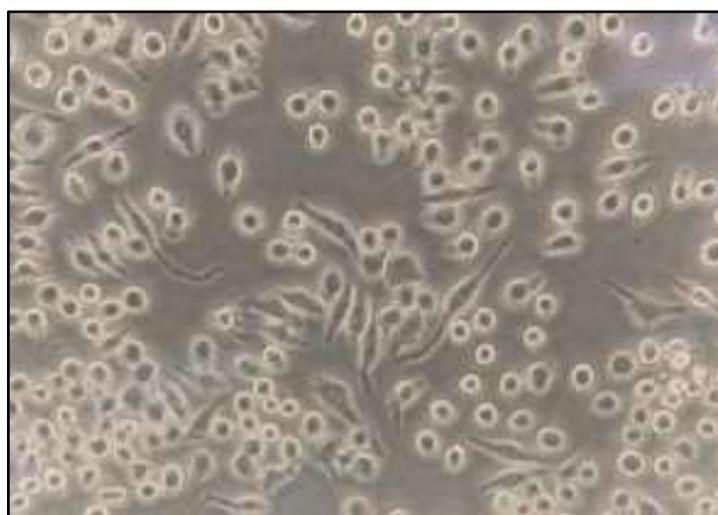


Esquema de trabajo para evaluar la viabilidad celular mediante MTT de células HeLa expuestas durante 24, 48 y 72h a diferentes concentraciones (0 ug/ml, 10 ug/ml, 20 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml) de BaTiO₃@quit, 2 experimentos independientes, cada uno con 3 réplicas.

Anexo 3

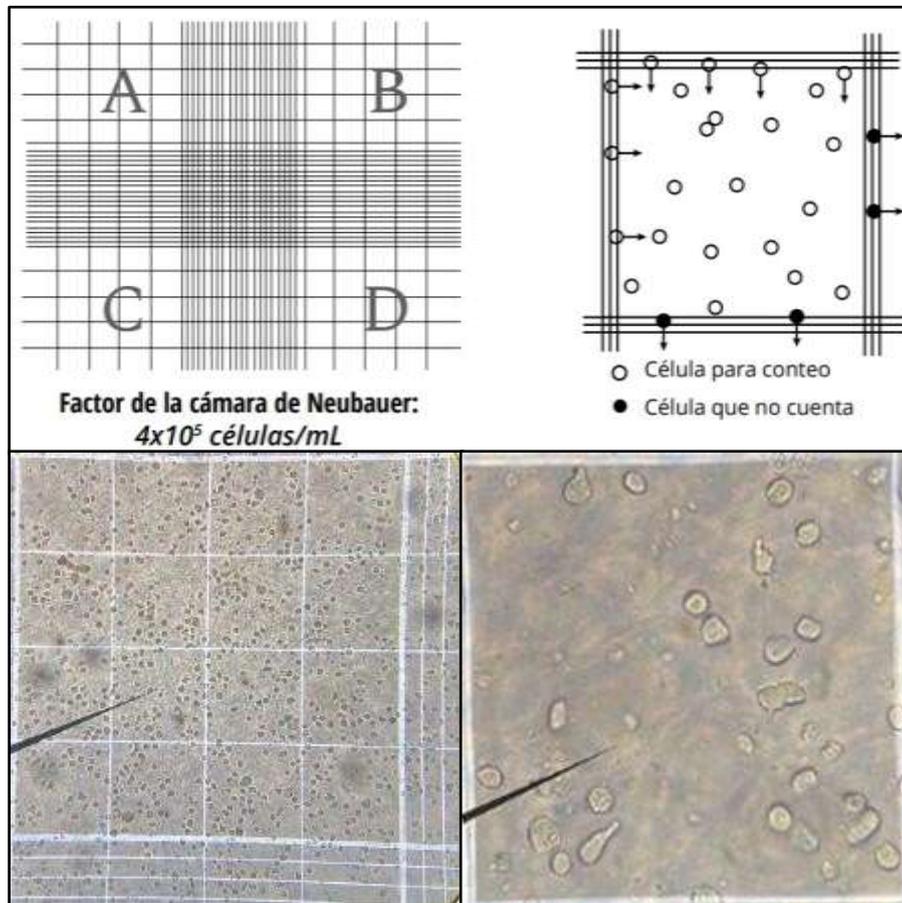


Células HeLa expuestas durante 72h a A: C- (0ug/ml), B: 10ug/ml y C: 100u/ml de nanocompuestos de BaTiO₃@quit utilizados en esta investigación.



Morfología celular en la evaluación de la viabilidad celular de las células HeLa, evaluado por la técnica de Milles-Misra, expuestas durante 24, 48 y 72h a diferentes concentraciones (0 ug/ml, 10 ug/ml, 20 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml) de BaTiO₃@quit.

Anexo 4



Metodología seguida para el conteo de células en cámara de Neubauer. Una vez enfocadas las cuadrículas se cuentan las células que hay en los recuadros divididos en 16 cuadrículas (ver esquema: recuadros A, B, C y D). 2. La media aritmética de los 4 recuentos efectuados (A, B, C y D, multiplicada por el factor de la cámara (10.000) y por el factor de dilución (100/90) arroja la concentración de células en la muestra (células / mL).