



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

(2013-2014)

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD ASOCIADA A LA EXPOSICIÓN A  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS METÁLICOS EN CÉLULAS NEURONALES**

Vº Bº Directoras del Trabajo

Dra. Dña. *Blanca Laffon Lage*

Dra. Dña. *Vanessa Valdiglesias García*

Aïda Castelo Valenzuela

Fecha de presentación: 24 julio 2014



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MASTER IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AND GENETICS

(2013-2014)

DEPARTMENT OF CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

**GENOTOXICITY ASSESSMENT RELATED EXPOSURE TO METAL OXIDE  
NANOPARTICLES IN NEURONAL CELLS**

Work approval by the Directors

*Dr. Blanca Laffon Lage*

*Dr. Vanessa Valdiglesias García*

Aïda Castelo Valenzuela

Date submitted: July 24, 2014



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MÁSTER EN BIOLOXÍA MOLECULAR, CELULAR E XENÉTICA

(2013-2014)

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR Y MOLECULAR

**AVALIACIÓN DA XENOTOXICIDADE ASOCIADA Á EXPOSICIÓN A  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS METÁLICOS EN CÉLULAS NEURONAIS**

V. e Pr. Directoras do Traballo

Dra. Dna. *Blanca Laffon Lage*

Dra. Dna. *Vanessa Valdiglesias García*

Aïda Castelo Valenzuela

Data de presentación: 24 xullo 2014



# UNIVERSIDADE DA CORUÑA

BLANCA LAFFON LAGE, Doctora en Farmacia y Profesora Titular del Departamento de Psicología de la Universidade da Coruña y VANESSA VALDIGLESIAS GARCÍA, Doctora en Biología e Investigadora del mismo Departamento,

INFORMAN:

Que el Trabajo de Fin de Máster titulado “Evaluación de la genotoxicidad asociada a la exposición a nanopartículas de óxidos metálicos en células neuronales” presentado por Dña. Aïda Castelo Valenzuela ha sido realizado bajo nuestra dirección. Considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, a 9 de julio de 2014

Fdo:

Dra. Dna. *Blanca Laffon Lage*

Dra. Dna. *Vanessa Valdiglesias García*

## Índice

<b>Índice</b> .....	1
<b>Introducción:</b> .....	3
1. Nanopartículas de óxido de hierro:.....	3
1.1. Aplicaciones de las ION: .....	4
1.2. Toxicidad de las ION: .....	6
1.2.1. Genotoxicidad: .....	7
1.2.2. Neurotoxicidad: .....	9
1.3. Recubrimiento de las ION:.....	9
2. Evaluación de la genotoxicidad de las ION:.....	11
2.1 Daño primario en el ADN: ensayo del cometa: .....	11
2.2 Daño oxidativo en el ADN: .....	12
<b>Objetivos:</b> .....	14
<b>Material y Métodos:</b> .....	15
1. Síntesis de las ION: .....	15
2. Caracterización físico-química de las nanopartículas: .....	15
3. Cultivo de la línea celular y tratamientos:.....	15
4. Ensayo del cometa estándar: .....	16
6. Análisis estadístico: .....	19
<b>Resultados y Discusión:</b> .....	20

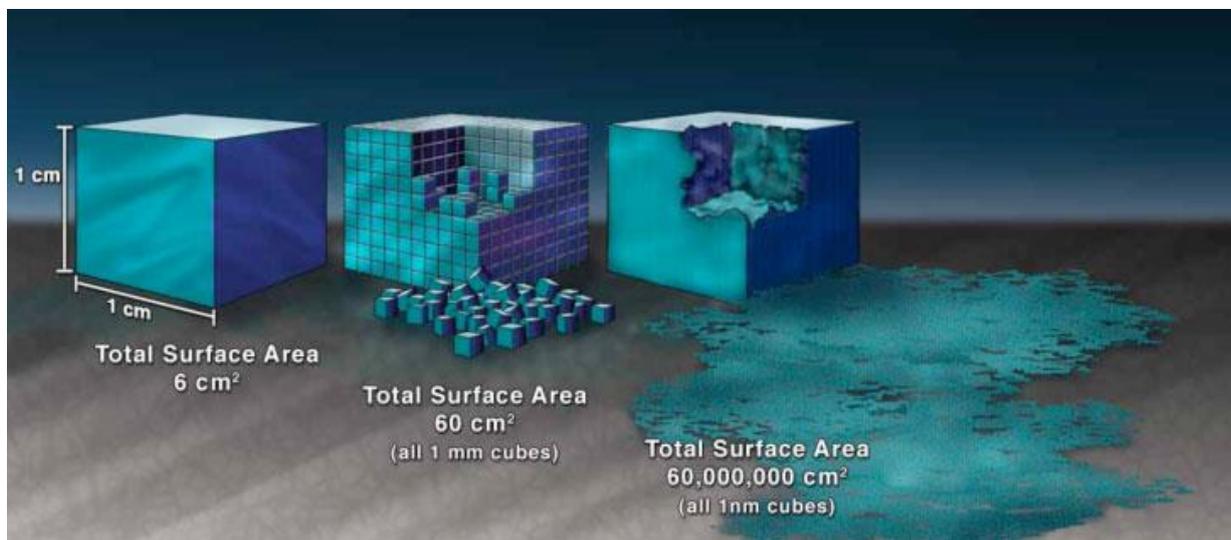
---

1. Caracterización físico-química de las ION: .....	20
2. Estudio de interferencia de las ION con el ensayo del cometa:.....	20
3. Análisis del daño primario en el ADN causado por las ION:.....	21
3.1 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con ácido oleico:.....	22
3.2 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con sílice: .....	23
4. Estudio de interferencia de las ION con la enzima OGG1: .....	25
4.1 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con ácido oleico:.....	26
4.2 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con sílice: .....	27
5. Análisis del daño oxidativo en el ADN causado por las ION: .....	28
5.1. Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con ácido oleico:.....	29
5.2 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con sílice: .....	32
<b>Conclusiones:</b> .....	36
<b>Bibliografía:</b> .....	37

## Introducción:

### 1. Nanopartículas de óxido de hierro:

Las nanopartículas son aquellos materiales caracterizados por tener sus tres dimensiones espaciales en un rango inferior a 100nm (Clift *et al.*, 2011). Su pequeño tamaño hace que la relación entre su superficie y el radio de la nanopartícula sea muy elevado (**Figura 1**) y por tanto incrementa su capacidad de interacción con el medio, lo que afecta a sus propiedades físico-químicas. Estas nuevas propiedades hacen necesario un estudio adicional a escala nanométrica de materiales ya conocidos a mayor escala (Yin *et al.*, 2010).



**Figura 1:** Ilustración del aumento del área superficial conforme disminuye el tamaño de partícula hacia la escala nanométrica. [Fuente: Bell (2007)].

La nanotecnología aprovecha estas propiedades superficiales y utiliza las nanopartículas para estudiar la maquinaria celular sin interferir en ella (Salata, 2004) convirtiéndose en una de las ciencias aplicadas más prometedoras, tanto orientadas a usos industriales como a biomedicina, siendo este último el de interés para el presente estudio.

Las nanopartículas a estudiar son nanopartículas de óxidos metálicos, más específicamente de óxido de hierro (ION, de sus siglas en inglés *Iron Oxide Nanoparticles*). Actualmente se distinguen diferentes tipos de ION en función de su tamaño y propiedades magnéticas: nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION,

*SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*), con un tamaño superior a 50nm, y nanopartículas ultrapequeñas superparamagnéticas de óxido de hierro (USPION, *Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*), de tamaño inferior a 50nm, (Martin *et al.*, 2012). Las principales ION usadas son de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) debido a la simplicidad de su síntesis y su solubilidad parcial en medio ácido en comparación con otras nanopartículas como pueden ser las de  $\text{TiO}_2$  o  $\text{SiO}_2$  (Ma *et al.*, 2012).

Las propiedades magnéticas de las ION permiten, tras ser introducidas en el organismo, su manipulación externa mediante gradientes de campos magnéticos que redirigen las nanopartículas a determinadas zonas o tejidos corporales, donde, por ejemplo, liberan algún fármaco o marcan un determinado tipo celular (Pankhurst *et al.*, 2003). Además, la propiedad de paramagnetismo característica por la modulación del magnetismo y ordenación de las ION en función de la temperatura, resulta muy útil para aplicaciones médicas (Huber, 2005).

#### 1.1. Aplicaciones de las ION:

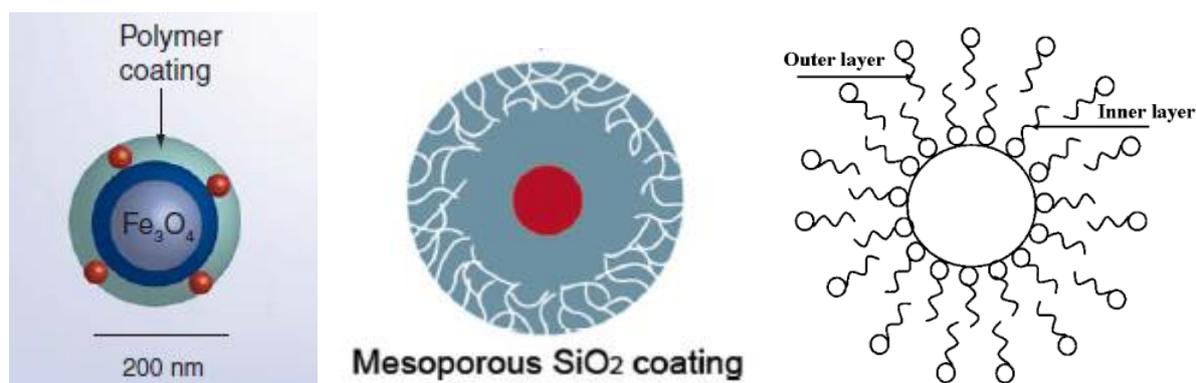
El pequeño tamaño y gran superficie de las nanopartículas facilita su entrada en el organismo y su internalización celular. Las ION permiten la creación de fluidos magnéticos lo que incrementa sus posibles aplicaciones (suspensiones coloidales estables compuestas de nanopartículas magnéticas disueltas en líquidos orgánicos o inorgánicos) (Freitas *et al.*, 2002).

Estas cualidades resultan de gran utilidad y potencial para gran número de aplicaciones biomédicas, entre las que se encuentran: diagnóstico y localización mediante imágenes por resonancia magnética (Bjørnerud y Johansson, 2004; Ito *et al.*, 2005), marcaje celular (Ahamed *et al.*, 2013), transporte de medicamentos (Häfeli *et al.*, 2009), ingeniería de tejidos, transfecciones magnéticas, detección de niveles de hierro (Singh *et al.*, 2010), tratamientos para amiloidosis (Bellova *et al.*, 2010), terapia contra el cáncer por hipertermia (Jadhav *et al.*, 2013; Jordan *et al.*, 2001), e incluso para detectar patógenos (Bai *et al.*, 2013).

Una de las primeras aplicaciones realizadas con las ION fue el tratamiento por vía oral de la anemia ferropénica en ratones; sin embargo se encontraron acumulaciones de las

nanopartículas en distintos órganos del animal, sobre todo, hígado, riñón y pulmones (Weissleder *et al.*, 1989).

Las propiedades de las ION pueden ser alteradas o mejoradas al modificar tanto el núcleo de la nanopartícula como su recubrimiento con componentes que mejoren su biocompatibilidad, capacidad de interacción, internalización y magnetismo entre otros; lo que incrementa las posibilidades de nuevas aplicaciones (**Figura 2**) (Chapa *et al.*, 2014; Magdolenova *et al.*, 2013).



**Figura 2:** (De izquierda a derecha) Esquemas correspondientes a: nanopartícula de magnetita recubierta con un polímero con fármacos embebidos. [Fuente: Muthu *et Singh* (2009)], nanopartícula de magnetita recubierta con una matriz porosa de sílice. [Fuente: Yi *et al.* (2006)] y nanopartícula de magnetita con doble capa de ácido oleico [Fuente: Maity *et Agrawal* (2007)].

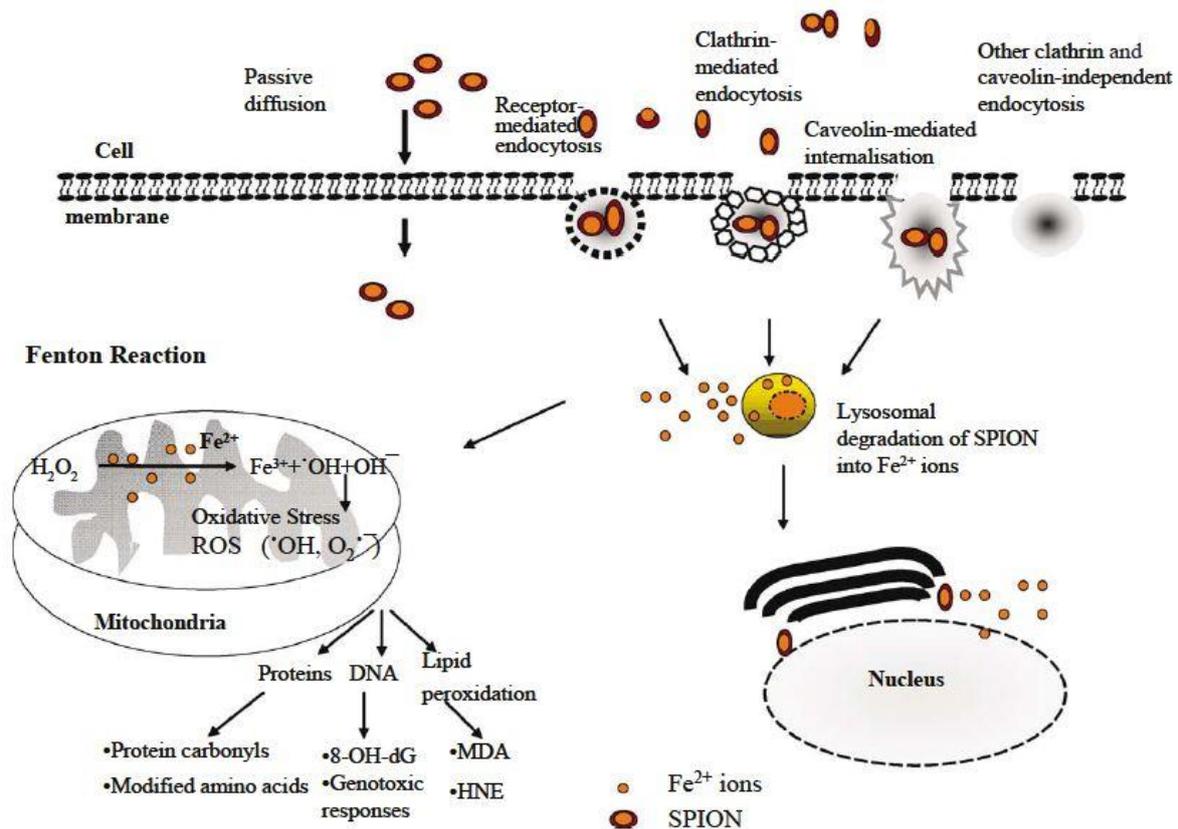
La elevada relación superficie/radio de las nanopartículas, la presencia o ausencia de componentes de recubrimiento, así como la naturaleza de las mismas influye sobre su capacidad de interactuar entre ellas formando agregados. En el caso de las ION desnudas, las proteínas del medio circundante se adhieren a su superficie formando complejos moleculares que aumentan la capacidad de agregarse entre ellas, incrementando su tamaño y formando un recubrimiento. Esta capa adicional impide la unión de la nanopartícula a ligandos de interés y aumenta la probabilidad de fagocitación por parte de macrófagos. Este recubrimiento accidental denominado *corona* disminuye la biocompatibilidad y viabilidad de las nanopartículas. Para reducir su formación, la solución óptima para las ION es el recubrimiento con compuestos hidrofílicos y biocompatibles como pueden ser el dextrano, o el polietilén glicol (PEG) (Monopoli *et al.*, 2011, Santhosh & Ulrih, 2013).

## 1.2. Toxicidad de las ION:

Debido a sus propiedades las ION comienzan a usarse cada vez más en aplicaciones médicas (Soenen *et al.*, 2012). Aunque las ION se consideran biocompatibles y no tóxicas (Mesárošová *et al.*, 2014), recientemente varios estudios han demostrado que las nanopartículas de magnetita resultan tóxicas para determinados tipos celulares debido a las reacciones de óxido-reducción producidas en su superficie, capaces de liberar iones de hierro que reaccionen con el interior celular (Chapa *et al.*, 2014).

La toxicidad de las ION se debe principalmente a su pequeño tamaño, movilidad y capacidad de ser internalizadas por las células, así como a la capacidad de la superficie desnuda para liberar iones de hierro. En el caso de su tamaño existe controversia, ya que hay estudios que afirman que no se observan diferencias de toxicidad entre nanopartículas y micropartículas (Karlsson *et al.*, 2009); sin embargo cuanto más pequeña es la nanopartícula mayor es su relación superficie/radio y su capacidad de ser internalizada, por lo que aumenta su capacidad de interacción con las moléculas y orgánulos celulares (Magdolenova *et al.*, 2013).

Algunos de los efectos tóxicos descritos para las ION son: citotoxicidad, apoptosis, interrupción de estructuras del citoesqueleto y estrés oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Voinov *et al.*, 2011), daño mitocondrial, daño cromosómico y daño oxidativo en el ADN (Singh *et al.*, 2010) y desajuste en el ciclo celular provocando fallos en la regulación de los puntos de control (Wu y Sun, 2011) (**Figura 3**). En general, los efectos biológicos de las ION dependen no sólo de su naturaleza química y capacidad de reacción, sino también de su capacidad de ser internalizadas por la célula, la composición de su corona proteínica, su localización y su bioestabilidad intracelular (Muller *et al.*, 2014).



**Figura 3:** Representación esquemática de las diferentes vías de entrada de las ION en la célula y los posibles mecanismos de toxicidad que son capaces de producir [Fuente: Singh *et al.* (2010)].

### 1.2.1. Genotoxicidad:

Las nanopartículas tienen la capacidad de adentrarse en el núcleo e interactuar no sólo con el ADN directamente, sino con las moléculas y mecanismos implicados en su duplicación y reparación, pudiendo llegar a causar alteraciones en el material genético, efecto conocido como genotoxicidad.

Los estudios previos de análisis de genotoxicidad realizados sobre ION son en general inconsistentes debido a la variabilidad de resultados obtenidos en función del uso o no de recubrimientos y de la composición de los mismos, las concentraciones usadas, y los distintos tipos celulares. Aún en estudios que usan las mismas concentraciones se pueden encontrar diferencias de resultados. Así por ejemplo en lo referente a la capacidad de producción de daño en el ADN por parte de las ION desnudas se observaron resultados positivos sobre células alveolares A549 (Könczöl *et al.*, 2011), y en las líneas celulares: IMR-

90, de fibroblastos pulmonares humanos y BEAS-2B, de células epiteliales bronquiales (Bhattacharya *et al.*, 2009); aunque se observaron asimismo otros resultados negativos: en la misma línea celular A549 (Karlsson *et al.*, 2009) y en células embrionarias de hámster Sirio (SHE) (Guichard *et al.*, 2012).

En cuanto a las ION recubiertas varía mucho en función de la naturaleza del recubrimiento. Se observaron resultados positivos en fibroblastos L-929 tratados con ION recubiertas con tetraetil ortosilicato (TEOS) y 3-aminopropil trimetoxilano (APTMS) y citrato (Hong *et al.*, 2011); así como resultados negativos de ION recubiertas con ácido glutámico en células pulmonares de hámster chino (Zhang *et al.*, 2012) y en fibroblastos humanos incubados con ION recubiertas con ácido dimercaptosuccínico (DMSA) (Auffan *et al.*, 2006).

Junto con la inducción de alteraciones en el material genético, las nanopartículas pueden también originar estrés oxidativo mediante la producción de ROS, que en abundancia puede dañar el ADN provocando lesiones 8-hidroxi-desoxiguanina (8-OHdG), dañando las proteínas de reparación y aumentando la posibilidad de producción de mutaciones y roturas no reparadas (Singh *et al.*, 2010). Es por ello que el estrés oxidativo derivado de la exposición a estas nanopartículas es considerado uno de los principales mecanismos involucrados en la genotoxicidad de las ION desnudas (Singh *et al.*, 2010) y con menor efecto sobre las ION recubiertas (Mesárošová *et al.*, 2014). Además ya que la solubilidad de las ION es baja, son persistentes en los sistemas biológicos pudiendo causar efectos mutagénicos a largo plazo en el organismo (Auffan *et al.*, 2009).

En referencia a la capacidad de producción de daño oxidativo en el ADN por parte de las ION también se observaron resultados dispares generalmente relacionados con la presencia de recubrimientos en las nanopartículas. Así por ejemplo, (Magdolenova *et al.*, 2013) observaron que la exposición a ION recubiertas con oleato originaba estrés oxidativo en células linfoblásticas humanas TK6, no encontrando daño alguno al emplear las ION desnudas.

Esta disparidad de resultados demuestra que un solo estudio de genotoxicidad no es suficiente y que, dada la gran influencia que parece tener la presencia de la cubierta en las

nanopartículas o incluso el material específico del que estén compuestas, es necesario un análisis exhaustivo de los efectos genotóxicos de las ION atendiendo, ya no sólo al tamaño, concentración o tiempo de exposición, sino también a los componentes usados como recubrimiento.

### 1.2.2. Neurotoxicidad:

Las ION de menor tamaño pueden traspasar la barrera hematoencefálica, lo que las hace útiles para aplicaciones médicas que tengan como diana el sistema nervioso, tanto para secuestro o marcaje como para diagnóstico (Wang *et al.*, 2010). Esta capacidad de internalización en un medio tan delicado y controlado aumenta también la capacidad de las ION de interferir con las células neuronales afectando a sus funciones normales.

El cerebro es especialmente vulnerable a las agresiones y a la entrada de tóxicos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. También es vulnerable al daño oxidativo debido a su gran contenido en ácidos grasos insaturados fácilmente peroxidables, su alto consumo en oxígeno y escasez de enzimas antioxidantes, en comparación con otros órganos (Skaper *et al.*, 1999). Por eso es necesario analizar los efectos neurotóxicos que puede producir en el sistema nervioso central la capacidad de internalización y reactividad de las ION así como su capacidad de generar ROS. Las principales causas por las que las nanopartículas pueden producir daño neuronal es debido a la reactividad de la superficie de las nanopartículas, produciendo inflamación, interacción con moléculas y orgánulos celulares y estrés oxidativo, relacionado con varias enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer (Hu *et Gao*, 2010).

### 1.3. Recubrimiento de las ION:

Las ION desnudas producen significativamente más toxicidad que las recubiertas con compuestos diversos (Könczöl *et al.*, 2011), debido, entre otros motivos, a su mayor capacidad de formar ROS (Voinov *et al.*, 2011). Como solución se realiza el recubrimiento de las nanopartículas con diferentes compuestos que actúan como barrera entre la superficie altamente reactiva de las ION y el medio, mejorando las propiedades físico-químicas de las ION, su adhesión e internalización. Además soluciona otros problemas como la agregación,

solubilidad, estabilidad y biocompatibilidad. Asimismo el recubrimiento permite la unión de ligandos como péptidos, hormonas o fármacos (Sadeghiani *et al.*, 2005). A pesar de esto no todos los recubrimientos usados han resultado ser óptimos, variando la producción de estrés oxidativo en función del compuesto aplicado, lo que demuestra la necesidad de realizar un estudio de biocompatibilidad en función de su tamaño y modificaciones de superficie (Wu *et al.*, 2010).

Los compuestos utilizados como recubrimiento en las ION testadas en este estudio han sido el ácido oleico y la sílice.

El ácido oleico es un ácido graso que se encuentra habitualmente en aceites y grasas naturales. Se usa como componente para recubrir la superficie de las ION en aplicaciones médicas; debido al incremento de las interacciones de repulsión entre partículas cercanas optimiza la estabilidad coloidal y la biocompatibilidad de las nanopartículas. El ácido oleico además mantiene en gran medida las propiedades de las ION dentro de las células, ya que es fácilmente degradado por ellas. Se usa también como estabilizador en algunos métodos de síntesis de ION. Además el ácido oleico no es tóxico hasta en un 8% del volumen sanguíneo (Park *et al.*, 2004).

Algunas matrices inorgánicas como las formadas por sílice ofrecen gran estabilidad coloidal y dispersión tanto en solventes acuosos como no acuosos, debido a los grupos silanol de su superficie que reaccionan con grupos alcohol (Gupta *et Gupta*, 2005). En sangre las nanopartículas recubiertas con sílice tienen carga negativa, repeliéndose entre ellas, lo que evita su agregación (McBain *et al.*, 2008), y ofrece estabilidad frente a cambios de pH (Gupta *et Gupta*, 2005). Su estructura matricial permite no sólo la unión covalente de ligandos sino también encapsular fármacos en sus poros, permitiendo una liberación sostenida a lo largo del tiempo (Kim *et al.*, 2012). Otra cualidad de esta matriz es su transparencia, permitiendo el paso de la luz a su través, por lo que se usa para bioimagen o en biosensores (Alwi *et al.*, 2012; Santhosh *et Ulrich* 2013). La sílice es un material resistente al calor y a la fuerza mecánica, y está considerado como seguro, biocompatible y biodegradable (Xia *et al.*, 2009). Específicamente hablando de las ION, el recubrimiento con sílice, permite mantener sus propiedades magnéticas (Li *et al.*, 2013), reduce la citotoxicidad

e incrementa la solubilidad y funcionalidad (Santhosh *et al.* 2013), ofreciendo un sinfín de oportunidades en diagnóstico y terapia combinada (Kunzmann *et al.*, 2011). Además su síntesis es sencilla, ya que no es necesario el uso de una la base para deposición del recubrimiento (Souza *et al.*, 2008).

## 2. Evaluación de la genotoxicidad de las ION:

Debido a las propiedades particulares de los materiales cuando se encuentran a escala nanométrica su genotoxicidad debe ser nuevamente evaluada, empleando ensayos específicos para determinar su toxicidad sobre el material genético. Uno de los principales métodos usados para tal fin es el ensayo del cometa, cuya versión estándar permite la cuantificación del daño primario del ADN, mientras que la variación de reparación oxoguanina glucosilasa (OGG1) permite la evaluación específica del daño oxidativo.

### 2.1 Daño primario en el ADN: ensayo del cometa:

El ensayo del cometa, o ensayo de electroforesis en microgel de células aisladas (SCGE) es un método sencillo, rápido y sensible para cuantificar y analizar el daño en el ADN en células individuales midiendo las roturas de cadena (Cemeli *et al.*, 2009). Presenta ventajas frente a otros tests ya que tiene mayor sensibilidad para detectar niveles bajos de daño en el ADN con menor cantidad de células (Dhawan *et al.*, 2009; Tice *et al.*, 2000). Además es capaz de analizar el daño genotóxico producido por las nanopartículas, detectando un gran número de positivos (Zhao *et al.* Castranova, 2011).

El ensayo consiste en la lisis con detergente de células embebidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos. Este detergente permeabiliza las células y descarta las membranas, citoplasma y nucleoplasma, dejando los nucleoides. Posteriormente se incuba en un medio con un pH determinado permitiendo el desenrollamiento y relajación del ADN; a continuación se realiza una electroforesis en la que los fragmentos producidos por las roturas en el ADN migran, tiñéndose posteriormente con un colorante fluorescente, lo que origina la característica forma de cometa, cuya longitud e intensidad de la cola aumentan conforme aumenta el número de roturas en el ADN (Dhawan *et al.*, 2009).

El ensayo del cometa fue desarrollado originalmente para ser llevado a cabo bajo condiciones neutras de pH, detectando dobles roturas en las hebras de ADN (Östling *et al.*, 1984). Posteriormente se desarrolló el ensayo bajo condiciones alcalinas, más sensible, capaz de detectar no sólo las roturas de doble cadena sino también las de cadena sencilla (Singh *et al.*, 1988). Los diferentes pasos que conforman del ensayo del cometa han sido modificados a lo largo del tiempo, permitiendo detectar otros tipos de daño en diferentes tipos celulares e incluso analizar el daño oxidativo en el ADN (Collins *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2006).

## 2.2 Daño oxidativo en el ADN:

El ensayo del cometa permite analizar daño oxidativo en el ADN al incorporar un paso adicional de incubación con enzimas de reparación como la OGG1. La OGG1 es una proteína con actividad K-glucosilasa que escinde purinas dañadas de la doble cadena de ADN, generando sitios apurínicos (AP). En el organismo participa en la reparación del ADN mediante escisión de bases.

Esta modificación en el ensayo del cometa es altamente idónea para la evaluación del daño oxidativo, debido a la alta especificidad de la OGG1 en la detección del daño oxidativo más frecuente en el ADN: 8-hidroxi-desoxiguanina (8-OHdG), ya que no reconoce bases aquiladas a diferencia de otras enzimas (Gedik y Collins, 2005; Smith *et al.*, 2006). Este daño se produce al atacar los radicales hidroxilo a la guanina oxidándola, añadiendo un grupo hidroxilo en la posición 8. La OGG1 elimina la base nitrogenada reconocida generando un sitio abásico que, en presencia del medio fuertemente básico utilizado durante el ensayo del cometa, dará lugar a una rotura de cadena, daño que tras la electroforesis podrá ser detectado como ADN en la cola de cometa y se deberá a la capacidad del componente a estudio para producir daño oxidativo.

Al aplicar cualquier ensayo de toxicidad al estudio de nanopartículas es esencial valorar primero la posible interferencia que éstas puedan causar con la propia metodología del ensayo (Kroll *et al.*, 2012). En el caso del ensayo del cometa, no sólo se ha de testar la

interferencia con la metodología estándar de la prueba, sino también con la actividad de la OGG1. (Magdolenova *et al.*, 2012).

**Objetivos:**

El objetivo de este trabajo ha consistido en la evaluación del daño primario y oxidativo en el ADN causado por la exposición de células neuronales humanas (SHSY5Y) a ION recubiertas con dos compuestos diferentes: ácido oleico y sílice, mediante la utilización del ensayo del cometa en su versión estándar y en combinación con incubación con la enzima OGG1. Para llevarlo a cabo ha sido necesario testar previamente la posible capacidad de las ION de interferir con la propia metodología del ensayo y con la actividad de la enzima OGG1.

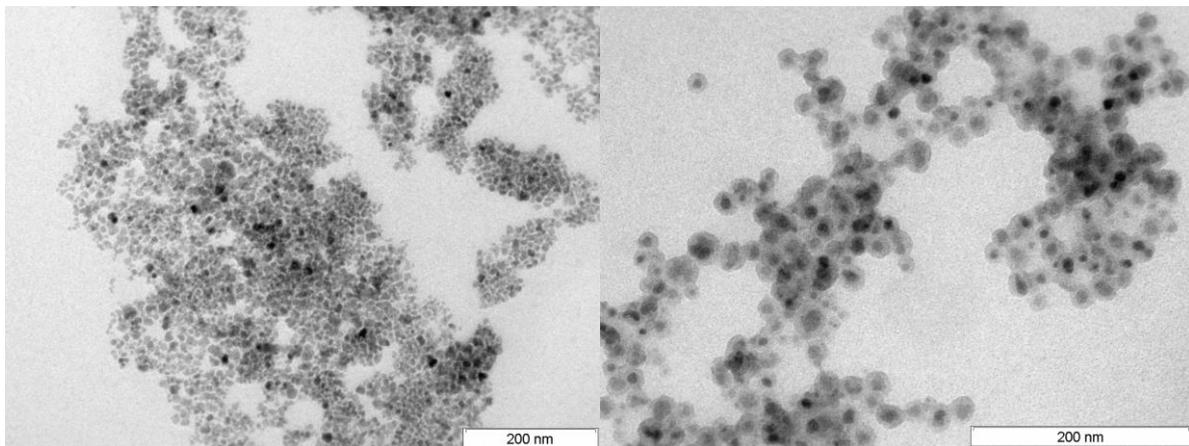
## Material y Métodos:

### 1. Síntesis de las ION:

Las ION utilizadas en este estudio fueron sintetizadas siguiendo los métodos descritos por Maity y Agrawal (2007) para las recubiertas con ácido oleico y Yi *et al* (2006) para las recubiertas con sílice. Estas ION fueron proporcionadas en forma de suspensiones acuosas estables a una concentración de 19mg/mL para las recubiertas con ácido oleico y de 4.78mg/mL para las recubiertas con sílice.

### 2. Caracterización físico-química de las nanopartículas:

Ambas nanopartículas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (**Figura 4**) y analizando su potencial zeta y su tamaño hidrodinámico, tanto en agua y medio de cultivo completo como en medio incompleto (sin suero), mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS).

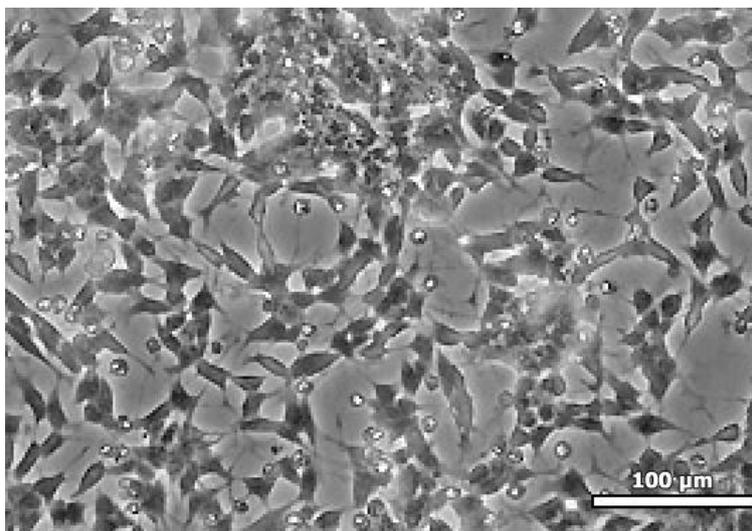


**Figura 4:** (De izquierda a derecha) Imágenes de TEM de las ION recubiertas con ácido oleico y con sílice.

### 3. Cultivo de la línea celular y tratamientos:

Para este estudio se utilizaron neuronas humanas SHSY5Y obtenidas de la *European Collection of Cell Cultures* (**Figura 5**) crecidas en medio EMEM/F12 con 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de solución antibiótica y antimicótica y un 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor (todo de Invitrogen). Las células se mantuvieron en incubadora a 37°C

con 5% de CO<sub>2</sub> con humedad controlada; se incubaron durante 3 o 24 horas con las nanopartículas a estudiar homogeneizadas en medio de cultivo incompleto (sin FBS) y en medio completo en placas de 96 pocillos. Las concentraciones de ION utilizadas fueron 10, 50, 100 y 200µg/mL. Las concentraciones y tiempos de exposición fueron seleccionados en base a resultados obtenidos en estudios previos de citotoxicidad.



**Figura 5:** Imagen de la línea celular SHSY5Y.

#### 4. Ensayo del cometa estándar:

Se realizó el ensayo del cometa estándar con pH alcalino (Singh *et al.*, 1988) con algunas modificaciones posteriores (Costa *et al.*, 2008). Tras la incubación con las ION, las células se centrifugaron y resuspendieron en 150µL de agarosa de bajo punto de fusión al 0.7% en tampón fosfato (PBS) a pH 7.4. Se depositaron 2 gotas de esta solución sobre portaobjetos previamente cubiertos con una capa de agarosa con punto de fusión normal al 1% en agua destilada y deshidratados en estufa a 65°C durante 15 minutos. Tras depositar las gotas de la suspensión se colocó un cubreobjetos sobre ellas y se las dejó sobre hielo 15 minutos para dejar solidificar la agarosa, tras lo cual se retiraron los cubreobjetos.

Teniendo los portaobjetos listos se realizó una lisis celular en condiciones de oscuridad sumergiéndolos en una solución de lisis a pH 10 [compuesta por NaCl 2.5M,

Na<sub>2</sub>EDTA 100mM, Tris-HCl 10mM, NaOH 250nM y Tritón X-100 1% (añadido en el último momento)] durante 1 hora a 4°C.

Con las células lisadas dejando sólo el material genético se sumergieron los portaobjetos en una solución alcalina a pH 13 en un tanque de electroforesis colocado sobre hielo durante 40 minutos, para facilitar el desenrollamiento del ADN y la expresión de sitios sensibles al medio alcalino. La solución estuvo compuesta de Na<sub>2</sub>EDTA 1mM y NaOH 300mM. Después de la incubación se llevó a cabo la electroforesis durante 30 minutos a 300mA y 25V (0.83V/cm). Tras ella se neutralizaron las muestras con 3 lavados de 5 minutos en una solución de pH 7.5 compuesta por Tris-HCl 0.4M. Los portaobjetos se codificaron para realizar el estudio en condiciones “ciegas” y se tiñeron con 60µL de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5µg/mL.

Antes de realizar el ensayo del cometa, se testó la posible interferencia de las ION con la metodología del ensayo, siguiendo el protocolo descrito por (Magdolenova *et al.*, 2012). Se empleó para ello la concentración más alta de ambas nanopartículas (200µg/mL), dispersadas tanto en medio incompleto (sin FBS), como en medio completo. Con ese fin, se realizó el procedimiento del ensayo con las células sin tratar, añadiendo las ION inmediatamente antes de embeber las células en agarosa. El objetivo de este procedimiento es detectar alteraciones en el material genético que puedan deberse a la interacción directa de las nanopartículas con el ADN durante la realización del ensayo, y no como consecuencia de la exposición previa de las células a las ION durante el tiempo de tratamiento. De esta forma, si existe interferencia entre las nanopartículas a estudio y el ensayo, se obtendrá un incremento en el daño evaluado con respecto a los controles sin nanopartículas.

La captura y análisis de las imágenes fue realizada mediante el programa *Comet IV* (Perceptive Instruments), evaluando como parámetro estimador del daño en el ADN el porcentaje de ADN en la cola del cometa (%tADN), medido éste desde el centro estimado de la célula. Se analizaron un total de 100 células por tratamiento y condición para cada una de las réplicas, con 3 réplicas en total. Como control positivo se usó bleomicina a la concentración de 1µg/mL .

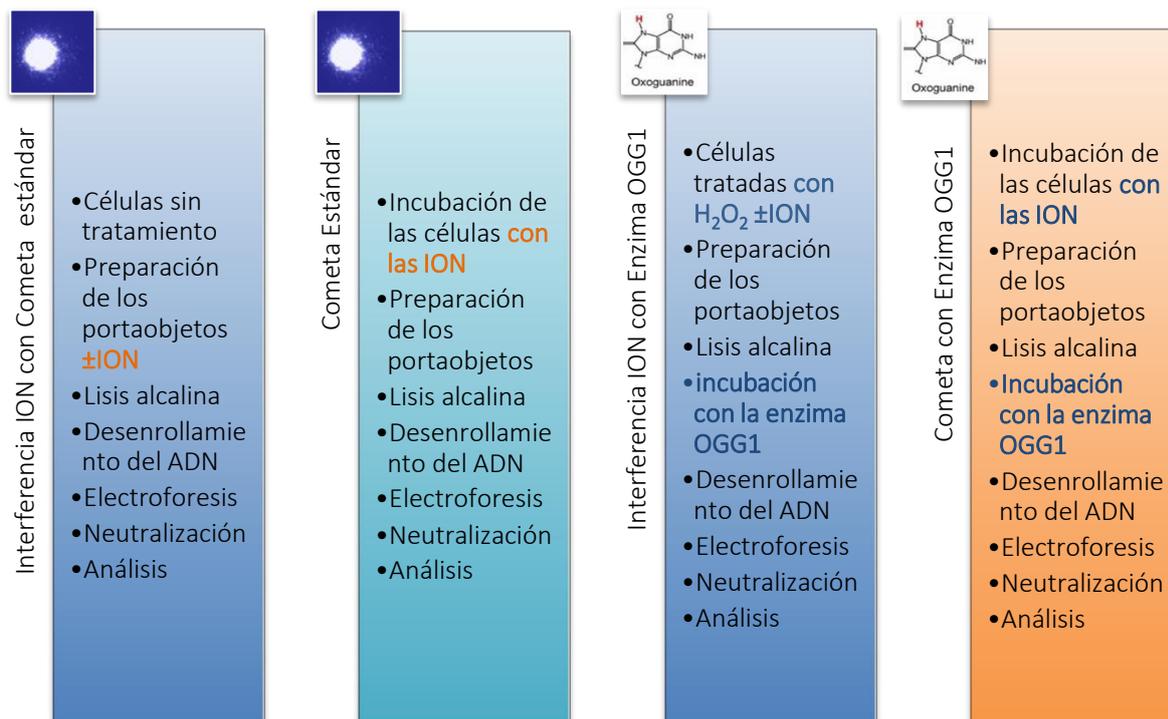
## 5. Ensayo del cometa con OGG1:

Esta variante del ensayo incluye un paso de incubación con la enzima OGG1 tras el proceso de lisis descrito previamente. Los portaobjetos se lavan 3 veces durante 5 minutos con una solución tampón compuesta de EDTA 0.5mM, albúmina de suero bovino 0.2mg/mL, KCl 0.1M y Hepes 40mM (pH 8). Tras los lavados se añadieron 50µL de la enzima OGG1 (0.0016U/µL, preparada en solución tampón) sobre cada microgel formado, correspondiente con cada gota de suspensión celular en agarosa, se depositó un cubreobjetos sobre ellos y se incubaron en estufa durante 10 minutos a 37°C. Se realizaron controles empleando 50µL de tampón sin enzima. Como control positivo se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la concentración de 2µM.

Al igual que con el ensayo del cometa estándar, se realizó previamente un test de interferencia de las nanopartículas con la enzima OGG1, para comprobar la posible interferencia de las ION con la capacidad de detección de daño oxidativo por parte de la enzima. Se siguió el procedimiento descrito por (Magdolenova *et al.*, 2012). Asimismo, se utilizó la concentración más alta de ambas ION (200µg/mL), dispersadas tanto en medio incompleto (sin FBS), como en medio completo. El ensayo se llevó a cabo con células tratadas con un agente oxidante de potencia conocida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2µM) en presencia o ausencia de las ION.

De esta forma se compara el daño oxidativo inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la OGG1 detecta en presencia y ausencia de las ION. En caso de que en presencia de las ION la actividad de la OGG1 se vea reducida diremos que existe interferencia de las ION con actividad enzimática.

A modo aclaratorio, la **Figura 6** muestra un esquema de las variantes del ensayo cometa empleadas en el presente estudio indicando en cada caso el momento del proceso en el que se introducen las ION y las principales diferencias entre protocolos.



**Figura 6:** Esquema con las diferencias, marcadas con letra de color naranja y azul, en la metodología de los distintos tipos de ensayos del cometa realizados.

## 6. Análisis estadístico:

La normalidad de la variable obtenida en el estudio (%tADN) se evaluó mediante el test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Dado que se alejaba significativamente de la distribución normal, se asumieron tests no paramétricos como los más adecuados para su utilización en el análisis de los datos. Se empleó por tanto el análisis de Kruskal-Wallis, complementado con el test *U* de Mann-Whitney, para determinar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos realizados.

El nivel de significación fue fijado en un 5%. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico *SPSS (IBM)* para Windows, versión 22.0.0 (2013) (Illinois, USA).

## Resultados y Discusión:

### 1. Caracterización físico-química de las ION:

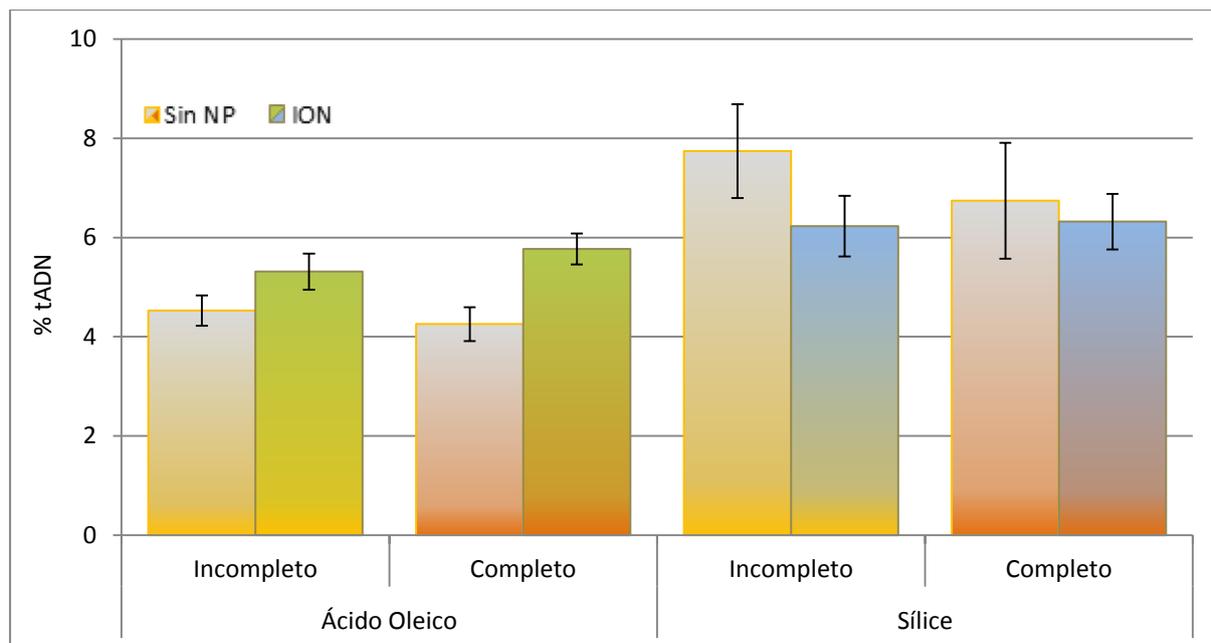
Los resultados del análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron un tamaño de aproximadamente 11nm para las ION recubiertas con ácido oleico y 20nm para las recubiertas con sílice. El tamaño hidrodinámico y potencial zeta de las nanopartículas resuspendidas en agua, medio incompleto (sin FBS) y completo se analizaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), observándose que el tamaño de las ION recubiertas con ácido oleico experimenta un incremento de tamaño notable en medio incompleto (Tabla 1). Las ION recubiertas con sílice mostraron un aumento de tamaño hidrodinámico con respecto a la suspensión en agua, tanto en medio completo como incompleto siendo mayor en este último debido a su tendencia a agregarse. Los valores correspondientes al potencial zeta se encuentran en un rango de entre -10 y -45 mV, siendo los valores más altos en agua.

**Tabla 1:** Valores obtenidos en la caracterización de las ION recubiertas con ácido oleico y sílice. (medias  $\pm$  desviación estándar).

ION	Cubiertas con Ácido oleico			Cubiertas con Sílice		
	Agua Mili Q	Medio Completo	Medio Incompleto	Agua Mili Q	Medio Completo	Medio Incompleto
Tamaño nanopartículas (nm)	10.9 $\pm$ 3.4			20.2 $\pm$ 2.9		
Diámetro hidrodinámico (nm)	164.5 $\pm$ 1.1	202.7 $\pm$ 0.7	1961.3 $\pm$ 52.8	93.3 $\pm$ 0.5	111.1 $\pm$ 1.1	141.6 $\pm$ 1.4
Potencial Zeta (mV)	-45.4 $\pm$ 2.0	-11.6 $\pm$ 1.0	-15.9 $\pm$ 0.3	-31.8 $\pm$ 2.1	-10.3 $\pm$ 1.1	-21.7 $\pm$ 1.0

### 2. Estudio de interferencia de las ION con el ensayo del cometa:

Los resultados obtenidos para la evaluación de la interferencia de las dos ION utilizadas con el ensayo del cometa se recogen en la **Figura 7**.



**Figura 7:** Resultados correspondientes al estudio de la interferencia de ambas nanopartículas a la concentración de 200µg/mL dispersadas en medio incompleto y completo, con el ensayo del cometa. Las barras corresponden al error estándar de la media.

No se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en presencia y ausencia de nanopartículas a 200µg/mL (concentración mayor que se pretendía utilizar en este ensayo) que mostrasen interacción de ninguna de las ION con el ensayo del cometa, independientemente del medio. Debido a esto, y teniendo en cuenta que la interferencia depende de la concentración (Kroll *et al.*, 2012), no se realizaron estudios de interferencia a menores concentraciones.

Estos resultados se corresponden además con otros previos que no mostraban interferencia de las ION recubiertas con ácido oleico con el ensayo del cometa (Halamoda *et al.*, 2012<sup>b</sup>; Magdolenova *et al.*, 2012).

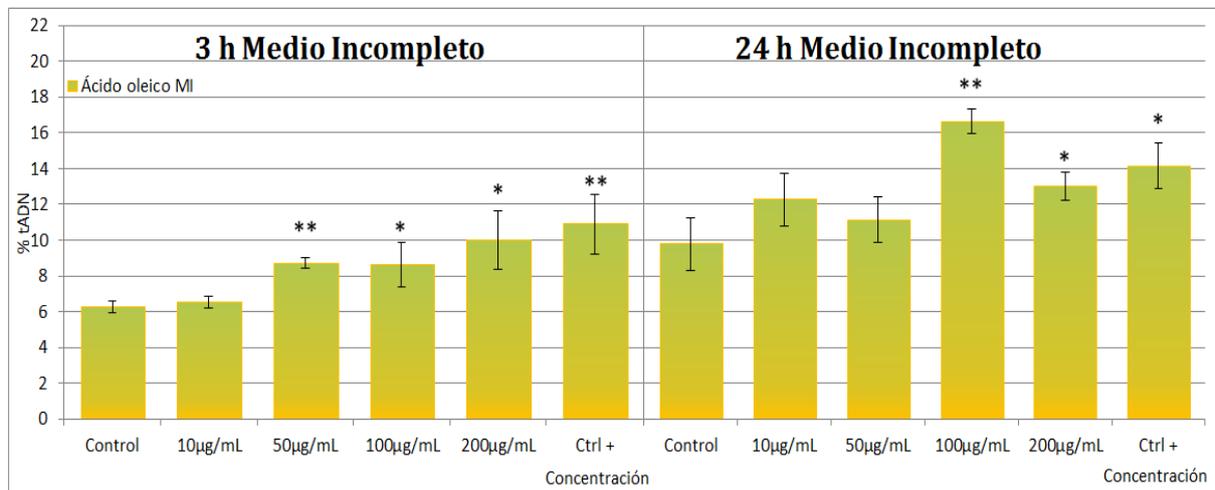
### 3. Análisis del daño primario en el ADN causado por las ION:

La versión alcalina del ensayo del cometa permite la detección de posibles roturas de cadena sencillas y dobles en el ADN producidas por las ION. Para estimar el daño genotóxico se utiliza el porcentaje de ADN en la cola del cometa o %tADN, correspondiente con la cantidad de ADN migrado fuera del núcleo durante la electroforesis y expresado como

porcentaje sobre el contenido total del ADN en el núcleo. Este parámetro es el sugerido como el más adecuado para la evaluación de niveles elevados de daño, ya que tiene un mayor rango de linealidad y permite mayor discriminación de daño (Collins, 2004).

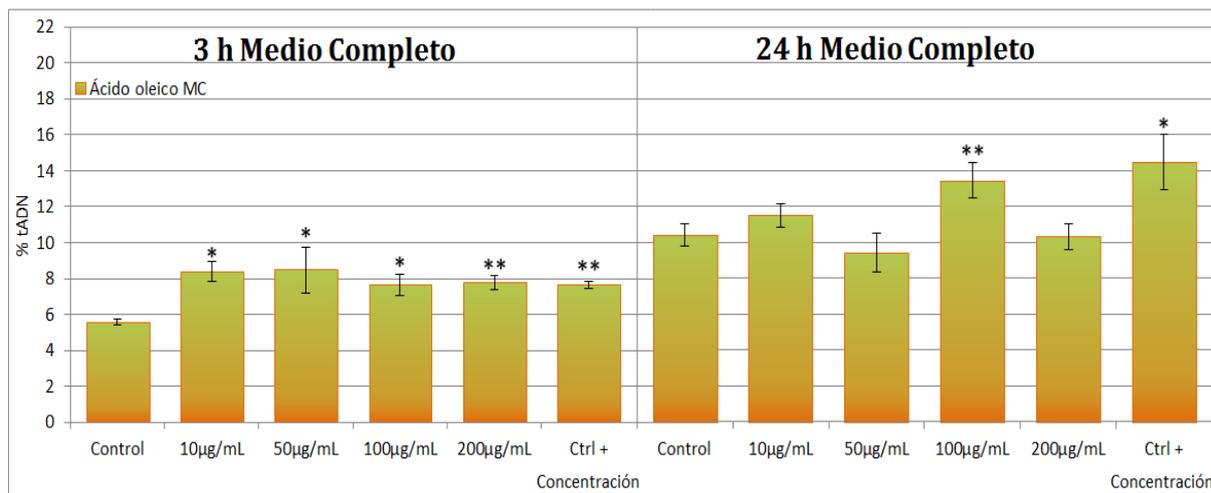
### 3.1 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con ácido oleico:

La **Figura 8** recoge los resultados obtenidos para la incubación con ION recubiertas con ácido oleico en medio incompleto durante 3 y 24 horas. Al comparar el daño con el control se observa un incremento significativo a partir de la concentración de 50µg/mL con 3 horas de incubación y a partir de 100µg/mL con la incubación de 24 horas, lo que indica capacidad de producir daño en el ADN por parte de las nanopartículas.



**Figura 8:** Resultados correspondientes al ensayo del cometa realizado en las células neuronales tras 3 y 24 horas de incubación con ION recubiertas con ácido oleico dispersadas en medio incompleto. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al control \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Al observar la gráfica correspondiente a las nanopartículas dispersadas en medio completo con la incubación de las células durante 3 y 24 horas, se observa un incremento significativo de daño en el ADN a todas las concentraciones analizadas para la incubación de 3 horas, y a 100µg/mL para la incubación de 24 horas (**Figura 9**).



**Figura 9:** Resultados correspondientes al ensayo del cometa realizado en las células neuronales tras 3 y 24 horas de incubación con ION recubiertas con ácido oleico dispersadas en medio completo. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al control \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

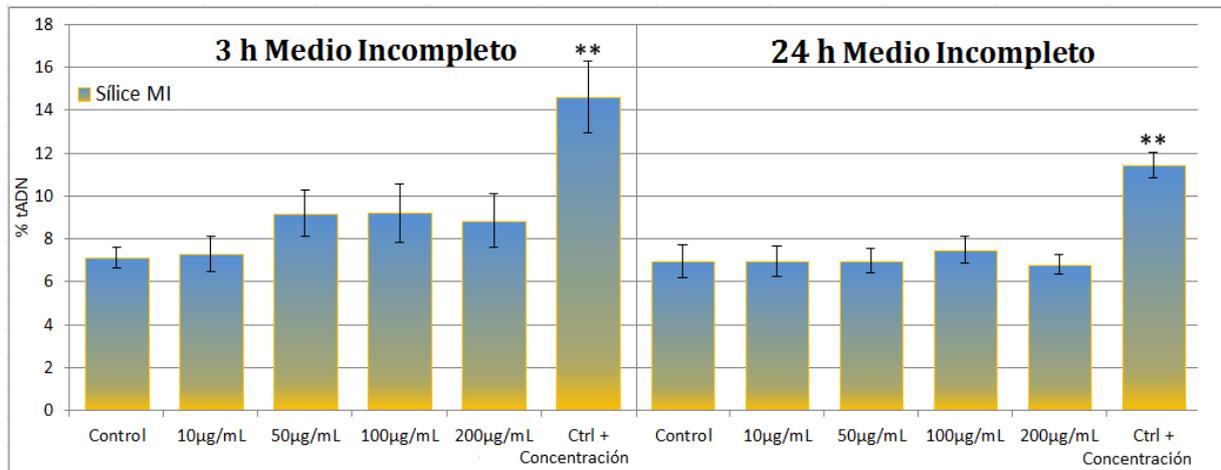
Por tanto, los resultados correspondientes al estudio de la capacidad de las ION recubiertas con ácido oleico de inducir daño primario en el ADN, muestran que éstas son capaces de producir este tipo de efecto. Estos resultados se corresponden con estudios previos en los que las ION recubiertas con ácido oleico de un tamaño entre 14 y 25nm indujeron el mismo daño en el ADN que las ION sin recubrimiento (Halamoda *et al.*, 2012; Magdolenova *et al.*, 2012).

Así, parece que el recubrimiento con ácido oleico no reduce la capacidad genotóxica de las ION desnudas (Ahamed *et al.*, 2013; Bhattacharya *et al.*, 2009) de la misma manera que ocurre con otras ION recubiertas con otros compuestos como 3-aminopropil trimetoxisilano (APTMS) (Hong *et al.*, 2011) o dextrano (Singh *et al.*, 2012).

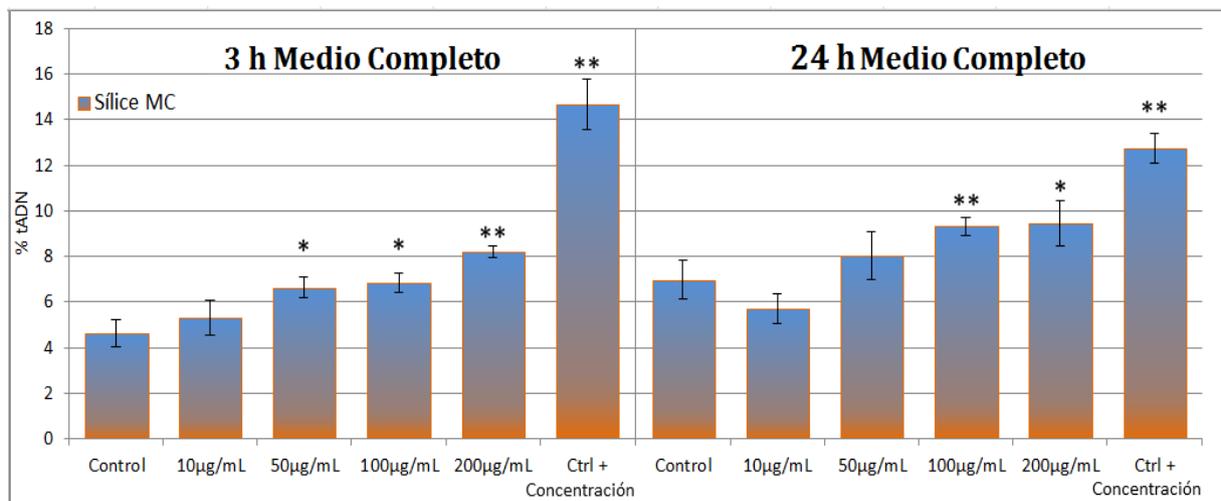
### 3.2 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con sílice:

Se analizó el daño genotóxico que pueden producir en las células neuronales SHSY5Y las ION recubiertas con sílice tras tiempos de incubación de 3 y 24 horas, dispersadas en medio incompleto (**Figura 10**). Al observar los resultados obtenidos, no se obtuvieron

diferencias significativas en comparación con el control a ninguna de las concentraciones testadas.



**Figura 10:** Resultados correspondientes al ensayo del cometa realizado en las células neuronales tras 3 y 24 horas de incubación con ION recubiertas con sílice dispersadas en medio incompleto. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al control \*\* $P < 0.01$ .



**Figura 11:** Resultados correspondientes al ensayo del cometa realizado en las células neuronales tras 3 y 24 horas de incubación con ION recubiertas con sílice dispersadas en medio completo. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al control \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Al realizar el ensayo del cometa tras incubaciones de 3 y 24 horas en medio completo (**Figura 11**) se observó un incremento en el daño genotóxico respecto al control a partir de la concentración de nanopartículas de 50µg/mL para la incubación de 3 horas y a partir de 100µg/mL para las incubadas durante 24 horas.

En conjunto, se observa que las ION recubiertas con sílice no producen daño primario en el ADN al estar dispersadas en medio incompleto, pero sin embargo sí muestran capacidad genotóxica al estar dispersadas en medio completo a partir de la concentración de 50µg/mL. No hay estudios previos que puedan corroborar estos resultados con diferentes medios de dispersión para estas nanopartículas específicas; no obstante sí puede corroborarse su aumento de genotoxicidad conforme aumenta la concentración de las mismas (Malvindi *et al.*, 2014).

En lo que compete al medio incompleto los resultados obtenidos se corresponden con estudios previos con otras nanopartículas de igual núcleo, pero diferentes recubrimientos, como el ácido dimercaptosuccínico DMSA (Auffan *et al.*, 2006), el oleato (Magdolenova *et al.*, 2012) ó tetraetil ortosilicato (TEOS) (Hong *et al.*, 2011). Sin embargo, en medio completo se detectó daño primario en el ADN, al igual que ocurre con Ion recubiertas con algunos otros compuestos como oleato sódico (Mesárošová *et al.*, 2014). Esto podría deberse a la posible formación en medio completo de una *corona* en la superficie de las ION capaz de interactuar con la maquinaria celular, o a un cambio de la capacidad de interferencia de las nanopartículas con las células.

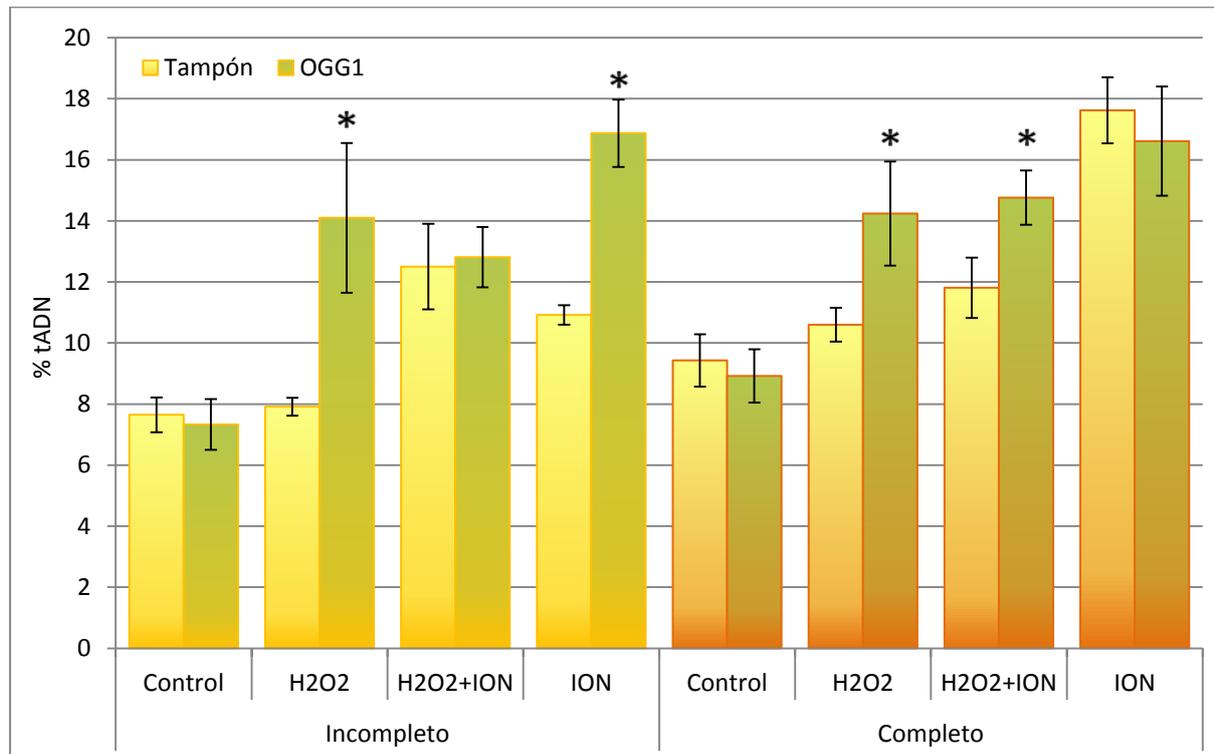
#### 4. Estudio de interferencia de las ION con la enzima OGG1:

De la misma manera que se evaluó la posible interferencia de las nanopartículas con la metodología del ensayo del cometa, también se analizó su posible interferencia con la actividad de la enzima OGG1, que se usa en combinación con este ensayo para la detección específica de daño oxidativo en el ADN (Kain *et al.*, 2012; Magdolenova *et al.*, 2012). La cuantificación del daño oxidativo en esta versión del ensayo del cometa se realiza mediante la comparación de las células incubadas únicamente con tampón respecto a las incubadas con la enzima OGG1. Para testar la interferencia se tratan previamente las células con una

sustancia de reconocido potencial oxidante ( $H_2O_2$ ) en presencia y ausencia de las ION de interés, y se determina el daño oxidativo detectado por la OGG1. Al igual que con el estudio de interferencia para el ensayo del cometa estándar, se realizó el estudio tanto con las ION dispersadas en medio incompleto como en medio completo. Se evaluaron por separado ambas nanopartículas a la concentración de  $200\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.1 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con ácido oleico:

La **Figura 12** muestra los resultados obtenidos para el estudio de interferencia de las ION recubiertas de ácido oleico con la actividad enzimática OGG1. Donde se compara la diferencia entre la incubación con tampón y con la enzima: daño oxidativo, entre las dos columnas incubadas con  $H_2O_2$  y las columnas incubadas con  $H_2O_2$  y las ION.



**Figura 12:** Resultados correspondientes al estudio de interferencia de las ION recubiertas con ácido oleico ( $200\mu\text{g/mL}$ ), dispersadas en medio incompleto y completo, con la enzima OGG1. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al control  $*P < 0.05$ .

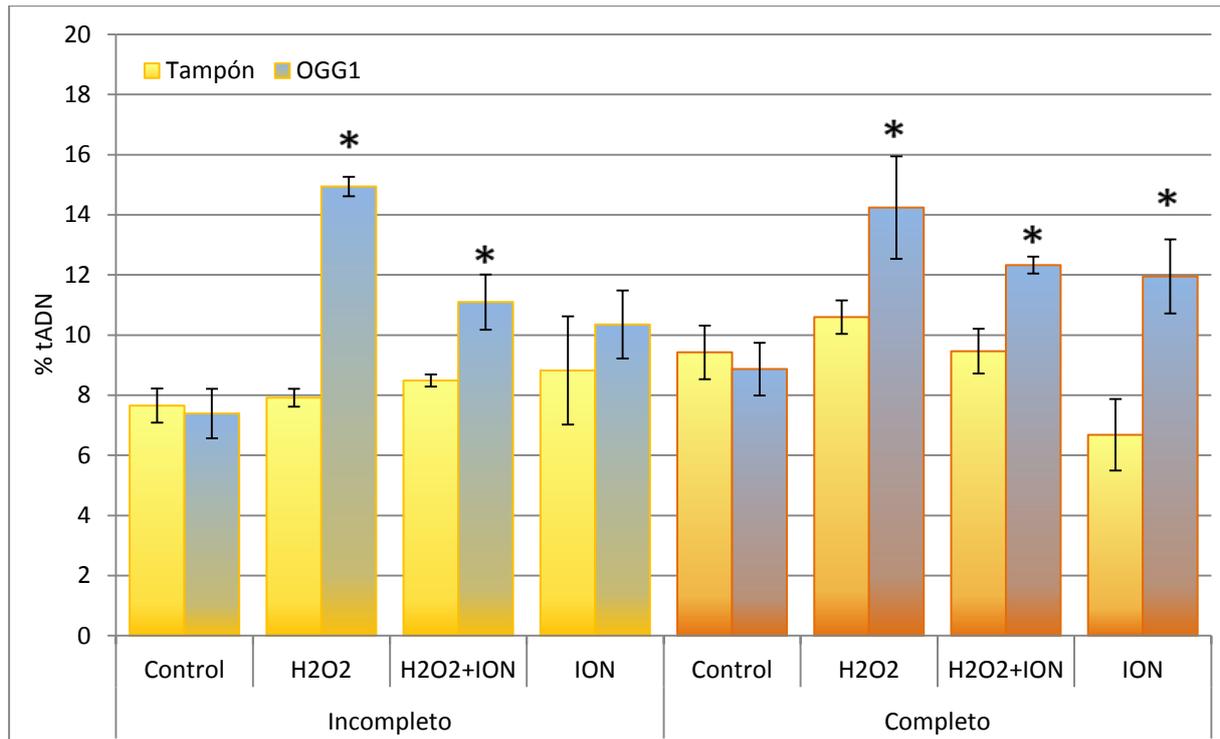
En los resultados obtenidos en medio incompleto el daño oxidativo significativo observado para el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya no se detecta cuando el tratamiento incluye incubación simultánea de la enzima con las ION, sugiriendo la existencia de interferencia de las ION con la actividad enzimática. No obstante, tras el tratamiento de las células con las ION a una concentración de 200µg/mL, se observa un incremento significativo en el daño oxidativo, lo que demuestra que la enzima OGG1 mantiene todavía cierta actividad en presencia de las ION.

Sin embargo, en medio completo el daño oxidativo (diferencia entre OGG1 y tampón) en las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo y en las que se ha realizado incubación con las ION fue significativo y similar, lo que indica ausencia de interferencia en estas condiciones.

En conjunto, los resultados indican interferencia de las ION recubiertas con ácido oleico con la enzima OGG1 en medio incompleto. No se han realizado estudios previos de interferencia de estas nanopartículas en diferentes medios, sin embargo un estudio de interferencia de las ION recubiertas con ácido oleico sin especificar el medio de dispersión con el ensayo del cometa con y sin enzima no encontró interferencia (Halamoda *et al.*, 2012<sup>b</sup>).

#### 4.2 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con sílice:

Al igual que se hizo con las ION recubiertas con ácido oleico, se analizó la posible interferencia de las ION recubiertas con sílice con la enzima OGG1. Los resultados obtenidos se muestran en la **(Figura 13)**.



**Figura 13:** Resultados correspondientes al estudio de interferencia de las ION recubiertas con sílice (200 $\mu$ g/mL) dispersadas en medio incompleto y completo, con la enzima OGG1. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al control \* $P < 0.05$ .

Los resultados obtenidos tanto para medio incompleto como completo muestran un incremento significativo similar en el %tADN en las células incubadas con la enzima respecto a las incubadas únicamente con el tampón para los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo y en los que además la incubación con la enzima se realizó en presencia de las ION, lo que demuestra ausencia de interferencia en estas condiciones.

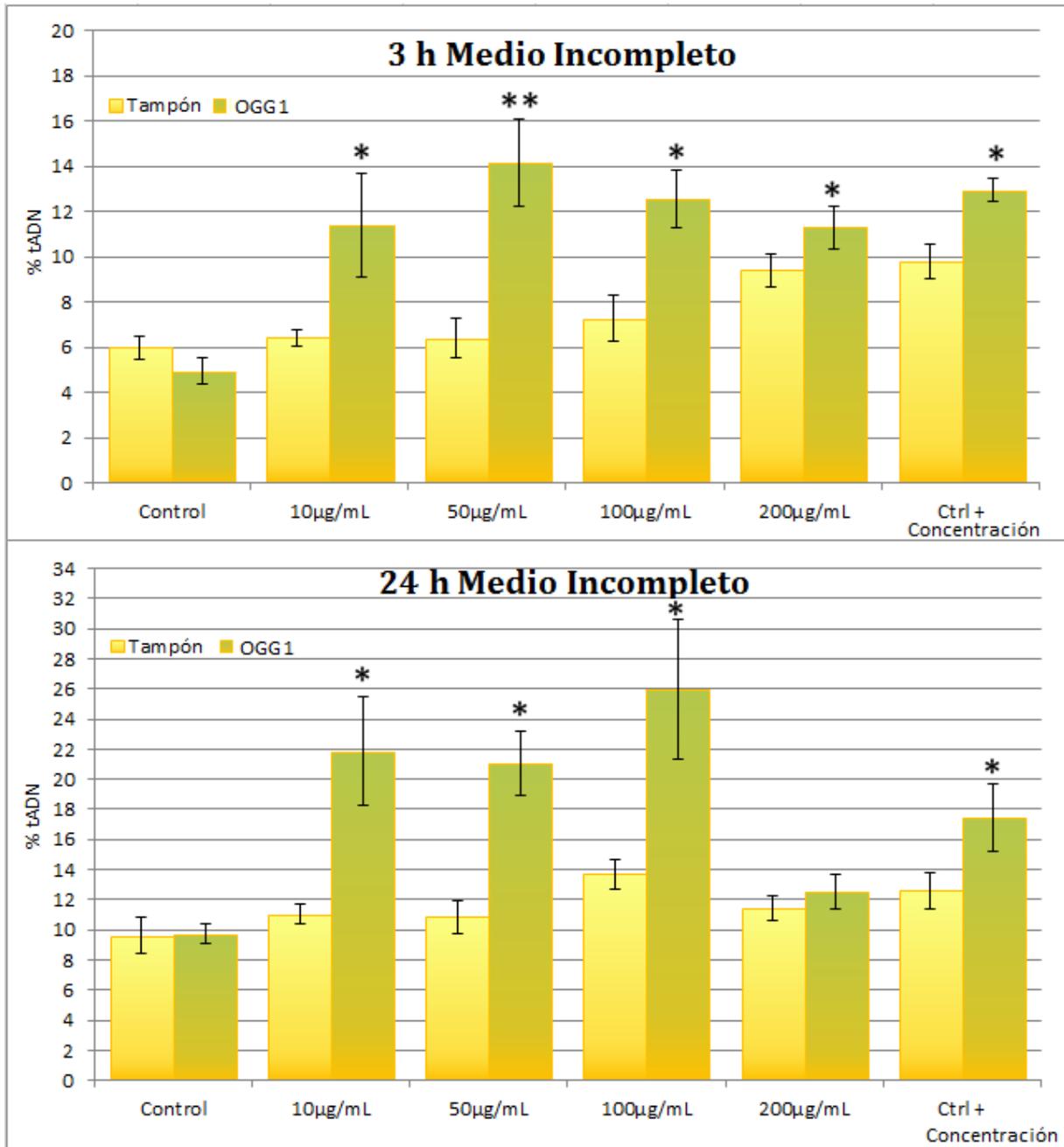
##### 5. Análisis del daño oxidativo en el ADN causado por las ION:

Al igual que se hizo previamente con el ensayo del cometa se expusieron las células neuronales a ambas nanopartículas dispersadas en medio incompleto y completo durante 3 y 24 horas, analizando por separado los posibles efectos en cuanto al daño oxidativo sobre el ADN.

### 5.1. Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con ácido oleico:

Al analizar los resultados obtenidos para las ION recubiertas con ácido oleico, es necesario tener en cuenta la interferencia previa mostrada por parte de estas nanopartículas con la enzima OGG1 en medio incompleto.

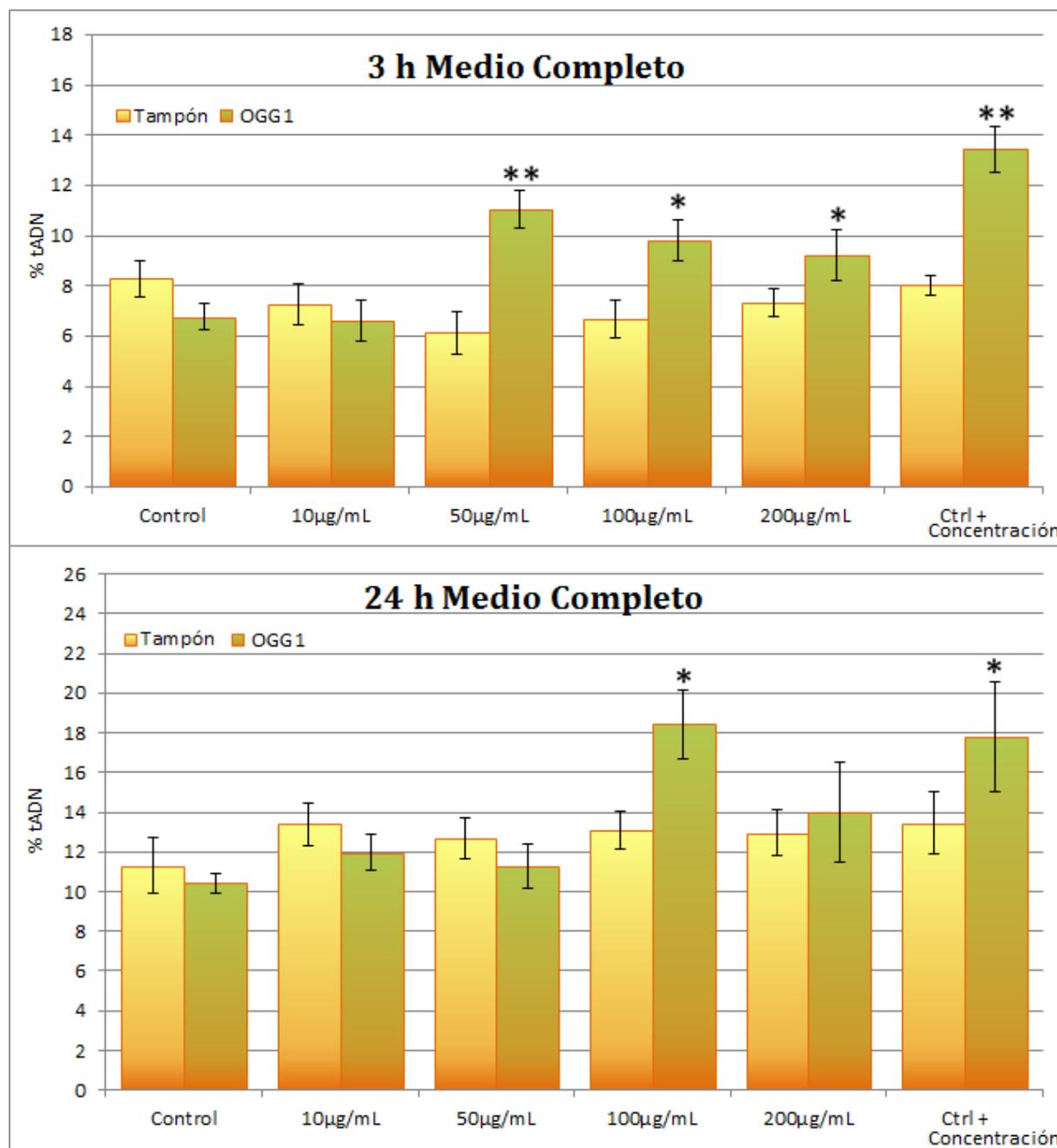
Los datos correspondientes a la incubación con estas nanopartículas en medio incompleto durante 3 y 24 horas mostraron diferencias significativas en la incubación con la enzima respecto al tampón, que indican capacidad de las ION de causar daño oxidativo (**Figura 14**). No obstante, debido a la interferencia detectada previamente, estos resultados deben ser comprobados mediante otras técnicas de determinación de daño oxidativo.



**Figura 14:** Resultados correspondientes a la determinación de daño oxidativo en el ADN realizado en las células neuronales tras 3 y 24 horas de incubación de ION recubiertas con ácido oleico dispersadas en medio incompleto. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al tampón \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

En cuanto al ensayo en medio completo, para el que previamente no se observaron interferencias entre las nanopartículas y la enzima, los resultados correspondientes a la incubación durante 3 y 24 horas mostraron capacidad de las nanopartículas de causar daño

oxidativo (**Figura 15**). En lo referente a la incubación durante 3 horas se detectaron diferencias significativas a partir de la concentración de 50µg/mL, mientras que al examinar el daño a 24 horas las ION recubiertas con ácido oleico produjeron daño oxidativo en el ADN únicamente a la concentración de 100µg/mL.



**Figura 15:** Resultados correspondientes a la determinación de daño oxidativo en el ADN realizado en las células neuronales tras 3 y 24 horas de incubación con ION recubiertas con ácido oleico dispersadas en medio

completo. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al tampón \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

En general, los resultados obtenidos respecto a la capacidad de las ION recubiertas con ácido oleico de causar daño oxidativo se corresponden con estudios previos (Halamoda *et al.*, 2012<sup>b</sup>). En la gráfica inferior de la **Figura 15** correspondiente a la incubación a 24 horas, se observa que las ION recubiertas con ácido oleico producen daño oxidativo en el ADN sólo a la concentración de 100µg/mL, al igual que ocurre con las ION recubiertas con oleato sódico y polietilen glicol que muestran daño oxidativo sólo a una concentración de 0.3mM (Mesárošová *et al.*, 2014). En conjunto no sólo las ION desnudas son capaces de producir daño oxidativo (Ahamed *et al.*, 2013, Guichard *et al.*, 2012), si no también algunas ION recubiertas con compuestos como son el oleato sódico conforme aumenta la concentración (Mesárošová *et al.*, 2014).

## 5.2 Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con sílice:

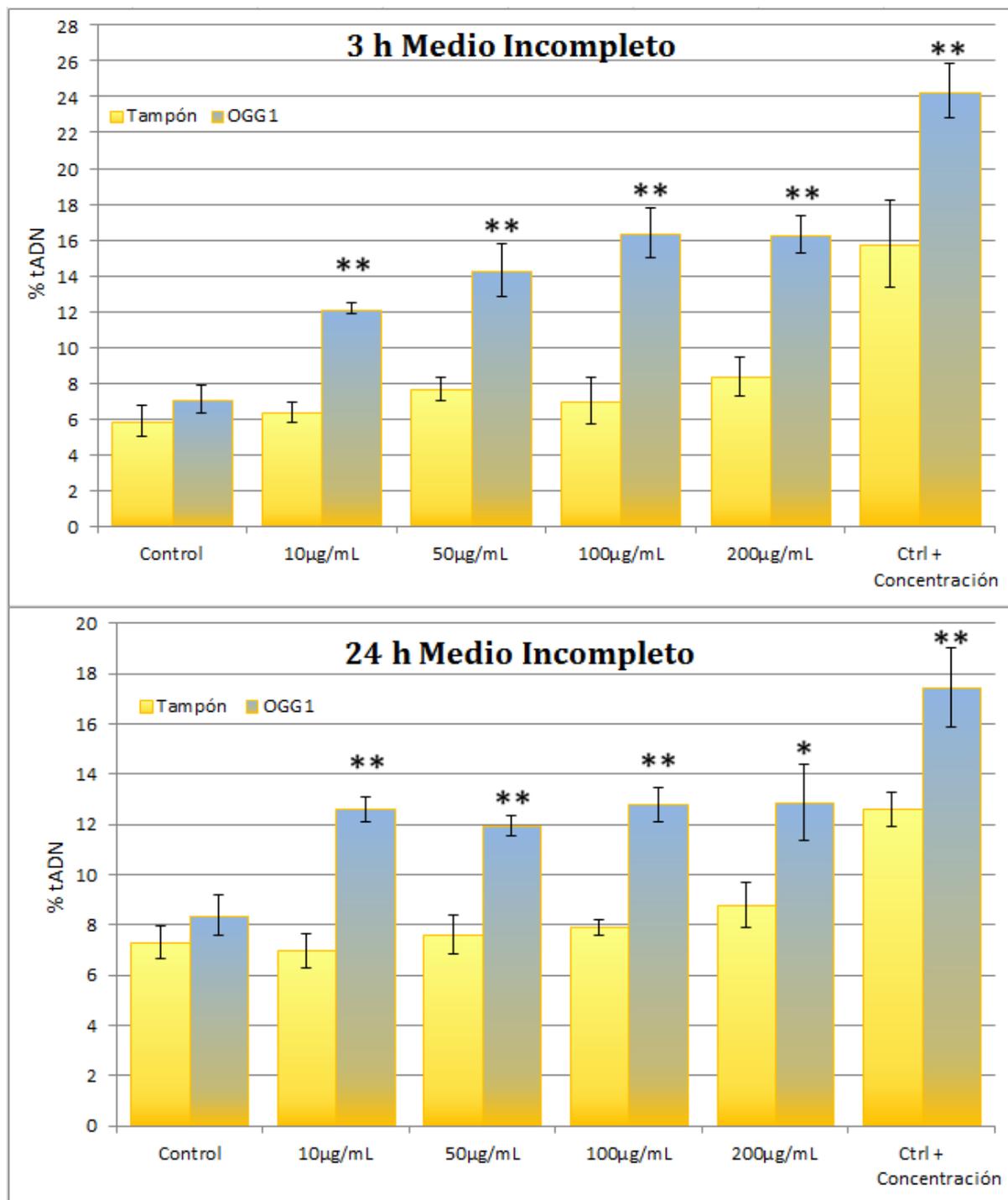
Al igual que se hizo con las ION recubiertas con el ácido oleico, se analizó el daño oxidativo causado por las ION recubiertas con sílice mediante el ensayo del cometa con OGG1. Sin embargo, en este caso no se encontró interferencia entre las nanopartículas y la enzima, por lo que el ensayo utilizado proporciona resultados fiables.

Las **Figuras 16 y 17** muestran el análisis por separado de los resultados obtenidos en función de los medios (incompleto y completo) y tiempos de incubación (3 y 24 horas).

Los datos correspondientes a la incubación con estas nanopartículas en medio incompleto durante 3 y 24 horas reflejan diferencias significativas similares que indican capacidad de las nanopartículas de causar daño oxidativo a todas las concentraciones testadas (**Figura 16**).

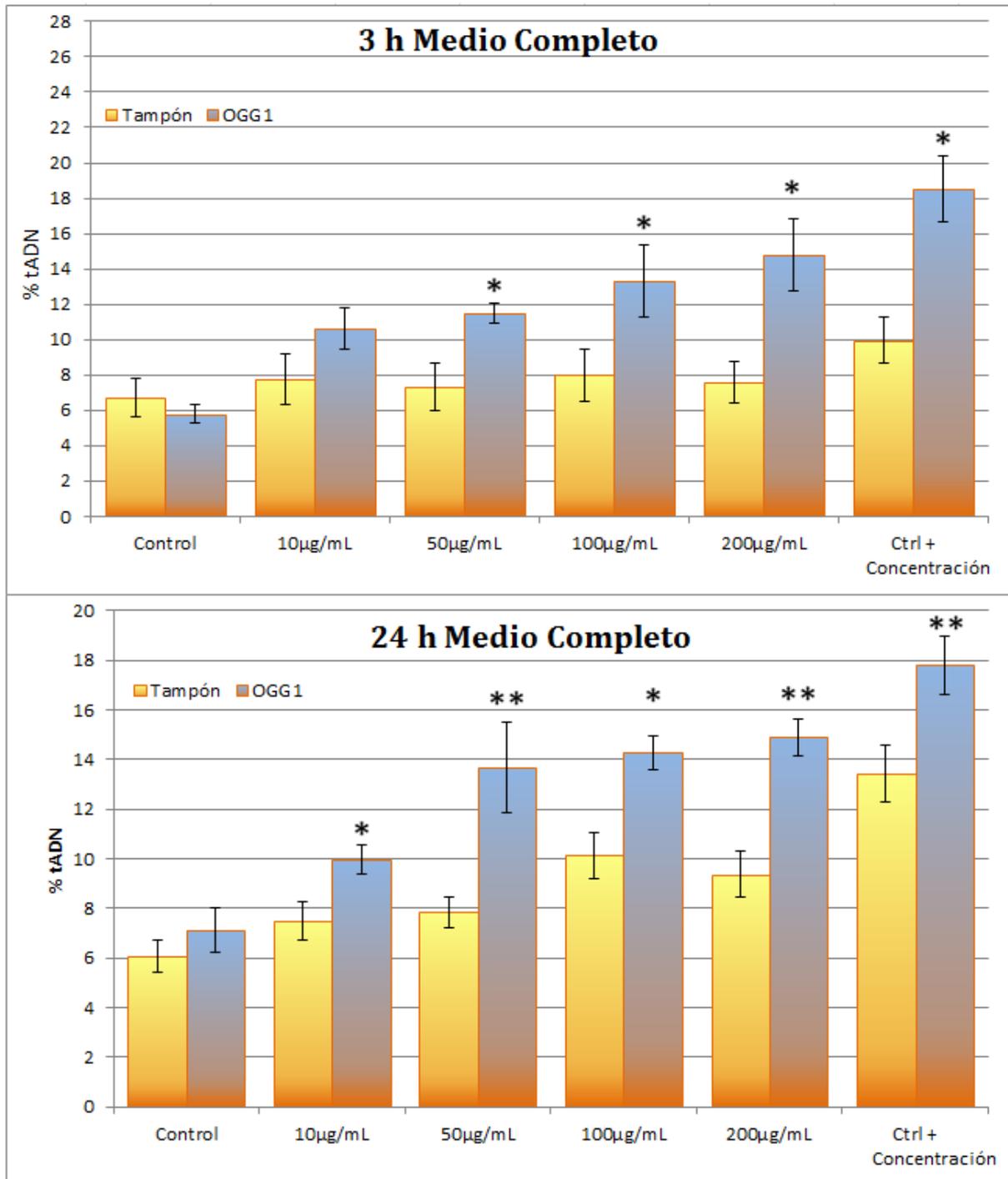
En cuanto al ensayo en medio completo, las gráficas correspondientes a la incubación con 3 y 24 horas mostraron capacidad de las nanopartículas de causar daño oxidativo. En lo referente a la incubación durante 3 horas se observan diferencias significativas a partir de la

concentración de 50µg/mL, mientras que a 24 horas las ION recubiertas con ácido oleico produjeron daño oxidativo en el ADN en todos los casos (**Figura 17**).



**Figura 16:** Resultados correspondientes a la determinación de daño oxidativo en el ADN realizado en las células neuronales tras 3 y 24 horas de incubación con ION recubiertas con sílice dispersadas en medio incompleto. Las

barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al tampón \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



**Figura 17:** Resultados correspondientes a la determinación de daño oxidativo en el ADN realizado en las células neuronales tras 3 y 24 horas de incubación con ION recubiertas con sílice dispersadas en medio completo. Las barras corresponden al error estándar de la media y los asteriscos se corresponden a la diferencia significativa respecto al tampón \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Los datos obtenidos muestran capacidad de producción de daño oxidativo en el ADN por parte de las ION recubiertas con sílice. Estos resultados se corresponden con estudios previos realizados con ION desnudas (Könczöl *et al.*, 2011), y con otras ION recubiertas con distintos compuestos como tween y murina que mostraron capacidad de producir daño oxidativo en el ADN a bajas concentraciones de nanopartículas (Cengelli *et al.*, 2006; Naqvi *et al.*, 2010). Sin embargo los resultados obtenidos no se corresponden con los observados para las mismas nanopartículas recubiertas con sílice en células pulmonares A459 y HELA, que no mostraban capacidad de producir daño en el ADN por ROS (Malvindi *et al.*, 2014).

**Conclusiones:**

Los resultados obtenidos en este estudio permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Ninguna de las dos ION utilizadas produjo interferencia con la metodología del ensayo del cometa estándar. Sin embargo las ION recubiertas de ácido oleico interfirieron con la actividad de la enzima OGG1 al estar dispersadas en medio de cultivo incompleto.
- Las ION recubiertas de sílice indujeron daño primario en el ADN de las células neuronales SHSY5Y cuando se testaron en medio completo, y daño oxidativo en el ADN tanto en medio completo como incompleto.
- Las ION recubiertas de ácido oleico causaron daño primario y oxidativo en el ADN en ambos tipos de medios. Sin embargo, debido a su inestabilidad en medio incompleto y a su interferencia con la enzima OGG1, la inducción de daño oxidativo por estas ION debe ser testada mediante metodologías adicionales.

## Bibliografía

- Ahamed, M., Alhadlaq, H.A., Alam, J., Majeed Khan, M.A., Ali, D. & Alarafi, S. «Iron Oxide Nanoparticle-induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Skin Epithelial and Lung Epithelial Cell Lines.» *Current Pharmaceutical Design*, 19 (2013): 6681-6690.
- Alwi, R., Telenkov, S., Mendelis, A., Leshuk, T., Gu, F., Oladepo, S. & Michaelian, K. «Silica-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION) as Biocompatible Contrast Agent in Biomedical Photoacoustics.» *Biomedical Optics Express*, 3 (2012): 2500-2509.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Bergelefranc, J-L., Botta, A., Wiesner, M.R. & Bottero, J-Y. «In Vitro Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblast: A Physicochemical and Cytogenotoxic Study.» *Environmental Science & Technology*, 40 (2006): 4367-4373.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.P. & Wiesner, M.R. «Towards a Definition of Inorganic Nanoparticles from an Environmental, Health and Safety Perspective.» *Nature Nanotechnology*, 4 (2009): 634-641.
- Bai, Y., Song, M., Cui, Y., Shi, C., Wang, D., Paoli, G.C. & Shi, X. «A Rapid Method for the Detection of Foodborne Pathogens by Extraction of a Trace Amount of DNA from Raw Milk Based on Amino-Modified Silica-Coated Magnetic Nanoparticles and Polymerase Chain Reaction.» *Analytica Chimica Acta*, 787 (2013): 93-101.
- Bell, T.E. *Understanding Risk Assessment of Nanotechnology*. National Nanotechnology Coordination Office, 2007.
- Bellova, A., Bystrenova, E., Koneracka, M., Kopcansky, P., Valle, F., Tomasovicova, N., Timko, M., Bagelova, J., Biscarini, F. & Gazova, Z. «Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles on Lysozyme Amyloid Aggregation.» *Nanotechnology*, 21 (2010): 065103.
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R.P.F., Hoffmann, E. & Dopp, E. «Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and DNA-Adduct Formation but not DNA-Breakage in Human Lung Cells.» *Particle and Fibre Toxicology*, 6 (2009): 17.

- Bjørnerud, A. & Johansson, L. «The utility of Superparamagnetic Contrast Agents in MRI: Theoretical Consideration and Applications in the Cardiovascular System.» *NMR in Biomedicine*, 17 (2004): 465-477.
- Cemeli, E., Baumgartner, A. & Anderson, D. «Antioxidants and the Comet Assay.» *Mutations Research*, 681 (2009): 51-67.
- Cengelli, F., Maysinger, D., Tschuddi-Monnet, F. «Interaction of Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Brain Structures.» *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318 (2006): 108-116.
- Chapa, C., Roacho, J.A., Martínez, C.A., Olivas, I., Jimenez, F., Castrejon, K.Y. & Garcia, P.E. «Surface Modified Superparamagnetic Nanoparticles: Interaction with Fibroblasts in Primary Cell Culture.» *Journal of Alloys and Compounds* (2014): DOI: 10.1016/j.jallcom.2014.01.155.
- Clift, M.J.D., Gehr, P. & Rothen-Rutishauser, B. «Nanotoxicology: a Perspective and Discussion of Whether or not In Vitro Testing is a Valid Alternative.» *Archives of Toxicology*, 85 (2011): 723-731.
- Collins, A. «The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations.» *Molecular Biotechnology*, 26 (2004): 249-261.
- Collins, A., Dušinská, M., Gedik, C.M. & Štětina, R. «Oxidative Damage to DNA: Do We Have a Reliable Biomarker?» *Environmental Health Perspectives*, 104 (1996): 465-469.
- Costa, S., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Mayan, O., Santos, L.S., Gaspar, J. & Teixeira, J.P. «Genotoxic Damage in Pathology Anatomy Laboratory Workers Exposed to Formaldehyde.» *Toxicology*, 252 (2008): 40-48.
- Dhawan, A., Bajpayee, M. & Parmar, D. «Comet Assay: a Reliable Tool for the Assessment of DNA Damage in Different Models.» *Cell Biology and Toxicology*, 25 (2009): 5-32.
- Freitas, M.L.L., Silva L.P., Azevedo R.B., García V.A.P., Lacava, L.M., Grisólia, C.K., Lucci, C.M., Morais, P.C., Da Silva, M.F., Buske, N., Curi, R. & Lacava, Z.G.M. «A Double-Coated Magnetite-Based Magnetic Fluid Evaluation by Cytometry and Genetic Tests.» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252 (2002): 396-398.

- Gedik, C.M. & Collins, A. «Establishing the Background Level of Base Oxidation in Human Lymphocyte DNA: Results of an Interlaboratory Validation Study.» *The FASEB Journal*, 19 (2005): 82-84.
- Guichard, Y., Schmit, J., Darne, C., Gaté, L., Goutet, M., Rousset, D., Rastoix, O., Wrobel, R., Witschger, O., Martin, A., Fierro, V. & Binet, S. «Cytotoxicity and Genotoxicity of Nanosized and Microsized Titanium Dioxide and Iron Oxide Particles in Syrian Hamster Embryo Cells.» *The Annals of Occupational Hygiene*, 56 (2012): 631-644.
- Gupta, A.K. & Gupta, M. «Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications.» *Biomaterials*, 26 (2005): 3995-4021.
- Häfeli, U.O., Riffle, J.S., Harris-Shekhawat, L., Carmichael-Baranauskas, A., Mark, F., Dailey, J.P. & Bardenstein, D. «Cell Uptake and in Vitro Toxicity of Magnetic Nanoparticles Suitable for Drug Delivery.» *Molecular Pharmaceutics*, 6 (2009): 1417-1428.
- Halamoda, B., Chapuis, C., Guney-Ayra, S. & Juillerat-Jeanneret, L. «Induction of Oxidative Stress, Lysosome Activation and Autophagy by Nanoparticles in Human Brain-Derived Endothelial Cells.» *The Biochemical Journal*, 441 (2012): 813-821.
- Halamoda, B., Chapuis, C., Hofmann, H. & Juillerat-Jeanneret, L. «Evaluation of Uptake and Transport of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles by Human Brain-Derived Endothelial Cells.» *Nanomedicine*, 7 (2012): 39-53.
- Hong, S.C., Lee, J.H., Lee, J., Kim, H.Y., Park, J.Y., Cho, J., Lee, J. & Han, D-W. «Subtle Cytotoxicity and Genotoxicity Differences in Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Coated with Various Functional Groups.» *International Journal of Nanomedicine*, 6 (2011): 3219-3231.
- Hu, Y.L. & Gao, J.Q. «Potential Neurotoxicity of Nanoparticles.» *International Journal of Pharmaceutics*, 394 (2010): 115-121.
- Huber, D.L. «Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles.» *Small*, 1 (2005): 482-501.
- Ito, A., Shinkai, M., Honda, H. & Kobayashi, T. «Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles.» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (2005): 1-11.
- Jadhav, N.V., Prasad, A.I., Kumar, A., Mishra, R., Dhara, S., Babu, K.R., Prajapat, C.L., Misra, N.L., Ningthoujam, R.S., Pandey, B.N. & Vatsa, R.K. «Synthesis of Oleic acid Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

- Magnetic Nanoparticles and Studying their Interaction with Tumor Cells for Potential Hyperthermia Applications.» *Colloids and Surfaces*, 108 (2013): 158-168.
- Jordan, A., Scholz, R., Maier-Hauff, K., Johannsen, M., Wust, P., Nadobny, J., Schirra, H., Schmidt, H., Deger, S., Loenig, S., Lanksch, W. & Felix, R. «Presentation of a New Magnetic Field Therapy System for the Treatment of Human Solid Tumors with Magnetic Fluid Hyperthermia.» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225 (2001): 118-126.
- Kain, J., Karlsson, H.L. & Möller, L. «DNA Damage Induced by Micro- and Nanoparticles—Interaction with FPG Influences the Detection of DNA Oxidation in the Comet Assay.» *Mutagenesis*, 27 (2012): 491-500.
- Karlsson, H., Guftafsson, J., Cronholm, P. & Möller, L. «Size-dependent Toxicity of Metal Oxide Particles—A Comparison Between Nano- and Micrometer Size.» *Toxicology Letters*, 188 (2009): 112-118.
- Kim, J.E., Shin, J.Y. & Cho, M.H. «Magnetic Nanoparticles: an Update of Application for Drug Delivery and Possible Toxic Effects.» *Archives of Toxicology*, 86 (2012): 685-700.
- Könczöl, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., Treude, F., Gminski, R., Gieré, R., Grobéty, B., Rothen-Rutishauser, B., Merfort, I. & Mersch-Sundermann, V. «Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) in A549 Human Lung Epithelial Cells: Role of ROS, JNK, and NF- $\kappa$ B.» *Chemical Research in Toxicology*, 24 (2011): 1460-1475.
- Kralj, S., Makovec, D., Čampelj, S. & Drogenik, M. «Producing Ultra-Thin Silica Coatings on Iron-Oxide Nanoparticles to Improve their Surface Reactivity.» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322 (2010): 1847–1853.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D. & Schnekenburger, J. «Interference of Engineered Nanoparticles with In Vitro Toxicity Assays.» *Archives of Toxicology*, 86 (2012): 1123-1136.
- Kunzmann, A., Andersson, B., Vogt, C., Feliu, N., Ye, F., Gabrielsson, S., Toprak, M.S., Buerki-Thurnherr, T., Laurent, S., Vahter, M., Krug, H., Muhammed, M., Scheynius, A. & Fadeel, B. «Efficient Internalization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles of Different Sizes by Primary Human Macrophages and Dendritic Cells.» *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253 (2011): 81-93.

- Li, Q., Tang, G., Xue, S., Xiaosong, H., Miao, P., Li, Y., Wang, J., Xiong, L., Wang, Y., Zhang, C. & Yang, G.Y. «Silica-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Targeting of EPCs in Ischemic Brain Injury.» *Biomaterials*, 34 (2013): 4982-4922.
- Ma, P., Luo, Q., Chen, J., Gan, Y., Du, J., Ding, S., Xi, Z. & Yang, X. «Intraperitoneal Injection of Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- Nanoparticle Induces Hepatic and Renal Tissue Injury Via Oxidative Stress in Mice.» *International Journal of Nanomedicine*, 7 (2012): 4809-4818.
- Magdolenova, Z., Drlickova, M., Henjum, K., Rundén-Pran, E., Tulinska, J., Bilanicova, D., Pjana, G., Kazimirova, A., Barancokova, M., Kuricova, M., Liskova, A., Staruchova, M., Ciampor, F., Vavra, I., Lorenzo, Y., Collins, A., Rinna, A. & Dušinská, M. «Coating-Dependent Induction of Cytotoxicity and Genotoxicity of Iron Oxide Nanoparticles.» *Nanotoxicology*, 2013: 1-13.
- Magdolenova, Z., Lorenzo, Y., Collins, A. & Dusinska, M. «Can Standard Genotoxicity Tests be Applied to Nanoparticles?» *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 75 (2012): 800-806.
- Maity, D. & Agrawal, D.C. «Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Under Oxidizing Environment and their Stabilization in Aqueous and Non-Aqueous Media.» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308 (2007): 46-55.
- Malvindi, M.A., De Matteis, V., Galeone, A., Brunetti, V., Anyfantis, G.C., Athanassiou, A., Cingolani, R. & Pompa, P.P. «Toxicity Assessment of Silica Coated Iron Oxide Nanoparticles and Biocompatibility Improvement by Surface Engineering.» *PLoS ONE*, 9 (2014): e85835.
- Martin, C.R., Preedy, V.R. & Hunter R.J. *Nanomedicine and Nervous System*. Jersey: CRC Press, 2012.
- McBain, S.C., Griesenbach, U., Xenariou, S., Keramane, A., Batich, C.D., Alton, E.W. & Dobson, J. «Magnetic Nanoparticles as Gene Delivery Agents: Enhanced Transfection in the Presence of Oscillating Magnet Arrays.» *Nanotechnology*, 19 (2008): 405102.
- Mesárošová, M., Kozics, K., Bábelová, A., Regendová, E., Pastorek, M., Vnuková, D., Buliaková, B., Rážga, F. & Gábelová, A. «The Role of Reactive Oxygen Species in the Genotoxicity of Surface-Modified Magnetite Nanoparticles.» *Toxicology Letters*, 226 (2014): 303-313.

- Monopoli, M.P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Bombeli, F.B. & Dawson, K.A. «Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles.» *Journal of the American Chemical Society*, 133 (2011): 2525–2534.
- Muller, K.H., Motskin, M., Philpott, A.J., Routh, A.F., Shanahan, C.M., Duer, M.J. & Skepper, J.N. «The Effect of Particle Agglomeration on the Formation of a Surface-Connected Compartment Induced by Hydroxyapatite Nanoparticles in Human Monocyte-Derived Macrophages.» *Biomaterials*, 35 (2014): 1074-1088.
- Muthu, M.S., Singh, S. «Targeted Nanomedicines: Effective Treatment Modalities for Cancer, AIDS and Brain Disorders.» *Nanomedicine*, 4 (2009): 105-118.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M. «Concentration-Dependent Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles Mediated by Increased Oxidative Stress.» *International Journal of Nanomedicine*, 5 (2010): 983-989.
- Östling, O. & Johanson, K.J. «Microelectrophoretic Study of Radiation-induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells.» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123 (1984): 291-298.
- Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K. & Dobson, J. «Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine.» *Journal of Physics*, 36 (2003): R167-R181.
- Park, S.I., Lim, J.H., Kim, J.H., Yun, H.I., Roh, J.S., Kim, C.G. & Kim, C.O. «Effects of Surfactant on Properties of Magnetic Fluids for Biomedical Application.» *Physica Status Solidi (b)*, 241 (2004): 1662–1664.
- Sadeghiani, N., Barbosa, L.S., Silva, L.P., Azevedo, R.B., Morais, P.C. & Lacava, Z.G.M. «Genotoxicity and Inflammatory Investigation in Mice Treated with Magnetite Nanoparticles Surface Coated with Polyaspartic Acid.» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 289 (2005): 466-468.
- Salata, O.V. «Applications of Nanoparticles in Biology and Medicine.» *Journal of Nanobiotechnology*, 2 (2004): 3.

- Santhosh, P.B. & Ulrih, N.P. «Multifunctional Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Promising Tools in Cancer Theranostics.» *Cancer Letters*, 336 (2013): 8-17.
- Singh, N., Jenkins, G.J.S., Asadi, R. & Doak, S.H. «Potential Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION).» *Nano Reviews*, 1 (2010): 5358.
- Singh, N., Jenkins, G.J.S., Nelson, B.C., Marquis, B.J., Maffei, T.G.G., Brown, A.P., Williams, P.M., Wright, C. & Doak, S.H. «The Role of Iron Redox State in the Genotoxicity of Ultrafine Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles.» *Biomaterials*, 33 (2012): 163-170.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L. «A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells.» *Experimental Cell Research*, 175 (1988): 184-191.
- Skaper, S.D., Floreani, M., Ceccon, M., Facci, L. & Giusti, P. «Excitotoxicity, Oxidative Stress, and the Neuroprotective Potential of Melatonin.» *Annals of the New York Academy of Sciences*, 890 (1999): 107-118.
- Smith, C.C., O'Donovan, M.R. & Martin, E.A. «hOGG1 Recognizes Oxidative Damage Using the Comet Assay with Greater Specificity than FPG or ENDOIII.» *Mutagenesis*, 21 (2006): 185-190.
- Soenen, S.J., De Cuyper, M., De Smedt, S.C. & Braeckmans, K. «Investigating the Toxic Effects of Iron Oxide Nanoparticles.» *Methods in Enzymology*, 509 (2012): 195-224.
- Souza, D.M., Andrade, A.L., Fabris, J.D., Valério, P., Góes, A.M., Leite, M.F. & Domingues, R.Z. «Synthesis and In Vitro Evaluation of Toxicity of Silica-Coated Magnetite Nanoparticles.» *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354 (2008): 4894-4897.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. & Sasaki Y.F. «Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing.» *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (2000): 206-221.
- Voinov, M.A., Sosa Pagán, J.O., Morrison, E., Smirnova, T.I. & Smirnov, A.I. «Surface-Mediated Production of Hydroxyl Radicals as a Mechanism of Iron Oxide Nanoparticle Biototoxicity.» *Journal of the American Chemical Society*, 133 (2011): 35-41.

- Wang, C., Ma, Q., Dou, W., Kanwai, S., Wang, G., Yuan, P. & Su, X. «Synthesis of Aqueous CdTe Quantum Dots Embedded Silica Nanoparticles and their Applications as Fluorescence Probes.» *Talanta*, 77 (2009): 1358–1364.
- Wang, J., Chen, Y., Chen, B., Ding, J., Xia, G., Gao, C., Jin, N., Jin, N., Zhou, Y., Li, X., Tang, M. & Wang, X.M. «Pharmacokinetic Parameters and Tissue Distribution of Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles in Mice.» *International Journal of Nanomedicine*, 5 (2010): 861-866.
- Weissleder, R., Stark, D.D., Engelstad, B.L., Bacon, B.R., Compton, C.C., White, D.L., Jacobs, P. & Lewis, J. «Superparamagnetic Iron Oxide: Pharmacokinetics and Toxicity.» *American Journal of Roentgenology*, 152 (1989): 167-173.
- Wu, J. & Sun, J. «Investigation on Mechanism of Growth Arrest Induced by Iron Oxide Nanoparticles in PC12 Cells.» *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11 (2011): 11079-11083.
- Wu, W., Chen, B., Cheng, J., Wang, J., Xu, W., Liu, L., Xia, G., Wei, H., Wang, X., Yang, M., Yang, L., Zhang, Y., Xu, C. & Li, J. «Biocompatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/DNR Magnetic Nanoparticles in the Treatment of Hematologic Malignancies.» *International Journal of Nanomedicine*, 5 (2010): 1079-1084.
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Meng, H., Kabehie, S., George, S., Zink, J.I. & Nel, A.E. «Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs.» *ACSnano*, 3 (2009): 3273-3286.
- Yi, D.K., Lee, S.S., Papaefthymiou, G.C. & Yieng, J.Y. «Nanoparticles Architectures Templated by SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanocomposites.» *Chemistry of Materials*, 18 (2006): 614-619.
- Yin, H., Casey, P.S., McCall, M.J. & Fenech, M. «Effects of Surface Chemistry on Cytotoxicity, Genotoxicity, and the Generation of Reactive Oxygen Species Induced by ZnO Nanoparticles.» *Langmuir*, 26 (2010): 15399-15408.
- Zhang, T., Qian, L., Tang, M., Xue, Y., Kong, L., Zhang, S. & Pu, Y. «Evaluation on Cytotoxicity and Genotoxicity of the L-Glutamic Acid Coated Iron Oxide Nanoparticles.» *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12 (2012): 2866-2873.

Zhao, J. & Castranova, V. «Toxicology of Nanomaterials Used in Nanomedicine: Part B.» *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 14 (2011): 593-632.