



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

CURSO 2014-2015

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE  
ÓXIDO DE HIERRO EN CÉLULAS NEURONALES HUMANAS  
MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Vº Bº Directoras del Trabajo

Dra. Dña. *Blanca Laffon Lage*

Dra. Dña. *Vanessa Valdiglesias García*

**NATALIA FERNÁNDEZ BERTÓLEZ**

**Junio 2015**





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MASTER IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AND GENETICS

2014-2015

DEPARTMENT OF CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

**ASSESSMENT OF IRON OXIDE  
NANOPARTICLE CYTOTOXICITY ON HUMAN NEURONAL  
CELLS BY FLOW CYTOMETRY**

Work approval by the Directors

*Dr. Blanca Laffon Lage*

*Dr. Vanessa Valdiglesias García*

**NATALIA FERNÁNDEZ BERTÓLEZ**

**June 2015**





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MÁSTER EN BIOLOXÍA MOLECULAR, CELULAR E XENÉTICA

CURSO 2014-2015

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR E MOLECULAR

**ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE  
ÓXIDO DE FERRO EN CÉLULAS NEURONAIAS HUMANAS  
MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUXO**

V. e Pr. Directoras do Traballo

Dra. Dna. *Blanca Laffon Lage*

Dra. Dna. *Vanessa Valdiglesias García*

**NATALIA FERNÁNDEZ BERTÓLEZ**

**Xuño 2015**





# 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 “*Estudio de la citotoxicidad de nanopartículas de óxido de hierro en células neuronales humanas mediante citometría de flujo*” presentado por Dña. Natalia Fernández Bertólez ha sido realizado bajo nuestra dirección. Considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, a 15 de junio de 2015

Fdo.:

Dra. Dña. *Blanca Laffon Lage*

Dra. Dña. *Vanessa Valdiglesias García*



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1. Nanotecnología y nanomateriales.....	2
2. Nanopartículas de óxido de hierro.....	4
2.1. Toxicidad general.....	6
2.2. Neurotoxicidad.....	7
2.3. Ensayos de citotoxicidad.....	8
2.3.1. Alteraciones del ciclo celular.....	9
2.3.2. Muerte celular.....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	14
1. Preparación y caracterización de las suspensiones de nanopartículas.....	14
2. Liberación de iones de hierro.....	15
3. Cultivo celular y tratamientos.....	15
4. Captación celular.....	16
5. Citotoxicidad.....	16
5.1. Ciclo celular.....	16
5.2. Muerte celular.....	17
6. Análisis estadístico.....	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	18
1. Caracterización de las nanopartículas.....	19
2. Liberación de iones de hierro.....	21
3. Análisis de la captación celular.....	22
4. Evaluación de la citotoxicidad.....	23
5.1. Ciclo celular.....	23
5.2. Muerte celular.....	25
<b>CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	30



## Resumen

Las propiedades físico-químicas especiales de los nanomateriales (materiales a escala nanométrica), relacionadas con su elevada área superficial y gran reactividad, los hacen útiles para numerosas aplicaciones en muy diversos ámbitos. Particularmente, las nanopartículas de óxido de hierro (ION, de *iron oxide nanoparticles*) han atraído mucha atención ya que tienen un gran potencial en muchas aplicaciones biomédicas, incluyendo técnicas de diagnóstico, terapia contra el cáncer y creación de fármacos altamente específicos, para lo que deben ser introducidas en el organismo. Sin embargo, son todavía escasos los estudios recogidos en la bibliografía sobre la toxicidad de estas nanopartículas a nivel celular y molecular. Además, estas partículas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica teniendo así acceso directo al tejido nervioso, sobre el que podrían ejercer acciones como la modificación de la neurofisiología sináptica, con consecuencias cruciales para el funcionamiento cerebral. Es por ello que resulta fundamental establecer sus posibles efectos sobre las células nerviosas, de los que hasta la fecha hay escaso conocimiento.

En este trabajo de investigación se ha realizado la caracterización de los efectos nocivos a nivel celular de ION (de magnetita) con aplicaciones biomédicas, en un estudio *in vitro* con células neuronales humanas. Las nanopartículas analizadas estaban recubiertas con sílice, para prevenir su agregación y mejorar su biocompatibilidad y biodistribución. Como parámetros de citotoxicidad se evaluaron las alteraciones en el ciclo celular y la muerte celular por apoptosis y necrosis.

A pesar de ser internalizadas de forma efectiva por las células neuronales, las ION presentaron en general baja citotoxicidad; únicamente se obtuvieron resultados positivos a las concentraciones más altas testadas y para el tiempo de exposición más prolongado.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una mejor comprensión de la interacción de las ION con los sistemas celulares y de sus posibles consecuencias, específicamente a nivel del sistema nervioso. Los datos generados podrán ser utilizados en la evaluación de riesgo de exposición a estas nanopartículas, y como base para el establecimiento de guías de buenas prácticas para el manejo de estos materiales.

## INTRODUCCIÓN

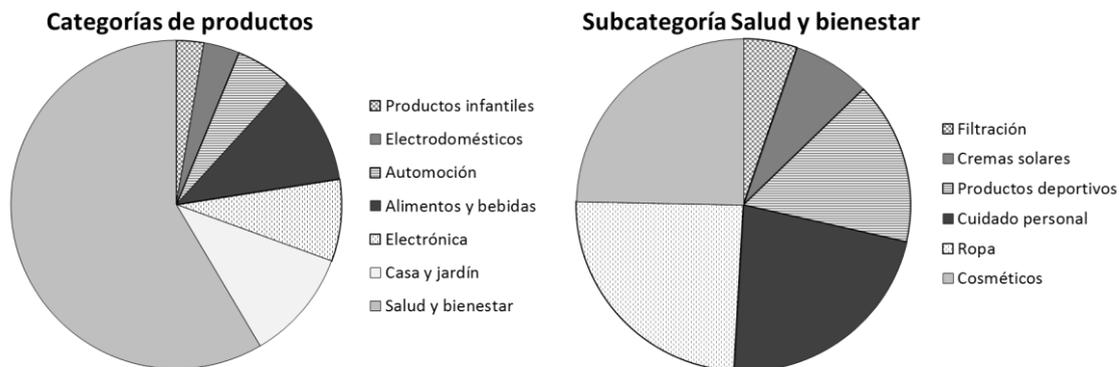
### 1. Nanotecnología y nanopartículas

La **nanotecnología** se puede definir como la investigación científica y el desarrollo tecnológico que permiten entender, a nivel atómico y molecular, todos los fenómenos que ocurren a escala nanométrica, con el fin de utilizar este conocimiento para crear estructuras, materiales, dispositivos y sistemas de complejidad creciente que posean nuevas propiedades y realicen nuevas funciones debido al pequeño tamaño de sus componentes. La nanotecnología se está desarrollando en estos momentos a un ritmo frenético en un número creciente de laboratorios de entidades públicas y privadas de todo el mundo, y en los últimos años ha crecido considerablemente la producción y empleo de nuevos nanomateriales en la industria para muy diversas aplicaciones (Savolainen *et al.*, 2010).

Los **nanomateriales** son, por definición, materiales cuyo tamaño oscila, en alguna de sus tres dimensiones, entre 1 y 100nm, confiriéndoles este pequeño tamaño propiedades únicas y diferentes de las del mismo material a mayor escala, debido fundamentalmente a la mayor área superficial, lo que les proporciona una reactividad muy superior (Auffan *et al.*, 2009a). Según el número de dimensiones que tengan en la nanoescala, estos materiales se clasifican en nanosuperficies (solo una dimensión), nanohilos o nanotubos (dos dimensiones) y nanopartículas (las tres dimensiones), siendo estas últimas las más frecuentemente utilizadas.

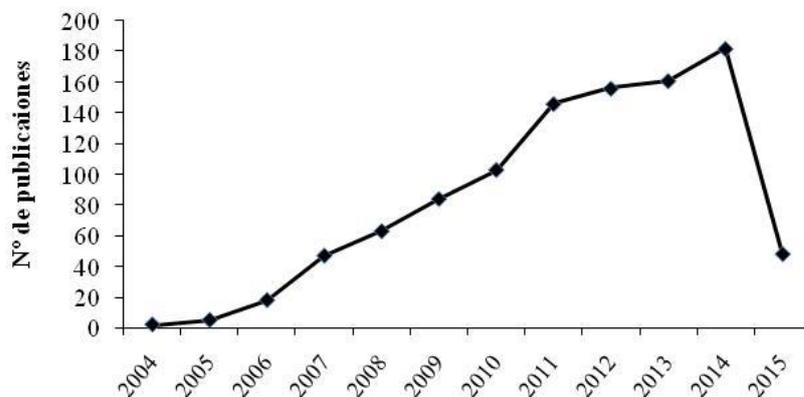
Los nanomateriales pueden ser orgánicos o inorgánicos, y su usos potenciales incluyen ahorro de energía para vehículos, desarrollo de energías renovables, disminución de la contaminación, filtración del agua, materiales de construcción, aplicaciones cosméticas (maquillajes, cremas de protección solar, etc.), textiles, electrónicas, pinturas y tintas, entre otras (Doak *et al.*, 2009). Asimismo, se han desarrollado aplicaciones biomédicas de las nanopartículas para liberación de medicamentos, terapias farmacológicas, prótesis, técnicas de imagen *in vivo*, diagnóstico *in vitro* e implantes activos (Salata, 2004; Wagner *et al.*, 2006). En concreto, en los últimos años se ha concentrado una gran atención en la utilización de nanopartículas para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades neurológicas, tales como las enfermedades de Parkinson o Alzheimer, la esclerosis múltiple, neoplasias del sistema nervioso o enfermedades neurodegenerativas visuales (Kanwar *et al.*, 2012).

Actualmente hay más de 1.500 productos comercializados con usos muy diversos que contienen nanomateriales (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución de los productos de consumo disponibles en el mercado que contienen nanomateriales (adaptado de la base de datos Woodrow Wilson, 2009).

Junto con el rápido crecimiento de la industria de la nanotecnología se produce la expansión de la cantidad y tipos de nanomateriales manufacturados, lo que da lugar a exposiciones ocupacionales potencialmente elevadas, y a exposición de la población general a través de la utilización de los productos que las contienen y de sus productos de desecho (Tetley, 2007). Es por ello que, desde la primera década de este siglo, existe una creciente preocupación por los potenciales efectos adversos para la salud humana de la exposición a nanomateriales. Esta preocupación se ve reflejada en un creciente número de artículos científicos publicados sobre “nanotoxicidad” o “nanotoxicología” en los últimos años; antes de 2005 eran prácticamente inexistentes (Figura 2).



**Figura 2.** Número de publicaciones científicas sobre “nanotoxicidad” o “nanotoxicología”. Datos obtenidos de la base de datos Thomson Reuters Web of Science™ (hasta mayo de 2015).

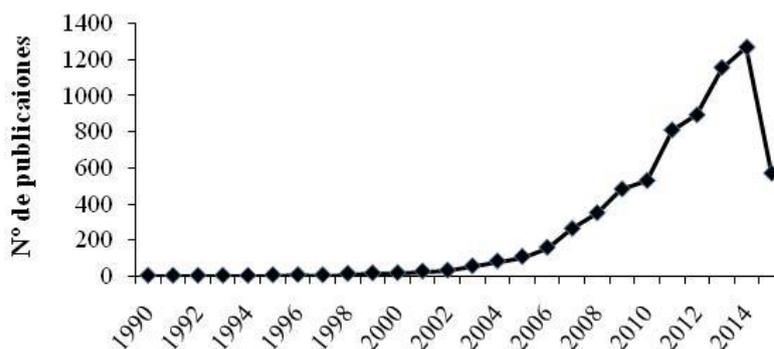
Numerosos autores muestran su acuerdo en que la progresiva presencia en el mercado de productos que contienen nanomateriales constituye un riesgo potencial emergente (Clift *et al.*, 2011), principalmente debido a que los posibles efectos tóxicos de estos nanomateriales no han sido todavía caracterizados y pueden diferir notablemente de los propios del material de que están compuestos cuando se encuentra en una escala mayor (Seaton *et al.*, 2010). La reducción en el tamaño proporciona una mayor biodisponibilidad, que se acompaña de un incremento en la capacidad para que los nanomateriales sean absorbidos por los sistemas biológicos (Das *et al.*, 2009). Además, las partículas y materiales en el rango nanométrico pueden causar daños debido a su elevada reactividad (Santamaria, 2012). Los organismos vivos están compuestos de células cuyo tamaño es habitualmente de 10-100µm. Sin embargo, los componentes celulares son mucho más pequeños, y las proteínas, el ADN y otras biomoléculas son incluso menores, encontrándose en un rango característico de tan solo 5-50nm. Esta sencilla comparación de tamaños da una idea de que los nanomateriales pueden resultar útiles para acceder a la maquinaria celular con objetivos diversos (Salata, 2004; Taton, 2002), pero también pueden interaccionar fácilmente con cualquier componente celular para causar efectos tóxicos.

Como consecuencia, instituciones y organizaciones de todo el mundo, tales como el *US National Institute for Occupational Safety and Health* (2006), el *Department for Environment, Food and Rural Affairs of the United Kingdom Government* (2007), la *European Commission Joint Research Centre* (2011) y el *DECHEMA/VCI working group "Responsible Production and Use of Nanomaterials"* (2011) resaltan la necesidad de incrementar el conocimiento sobre este tema y han publicado informes en los que se establece el riesgo potencial de los nanomateriales y se identifican prioridades para acciones futuras, ya que muchas cuestiones permanecen abiertas y la información disponible sobre la exposición a estos nuevos materiales es hoy día todavía muy limitada.

## **2. Nanopartículas de óxido de hierro**

Las nanopartículas de óxido de hierro (ION, de *iron oxide nanoparticles*) acaparan mucha atención no sólo por sus propiedades superparamagnéticas (que consisten en poseer un elevado momento magnético en presencia de un campo magnético externo, pero cuando el campo es cero no presentan momento magnético remanente), sino

también porque tienen un gran potencial para ser utilizadas en muchas aplicaciones biomédicas como la liberación de medicamentos (Sun *et al.*, 2008; Vasir y Labhasetwar, 2005), el incremento del contraste en imagen por resonancia magnética (Bjørnerud y Johansson, 2004; Lodhia *et al.*, 2010) y la destrucción dirigida de tejidos tumorales a través de la hipertermia que producen al someterse a campos magnéticos alternos (Moroz *et al.*, 2002; Le Renard *et al.*, 2010). En la Figura 3, que muestra los artículos científicos publicados sobre ION desde 1989, se observa un incremento muy notable en estos trabajos desde el inicio del siglo XXI. Específicamente en lo que se refiere a aplicaciones neurológicas, las ION pueden utilizarse en el seguimiento de células madre trasplantadas, en la identificación de eficiencias de transcripción, y en la detección de péptidos beta-amiloides en enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer (revisado en Suh *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Número de publicaciones científicas sobre “nanopartículas de óxidos de hierro”. Datos obtenidos de la base de datos Thomson Reuters Web of Science™ (hasta mayo de 2015).

Hay varios tipos de ION, en los que se incluyen la hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), la maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). De entre ellos, la magnetita resulta muy prometedora debido a su probada biocompatibilidad (Gupta y Gupta, 2005).

En general, las ION tienden a agregarse, por lo que se **recubren** con diferentes materiales (e.g. sílice, dextrano, ácido oleico, citrato, etc.) para estabilizarlas, prevenir su agregación, ser utilizadas de forma efectiva en aplicaciones clínicas y mejorar su biocompatibilidad y biodistribución. Estos recubrimientos pueden modificar la toxicidad de las ION incrementando o reduciendo su interacción con diversos componentes celulares (Singh *et al.*, 2009). Así por ejemplo, Sun *et al.* (2007) demostraron que ION recubiertas con oleato sódico presentaban una mejor

biocompatibilidad, propiedades magnéticas y dispersión, que si se recubrían con polietilenglicol. Por otra parte, la estabilidad de estos recubrimientos y las consecuencias de su alteración en el medio ambiente celular son todavía desconocidas.

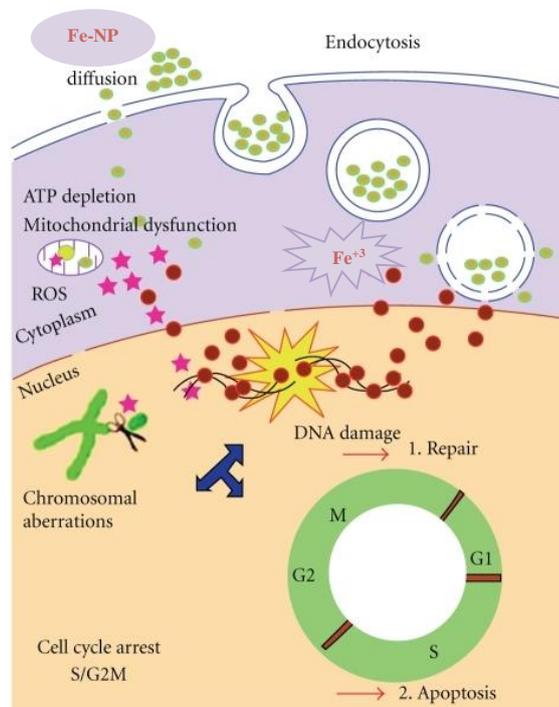
Las ION son biodegradables; son procesadas por las células como parte del metabolismo fisiológico del hierro, evidenciado por el incremento temporal en los valores de hierro libre en suero tras su administración (Weissleder *et al.*, 1989). Sin embargo, este proceso también depende en gran medida del recubrimiento de las partículas. El hierro es un metal esencial fundamentalmente por su capacidad redox, pero altos niveles de iones de hierro libres pueden causar desequilibrios en la homeostasis orgánica y conducir a estrés oxidativo (Puntarulo, 2005) y respuestas celulares aberrantes que incluyen daño en el ADN, eventos epigenéticos y procesos inflamatorios (Häfeli *et al.*, 2009; Veranth *et al.*, 2007).

### 2.1. Toxicidad general

Dado que varias de las aplicaciones de las ION – como el diagnóstico por imagen, la liberación de medicamentos o la destrucción de tumores por hipertermia – requieren su **introducción en el organismo humano**, el conocimiento de los riesgos potenciales asociados con la exposición a estas nanopartículas resulta esencial. De hecho, ya hay agentes de contraste que contienen ION que han sido aprobados para su uso en clínica para imagen por resonancia magnética y están disponibles comercialmente (Soenen y De Cuyper, 2010).

En general, parece que las ION inducen mayores niveles de toxicidad que las partículas mayores de este material. En concreto, se ha observado que estas nanopartículas inducen ligera o ninguna toxicidad celular (**citotoxicidad**) en estudios con distintas células eucariotas (Avdeev *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2005; Hildebrand *et al.*, 2010; Karlsson *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Xiao-Feng *et al.*, 2009; Xuan *et al.*, 2011), aunque también se han descrito resultados positivos (Choi *et al.*, 2009). Además, todavía no está claro si se pueden producir otras respuestas celulares como consecuencia de la exposición a estas nanopartículas, incluso en ausencia de citotoxicidad, tales como daño en el ADN, estrés oxidativo, disfunción de la membrana mitocondrial o alteraciones en la dinámica del ciclo celular (Figura 4). De todos estos trabajos se recoge que los resultados obtenidos hasta la fecha en lo referente a la citotoxicidad de las ION no son en absoluto concluyentes, probablemente debido al

uso de ION con diferente tamaño, carga, estado de agregación, pureza o recubrimiento, y a los diferentes sistemas de evaluación utilizados (Zhao y Castranova, 2011), por lo que se requieren estudios detallados con diferentes variantes de ION, ya que la interacción de éstas con los sistemas celulares puede diferir de forma importante (Kunzmann *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Ilustración de la captación de nanopartículas de óxido de hierro, y los mecanismos a través de los cuales puede generar toxicidad para las células (adaptado de AshaRani *et al.*, 2009).

## 2.2. Neurotoxicidad

Por otra parte, los estudios sobre la posible **neurotoxicidad** y los efectos de las ION sobre el sistema nervioso son muy escasos. Hoy en día, existe una imperiosa necesidad de estudiar y caracterizar los efectos que la exposición a estas nanopartículas pueda ejercer sobre el tejido neural, especialmente desde que se han obtenido evidencias irrefutables de que algunas nanopartículas pueden acceder al cerebro de pequeños animales, directamente a través de transporte axonal por el nervio olfatorio (Wang *et al.*, 2009) o indirectamente atravesando la barrera hematoencefálica tras diferentes rutas de administración (revisado en Hu y Gao, 2010). El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo, debido a su elevado contenido en ácidos grasos fácilmente peroxidables, a su alta tasa de consumo de oxígeno y a su relativa escasez en enzimas antioxidantes comparado con otros órganos (Skaper *et al.*, 1999). En consecuencia, es

preciso evaluar detalladamente la neurotoxicidad de las ION, ya que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer o la corea de Huntington (Kim *et al.*, 2012). La información de la que se dispone actualmente sobre las consecuencias de la exposición de células neuronales a ION es también escasa. El tratamiento de células neuronales de rata (PC12) con estas nanopartículas produjo una pérdida severa de la viabilidad celular y de la capacidad de diferenciación (Pisanic *et al.*, 2007); sin embargo, no se observó citotoxicidad tras el tratamiento, aunque sí afectó a la adhesión celular y se incrementó el contenido de hierro intracelular en astrocitos (Au *et al.*, 2007; Geppert *et al.*, 2009 y 2011) y en oligodendrocitos (Hohnholt *et al.*, 2010), ambos de rata.

### 2.3. Ensayos de citotoxicidad

Como hemos mencionado anteriormente, las ION ya se utilizan como agentes de contraste y son también empleadas para numerosos fines de investigación biomédica; una de las principales aplicaciones es el marcaje *in vitro* de las células madre, lo que les permite ser rastreadas posteriormente *in vivo* tras su trasplante (Soenen y De Cuyper, 2009). Para hacer esto posible, las nanopartículas utilizadas no deben causar ningún signo de citotoxicidad ni afectar a la fisiología celular, ya que podrían impedir la funcionalidad normal de las células *in vivo* o conducir a efectos secundarios no deseados.

La evaluación de la **biocompatibilidad** de las nanopartículas ha demostrado ser una difícil tarea. Requiere de la realización de una batería de ensayos *in vitro*, con el fin de evaluar aspectos diversos tales como la viabilidad celular, la integridad de membrana plasmática, la producción de especies reactivas de oxígeno, la liberación de iones metálicos, la captación celular de las nanopartículas, la morfología celular, la proliferación celular, la arquitectura del citoesqueleto de actina, los diversos tipos de muerte celular y la diferenciación de las células madre (Maurici *et al.*, 2005; Valdiglesias *et al.*, 2013). Estos ensayos son necesarios, ya que proporcionan información relevante y complementaria sobre la caracterización de los mecanismos de acción de las nanopartículas, así como para intentar establecer la relación entre la concentración de nanopartículas en el sitio diana y el posible efecto citotóxico (Valdiglesias *et al.*, 2013). Existen artículos previos que incluyen extensas revisiones sobre la **citotoxicidad** de las ION (Soenen y De Cuyper, 2010; Suh *et al.*, 2009).

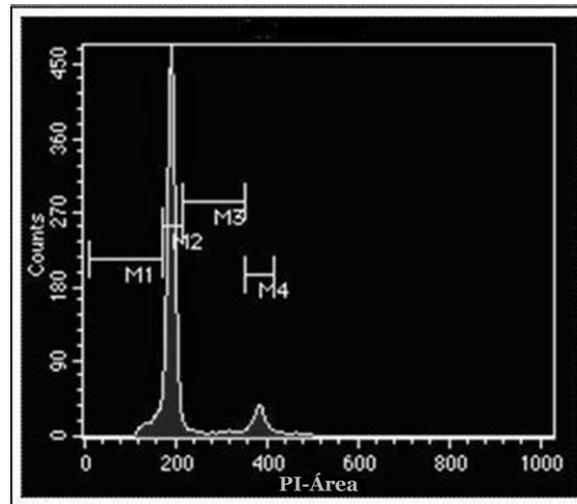
### 2.3.1. Alteraciones del ciclo celular

El ciclo celular se divide en distintas fases: en la fase G<sub>0</sub> las células están en reposo o quiescentes; en la fase G<sub>1</sub> las células se recuperan de la división celular o inician un nuevo ciclo; en la fase S se replica el ADN para que tras la división cada célula hija posea una copia completa del material genético; en la fase G<sub>2</sub> termina la síntesis de ADN y las células se preparan para la división; y finalmente en la fase M o mitosis se produce la división en dos células hijas (Longobardi, 1992). En general, el daño en el ADN celular puede dar lugar a dos consecuencias: el ciclo celular se detiene en puntos específicos para que la maquinaria de reparación actúe sobre el ADN dañado, o bien si el daño no puede ser reparado la célula entra en apoptosis y muere (Goodger *et al.*, 1997).

La cantidad de ADN es diferente entre organismos de distintas especies, pero es la misma en todas las células del mismo organismo (salvo determinadas excepciones: células meióticas, células cancerígenas...), por esto la cantidad de ADN en las células puede ser usada para estudiar la evolución del ciclo celular de una determinada población celular e identificar anomalías, principalmente relacionadas con diversas patologías y procesos cancerígenos (Macey, 2007). La citometría de flujo es la metodología idónea para llevar a cabo el análisis del ciclo celular porque emplea marcadores que se unen específicamente al material genético proporcionando información exacta de la cantidad ADN presente en cada momento. Esto permite su cuantificación e identificación de las células normales diploides o en reposo, aquellas que están en la fase de síntesis de nuevo ADN, y aquellas que se encuentran en fase premitótica o mitótica (Macey, 2007).

La medida del ADN fue una de las primeras aplicaciones de la citometría de flujo y aún es una de las más empleadas. El protocolo más utilizado con este fin es aquel que describe el uso del yoduro de propidio (PI) como colorante del ADN. Sus principales ventajas son la facilidad de uso, su estabilidad y su espectro de absorción/emisión, que le hace válido para la mayoría de citómetros de flujo. Sus longitudes de onda de excitación y emisión son de alrededor de 490 y 630nm respectivamente (Longobardi, 1992). Las moléculas de PI se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos y se forma así un complejo que emite fluorescencia roja brillante en el núcleo de las células. La unión es estequiométrica, aunque este pigmento no es específico del ADN, por lo que la muestra debe ser tratada previamente con RNAsa para eliminar el ARN

celular. El histograma de contenido de ADN obtenido en la evaluación citométrica proporciona una visión de la distribución de los distintos tipos de núcleos presentes en un momento determinado (Figura 5).



**Figura 5.** Histograma de contenido de ADN medido por citometría de flujo para el análisis del ciclo celular, señalando las regiones subG<sub>1</sub> (M1), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (M2), S (M3) y G<sub>2</sub>/M (M4).

En él se observan tres poblaciones celulares principales: células con contenido de ADN 2n (células en G<sub>0</sub> o en G<sub>1</sub>) (Figura 5, M2), células con contenido de ADN 4n (células en G<sub>2</sub> o en M) (Figura 5, M4) y células con contenido de ADN en un rango de entre 2n y 4n (células en fase S) (Figura 5, M3) (Macey, 2007). Las células con un contenido de ADN inferior a 2n (región subG<sub>1</sub>) (Figura 5, M1) también son evaluadas en este histograma puesto que son indicativas de fragmentación del ADN, propio de las últimas etapas de la apoptosis (Fraker *et al.*, 1995).

### 2.3.3. Muerte celular

Cuando una célula está expuesta a un determinado agente tóxico éste puede inducir su muerte a través de distintos mecanismos, pero también puede ocurrir que alguna estructura celular resulte dañada o alterada como consecuencia del contacto con este tóxico. Si la célula no es capaz de reparar este daño entrará igualmente en un proceso de muerte autoinducida y morirá.

Actualmente se conocen distintos tipos de muerte celular que han sido definidos y clasificados, fundamentalmente en base a criterios morfológicos, en apoptosis, necrosis, autofagia, y muerte celular asociada a catástrofe mitótica (Duprez *et al.*, 2009).

La autofagia es un proceso en el cual citoplasma y los orgánulos son secuestrados en vesículas con membrana celular duplicada, liberando su contenido dentro de lisosomas, para su degradación y el reciclaje de macromoléculas (De Toro, 2006). Este proceso ocurre de forma natural en todas las células eucariotas y constituye el recambio de proteínas y orgánulos. Pero además de su papel en la degradación celular, la autofagia también puede actuar como un mecanismo de defensa contra la invasión de bacterias y virus así como promover un tipo de muerte celular programada que se ha asociado a varias enfermedades humanas, incluido el cáncer (Hait *et al.*, 2006), cardiomiopatías (Kunapuli *et al.*, 2006) y enfermedades neurodegenerativas (Bursch *et al.*, 2005).

La muerte celular asociada a catástrofe mitótica se produce por fallos en los sistemas de chequeo (*checkpoints*) del ciclo celular, ya que fracasan en detener la mitosis antes o durante el proceso, permitiendo una segregación aberrante de los cromosomas, lo que determina la activación de una apoptosis defectuosa y muerte celular (Castedo *et al.*, 2004). En términos morfológicos se trata de una muerte celular que resulta de una mitosis anormal, formándose células con múltiples micronúcleos y cromatina no condensada, y que difiere de la apoptosis en que el empleo de inhibidores de caspasas no impiden el proceso (Nabha *et al.*, 2002; Roninson *et al.*, 2001).

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso ordenado que puede activarse por diferentes estímulos apoptóticos y que está regulado por numerosos factores a través de distintas vías apoptóticas (Xing *et al.*, 2008). Este tipo de muerte celular es un proceso fisiológico complejo, dependiente de energía y caracterizado por diversos cambios morfológicos y bioquímicos de la célula (Elmore, 2007). No obstante, aunque la apoptosis puede ser inducida en células sanas por la exposición a distintos agentes, este tipo de muerte celular es un proceso que ocurre, bajo condiciones fisiológicas normales, de forma habitual en los organismos eucariotas pluricelulares para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos (Macey, 2007). Las desregulaciones de la apoptosis están implicadas en diferentes estados de enfermedades como las neurodegenerativas y el cáncer.

En células viables normales, los fosfolípidos están asimétricamente distribuidos entre la cara externa e interna de la membrana plasmática, así la fosfatidilcolina y esfingomiélinas están expuestas en la parte externa de la bicapa lipídica, mientras que la

fosfatidilserina se halla predominantemente en la cara interna o citosólica de la membrana. La exposición de la fosfatidilserina en la superficie externa de la bicapa se produce en células apoptóticas, ocurriendo en fases tempranas durante las cuales la membrana celular aún permanece intacta. La fosfatidilserina expuesta en el exterior de la membrana funciona como un marcador celular para el reconocimiento y fagocitosis de la célula por parte de los macrófagos (Fadok *et al.*, 1992).

Se han descrito dos vías principales de muerte celular por apoptosis en células de mamíferos: la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca. Ambas vías conducen a la contracción celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, y la exposición de la fosfatidilserina en la superficie externa de la membrana plasmática. Tras estos procesos, en la superficie celular se producen vesículas y protuberancias que se rompen y separan del cuerpo celular para dar lugar a cuerpos apoptóticos de diverso tamaño, formados por trozos del cuerpo celular con fragmentos del núcleo, membrana citoplasmática y citoplasma con orgánulos intactos. La apoptosis culmina con la fagocitosis de estos cuerpos apoptóticos por las células vecinas (Jayaraj *et al.*, 2009).

La necrosis es otro tipo de muerte celular. Está considerada como un proceso tóxico en el que la célula es una víctima pasiva y sigue un modo de muerte independiente de energía (Elmore, 2007). La muerte celular necrótica se caracteriza por la inflamación en citoplasma y orgánulos, seguida por la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática y la liberación del contenido celular al espacio extracelular circundante (Duprez *et al.*, 2009). Hasta hace poco tiempo se creía que este tipo de muerte celular era accidental o incontrolada, de hecho en muchos textos de consulta siguen refiriéndose a ella como “muerte accidental”. Hoy se sabe que sólo es así en casos de daño físico severo, como hipertermia, hipoxia o exposición a detergentes, pero que existen también vías independientes de caspasas que llevan a cabo la necrosis de una forma ordenada y regulada (Chautan *et al.*, 1999). La apoptosis se diferencia morfológicamente de la necrosis en que, en el primer caso, la membrana citoplasmática permanece intacta durante el proceso (Macey, 2007).

Por todo lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se planteó la evaluación *in vitro* de un amplio espectro de aspectos relacionados con la **citotoxicidad de ION en células neuronales humanas**, como primer paso en el conocimiento de la interacción de estas nanopartículas con el organismo, en concreto con el sistema nervioso.

## **OBJETIVOS**

Como se ha mencionado anteriormente, las ION tienen gran utilidad por sus numerosas aplicaciones biomédicas; sin embargo su toxicidad no ha sido descrita en profundidad y hasta la fecha no existen estudios en la bibliografía que detallen sus efectos a nivel celular o molecular en células neuronales humanas. Es por ello que en el presente trabajo se realizó el análisis y la caracterización de los efectos citotóxicos de ION recubiertas con sílice, un tipo especial de ION con utilidad en aplicaciones biomédicas, en un estudio *in vitro* con células neuronales tratadas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Los objetivos concretos que se plantearon en este trabajo son los siguientes:

1. Caracterizar las propiedades físico-químicas de las nanopartículas en suspensión acuosa (tamaño, morfología, reactividad química superficial, tamaño hidrodinámico medio y potencial zeta), su capacidad para liberar iones de hierro al medio y su posible captación por parte de las células neuronales.
2. Analizar los efectos citotóxicos que pueda ocasionar la exposición a las ION en células neuronales, estudiando para ello las alteraciones del ciclo celular y los índices de muerte celular por apoptosis y necrosis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Preparación y caracterización de las suspensiones de nanopartículas

Para realizar este trabajo se utilizaron nanopartículas de núcleo de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recubiertas con sílice (tamaño aproximado 20nm) que fueron sintetizadas y preparadas en forma de suspensiones madre estables (5mg/ml, en agua) siguiendo el protocolo descrito por Yi *et al.* (2006) por la empresa suministradora. Antes de cada tratamiento, se preparó una suspensión intermedia de 1mg/ml en agua y en medio de cultivo completo (suplementado con suero bovino fetal), que fue sonicada utilizando un baño de ultrasonidos durante 5min para garantizar una buena dispersión de las nanopartículas. Para las posteriores concentraciones de ION necesarias para los distintos tratamientos, se prepararon diluciones seriadas partiendo de esta suspensión intermedia que fueron igualmente sonicadas inmediatamente antes de su utilización.

Antes de realizar los experimentos de toxicidad, se llevó a cabo una exhaustiva caracterización físico-química de las ION empleando para ello distintas metodologías. En primer lugar, se empleó la microscopia electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*), usando un microscopio HITACHI H-8100 equipado con EDS (ThermoNoran, ThermoScientific) operando a 200kV, para determinar el tamaño exacto de las nanopartículas y su morfología. Las imágenes obtenidas fueron luego analizadas mediante *ImageJ*, un software específico de dominio público. Posteriormente, se empleó el análisis de la dispersión dinámica de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) para la determinación de su tamaño hidrodinámico y su potencial zeta, usando un dispositivo Zetasizer Nano-ZS equipado con un láser de 633nm y 4.0mW (modelo ZEN 3600, Malvern Instruments Ltd.). Estos análisis se realizaron en solución acuosa y en medio de cultivo completo para evaluar la estabilidad de las partículas en las distintas suspensiones, o su estado de agregación. Y finalmente, para determinar la reactividad química superficial de las ION se empleó espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*). El análisis XPS se realizó con un equipo ESCALAB 200A (VG Scientific) asociado a un programa específico, PISCES, para la adquisición y análisis de los datos recogidos.

La información obtenida de esta caracterización permitió optimizar las condiciones en las que llevar a cabo los estudios biológicos *in vitro*. Los ensayos de caracterización físico-química y la determinación de la liberación de iones de hierro por las ION fueron

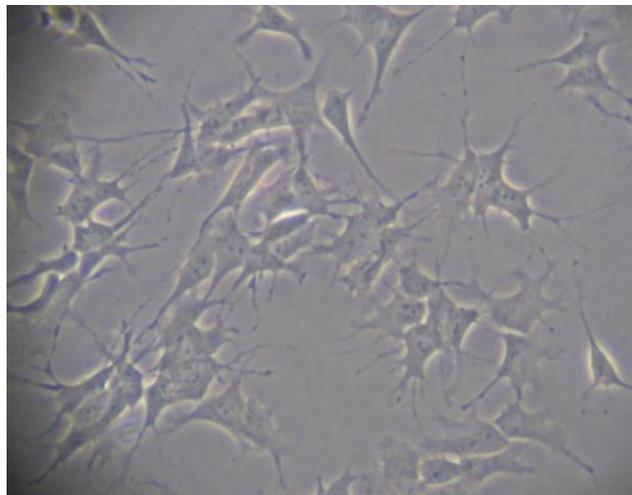
realizados por el grupo de investigación del Departamento de Salud Ambiental del Instituto Nacional de la Salud Portugués a través de un proyecto de colaboración conjunto, y sus resultados fueron empleados para la discusión del presente trabajo.

## **2. Liberación de iones de hierro**

Para cuantificar las concentraciones de iones de hierro liberadas de las ION al medio de cultivo, se incubaron suspensiones de las nanopartículas en medio completo (10, 50, 100 y 200µg/ml) durante 3, 6 y 24h a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Tras una centrifugación a 14000rpm durante 30min, se recuperó el sobrenadante para determinar en él el contenido de hierro por espectroscopía de absorción atómica con ionización de llama. Se utilizó como control negativo medio de cultivo sin ION pero sometido a las mismas condiciones anteriores.

## **3. Cultivo celular y tratamientos**

Para testar los posibles efectos neurotóxicos de las ION a estudio se utilizó la línea celular SHSY5Y, de neuroblastoma humano (Figura 6), que se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECCC, *European Collection of Cell Cultures*).



**Figura 6.** Células neuronales humanas SHSY5Y en cultivo.

Las células se mantuvieron en medio de cultivo compuesto por EMEM/F12 (1:1) con 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico y antimicótico, y 10% de suero bovino fetal, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Veinticuatro horas antes de la realización de los experimentos, las células se pasaron a nuevos pocillos (en placas de 96) a una concentración aproximada de  $2.5-7 \times 10^4$  células/pocillo según la técnica a realizar. Para llevar a cabo los tratamientos, transcurrido ese tiempo se retiró el medio y

se añadieron las suspensiones de ION en medio completo. Se testaron cuatro concentraciones diferentes de ION (10, 50, 100 y 200µg/ml) y dos tiempos de exposición (3 y 24h), seleccionados en base a estudios de viabilidad celular (ensayos MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], alamar blue y captación de rojo neutro) realizados previamente en el laboratorio. Como control negativo se utilizó siempre el mismo medio de cultivo empleado en los tratamientos pero sin nanopartículas, y como controles positivos se emplearon camptotecina (10µM) para el análisis de la muerte celular y mitomicina C (1.5µM) para el ciclo celular.

#### **4. Captación celular**

La captación por parte de las células de las ION se determinó mediante citometría de flujo siguiendo la técnica propuesta por Suzuki *et al.* (2007), con el fin de determinar si las nanopartículas objeto de estudio pueden penetrar en las células o si, por el contrario, únicamente pueden interactuar externamente con la membrana celular.

El análisis se llevó a cabo en base al estudio del tamaño y la complejidad celular según la detección de la dispersión frontal (FSC, *Forward Scatter*) y la dispersión lateral (SSC, *Side Scatter*) de la luz incidente en las células, respectivamente. Los datos fueron adquiridos a partir de un mínimo de 20.000 eventos por muestra utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson), y se utilizó el programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson) para calcular el porcentaje de células que incorporaron ION.

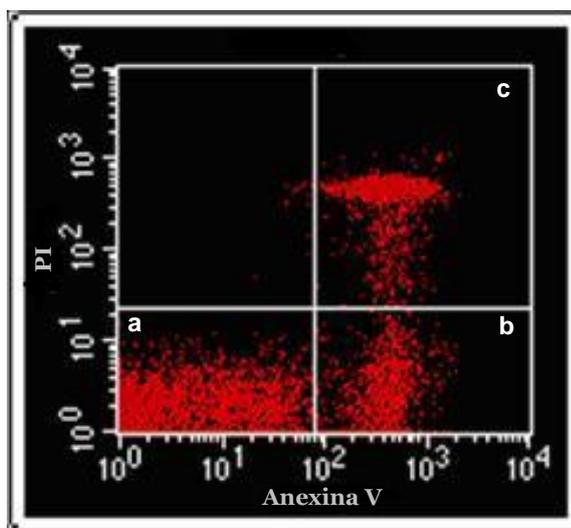
#### **5. Citotoxicidad**

##### *5.1. Ciclo celular*

La distribución de células en las diferentes fases del ciclo celular se examinó mediante el análisis por citometría de flujo del contenido relativo de ADN celular siguiendo lo descrito por Valdiglesias *et al.* (2011). El contenido de ADN se evaluó a partir de la señal de yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*) detectada en un mínimo de 10.000 eventos, y se utilizó el programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson) para calcular el porcentaje de ocupación de las regiones G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M en los histogramas del ciclo celular. Además, se evaluó la región subG<sub>1</sub> de la distribución del ciclo celular como indicativa de fases tardías de apoptosis.

## 5.2. Muerte celular

La tasa de células en apoptosis y necrosis se determinó mediante doble tinción con Anexina V y PI utilizando citometría de flujo y un kit comercial (*BD Pharmingen™ Annexin V-FITC apoptosis detection kit I*). Se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos, tomando los datos de los canales FL1 (anexina V-FITC) y FL2 (PI). Los datos fueron analizados utilizando el programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson). Los índices de apoptosis y necrosis se expresaron como los porcentajes de eventos anexinaV+/PI- y anexinaV+/PI+, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7.** Diagrama de puntos de análisis de muerte celular mostrando las regiones de células vivas (a), en apoptosis temprana (b) y en necrosis (c).

## 6. Análisis estadístico

Para cada condición experimental testada se llevaron a cabo un mínimo de tres experimentos independientes y cada situación experimental fue realizada por duplicado dentro del mismo experimento. Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar. La distribución de las variables respuesta no se ajustó a la normalidad según el test de *Kolmogorov-Smirnov*, por lo que se utilizaron los test no paramétricos de *Kruskal-Wallis* y *Mann-Whitney* para evaluar la existencia de diferencias entre grupos. La existencia de posibles relaciones dosis-respuesta fue evaluada mediante el coeficiente de correlación de *Spearman*. Un *P*-valor inferior a 0.05 fue considerado como significativo. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 21.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nanopartículas de óxido de hierro (ION) han sido uno de los primeros nanomateriales en ser oficialmente aprobados para su uso en clínica (Gould, 2006). Estas nanopartículas tienen gran potencial para ser utilizadas como contraste en técnicas de imagen por resonancia magnética y por sus propiedades térmicas en presencia de campos magnéticos. Además, debido a su facilidad para traspasar la barrera hematoencefálica, pueden emplearse como transportadores de medicamentos, genes o proteínas, al tejido nervioso y más concretamente al cerebro (Thomsen *et al.*, 2013). A pesar de ello, poco se sabe sobre los efectos de las ION en el sistema nervioso humano. Los estudios publicados hasta la fecha en relación a la neurotoxicidad de estas nanopartículas son escasos, generalmente limitados a cultivos de células animales, y muestran resultados en gran medida inconsistentes (Chen *et al.*, 2012; Kenzaoui *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2003).

Debido a su elevada estabilidad química, una cubierta de sílice puede mejorar las propiedades de las ION aumentando su biocompatibilidad y proporcionándoles la capacidad de funcionalizar su superficie sin afectar a sus propiedades magnéticas (Kolhatkar *et al.*, 2013; Larumbe *et al.*, 2012). Además, la cubierta de sílice también ayuda a convertir las nanopartículas hidrofóbicas en partículas hidrofílicas solubles en agua (Wu *et al.*, 2008), favoreciendo su difusión por el organismo. Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas y sus potenciales aplicaciones en neuromedicina, la posible neurotoxicidad asociada a la exposición a las ION recubiertas con sílice no ha sido abordada todavía en profundidad, siendo la información disponible al respecto casi inexistente en el caso concreto de células y tejido nervioso humano.

Sobre esta base y dada la importante laguna existente en este terreno, en este estudio investigamos la posible toxicidad de las ION recubiertas con sílice en células neuronales (células SHSY5Y, de neuroblastoma humano) usando un amplio rango de concentraciones y varios tiempos de exposición. Las células SHSY5Y fueron escogidas para llevar a cabo el estudio debido a que presentan las ventajas metodológicas típicas de una línea celular establecida, pero conservando además muchas de las propiedades bioquímicas y funcionales de las neuronas (Xie *et al.*, 2010). Es por ello que son consideradas un buen modelo celular ampliamente utilizado para testar neurotoxicidad.

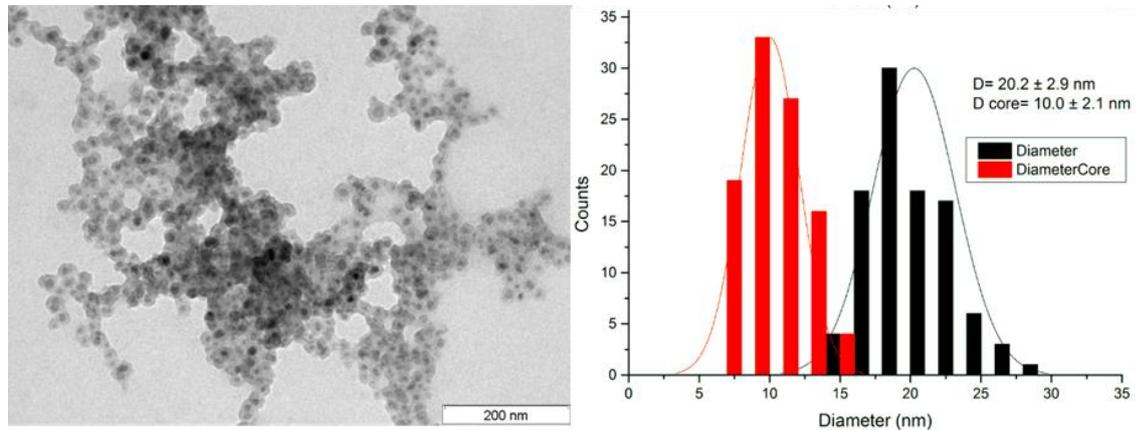
## 1. Caracterización de las nanopartículas

La caracterización fisicoquímica de los materiales a estudio es esencial para la correcta descripción de su toxicidad (Sayes y Warheit, 2009). En el caso concreto de los nanomateriales, además de la caracterización primaria básica también es necesario una completa determinación de otras propiedades biológicamente relevantes que pueden resultar muy significativas para sus efectos a esa escala (Warheit, 2008). La Tabla 1 recopila los resultados de la caracterización fisicoquímica de las ION utilizadas en este estudio, que incluyen tamaño, morfología, reactividad química superficial, tamaño hidrodinámico medio y potencial zeta.

<b>Tabla1.</b> Descripción físico-química de las ION recubiertas con sílice empleadas en el estudio.			
<b>Propiedad analizada</b>	<b>Parámetro evaluado</b>	<b>Metodología</b>	
Tamaño (nm)		TEM	10.0 ± 2.1 (núcleo)
			20.2 ± 2.9 (núcleo y cubierta)
Morfología		TEM	esférica
Química superficial (%)		XPS	9.07 (C 1s)
			0.27 (N 1s)
			60.02 (O 1s)
			29.22 (Si 2p)
			1.41 (Fe 2p3)
Dispersión en agua*	Tamaño hidrodinámico (nm)	DLS	93.3 ± 0.5
	Potencial zeta (mV)		-31.8 ± 2.1
Dispersión en medio de cultivo celular*	Tamaño hidrodinámico (nm)	DLS	111.1 ± 1.1
	Potencial zeta (mV)		-10.3 ± 1.1

TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión, XPS: Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por rayos X, DLS: Dispersión Dinámica de Luz, \*concentración de 300µg/ml.

Por un lado, el análisis con TEM confirmó que se trata de partículas esféricas con un diámetro medio de 20.2nm incluyendo la cubierta de sílice (Figura 8).



**Figura 8.** Imagen de las ION obtenida mediante TEM (izquierda) y los correspondientes histogramas de tamaño (diámetro medido en nm) que muestran tanto el tamaño del núcleo magnético (rojo) como el tamaño total incluyendo la capa de sílice (negro) (derecha).

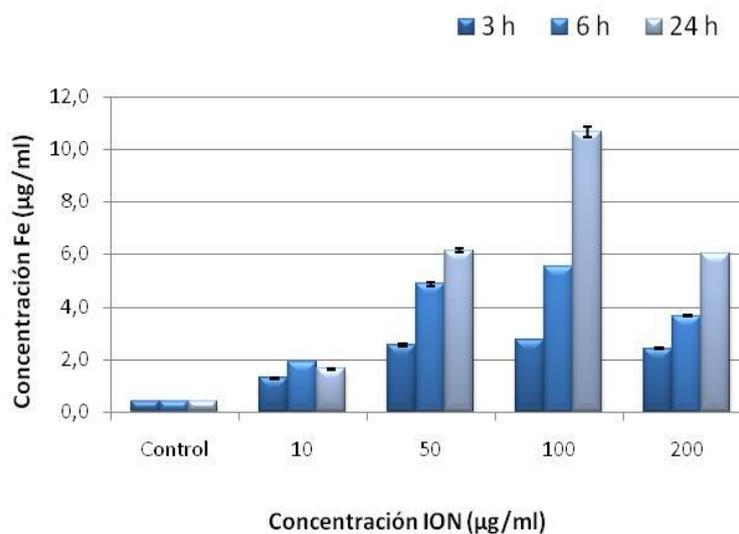
Por otro, los resultados de la evaluación con DLS revelaron que el tamaño hidrodinámico medio de las ION resultó ser bastante estable en los diferentes medios de dispersión empleados (agua y medio de cultivo completo), demostrando la estabilidad de la suspensión y la baja tendencia a la aglomeración de estas nanopartículas. La buena dispersión de las ION en el medio quedó además confirmada por el valor del potencial zeta, que resultó negativo tanto en agua (-31,8mV) como en medio de cultivo celular completo (-10,3mV).

Puede sorprender que las ION, incluso cuando están dispersas en agua, presenten un diámetro mucho mayor cuando el tamaño es examinado por DLS que aquel determinado por TEM. Este aparente aumento en el diámetro se debe, por un lado, a las características hidrodinámicas de las nanopartículas, pero también a su estabilidad y su tendencia a aglomerarse. De hecho, estudios previos demostraron que un aumento del tamaño medido en el medio de cultivo celular era debido a la formación de aglomerados entre las nanopartículas (Bihari *et al.*, 2008). En el caso de nuestras ION, puede observarse cómo en las imágenes de TEM algunas partículas aparecen unidas (aglomeradas) por la capa de sílice, lo que resultaría en un diámetro hidrodinámico mucho mayor del esperado. Aun así, tamaños hidrodinámicos menores de 200nm, como el obtenido en nuestro estudio, son en general aceptados como buenas dispersiones de las nanopartículas y con baja tendencia a la aglomeración.

Finalmente, el análisis de la química superficial llevado a cabo mediante XPS reveló que solo una pequeña fracción de la superficie de las ION recubiertas con sílice presenta hierro (en concreto, menos del 2%), sugiriendo que el recubrimiento es efectivo. También se observó que las ION contienen carbono y nitrógeno en su superficie, posiblemente resultado de los distintos procesos de síntesis, como la microemulsión inversa de ciclohexano, hidróxido de amonio, y ortosilicato de tetraetilo.

## 2. Liberación de iones de hierro

Los resultados obtenidos en el análisis de la liberación de iones de hierro mostraron importantes concentraciones de hierro disuelto, en general dependientes de la dosis y del tiempo de exposición, al suspender las ION en el medio de cultivo completo (Figura 9).



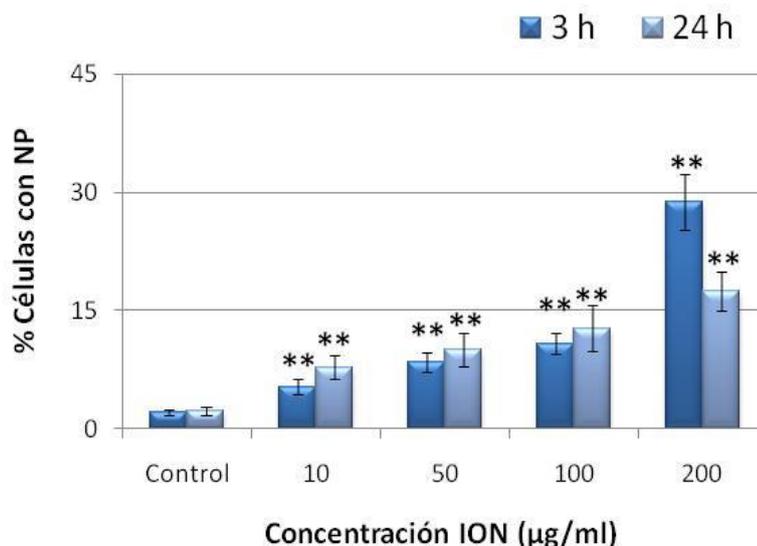
**Figura 9.** Resultados de los ensayos de liberación de iones de hierro por las ION al medio de cultivo celular.

La liberación de iones de hierro por parte de las ION al medio ya había sido descrita previamente en diversos estudios (revisado en Soenen y De Cuyper, 2009). Sin embargo, esta liberación puede variar dependiendo de las características de la suspensión (por ejemplo, el pH) y del revestimiento de la superficie de las nanopartículas (Malvindi *et al.*, 2014). La síntesis química, así como la presencia de algún recubrimiento, que rodea y aísla el material magnético del entorno, y sus propiedades físico-químicas, pueden influir en la tasa de degradación de las partículas y,

en consecuencia, en la liberación de los iones de hierro (Levy *et al.*, 2010; Mahon *et al.*, 2012). Esto podría explicar la liberación de iones al medio de cultivo observada, ya que las ION podrían interactuar externamente con las proteínas séricas, modificando así su capacidad para liberar iones a pesar de la presencia del recubrimiento con sílice.

### 3. Análisis de la captación celular

La evaluación de la captación celular de nanopartículas por citometría de flujo usando los parámetros de dispersión lateral de la luz (SSC, indicativa de la granularidad o complejidad celular) y de dispersión frontal (FSC, indicativa del tamaño celular), es considerada una técnica adecuada para el cribado inicial de la toxicidad de los nanomateriales (Ibuki y Toyooka, 2012). La Figura 10 muestra los resultados obtenidos al evaluar la capacidad de las ION de penetrar en las células neuronales mediante este método. Las nanopartículas fueron internalizadas eficazmente por las células SHSY5Y a todas las concentraciones testadas, siendo además esta captación dependiente de la dosis y del tiempo de exposición, según confirman los coeficientes de correlación de *Spearman* obtenidos en el análisis estadístico ( $r=0.737$ ,  $P<0.01$  para 3h de tratamiento y  $r=0.692$ ,  $P<0.01$  para 24h de tratamiento). Estos resultados coinciden con otros estudios previos que muestran que las ION se internalizan también eficazmente en otros tipos celulares, incluyendo macrófagos (Kunzmann *et al.*, 2011), células A549 de pulmón y células HeLa de cuello de útero (Malvindi *et al.*, 2014).



**Figura 10.** Resultados del análisis de captación celular. \*\* $P<0.01$ , diferencias significativas respecto al correspondiente control.

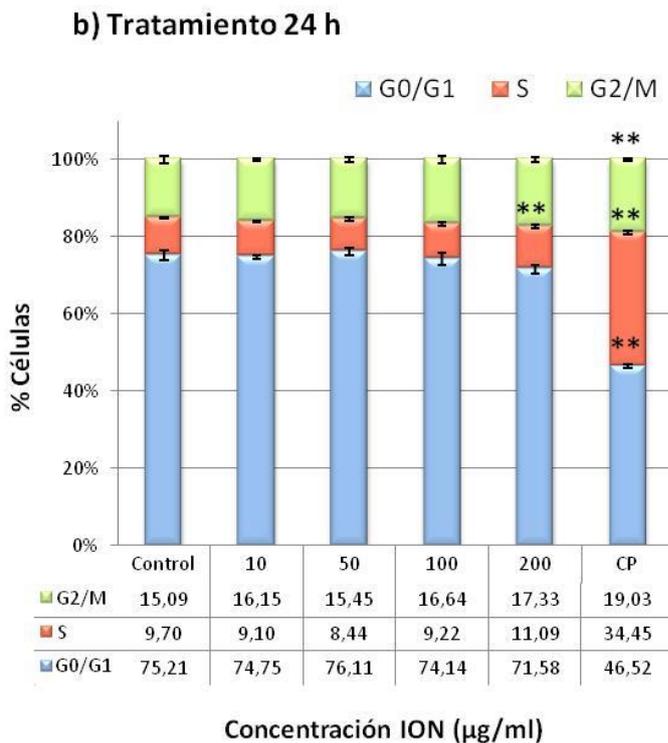
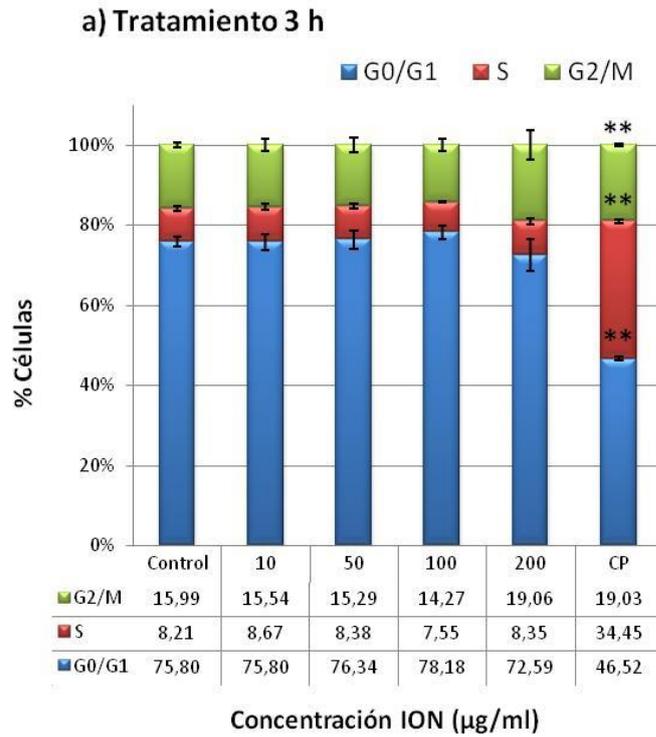
A diferencia de lo que ocurre a concentraciones más bajas, se encontró además una mayor captación de ION en la concentración más alta testada a las 3h en relación con la encontrada tras 24h de exposición. Esta diferencia se debe probablemente a la progresiva aglomeración de nanopartículas a medida que aumenta la dosis y el tiempo de tratamiento, lo que provocaría una interferencia más notable con el proceso de captación durante el período de exposición más largo.

#### **4. Evaluación de citotoxicidad**

##### *4.1. Ciclo celular*

La maquinaria del ciclo celular consiste en un conjunto altamente ordenado de eventos que conducen a la división y duplicación de la célula (Morgan, 2007). Al analizar la distribución de células neuronales durante las diversas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo tras su exposición a las ION (Figura 11), observamos que los tratamientos de 3h no modificaron en ningún caso la marcha normal del ciclo celular, resultados que concuerdan con los hallados en otros estudios previos en los que se testaron ION desnudas o recubiertas de forma distinta a las nuestras (revisado en Mahmoudi *et al.*, 2011).

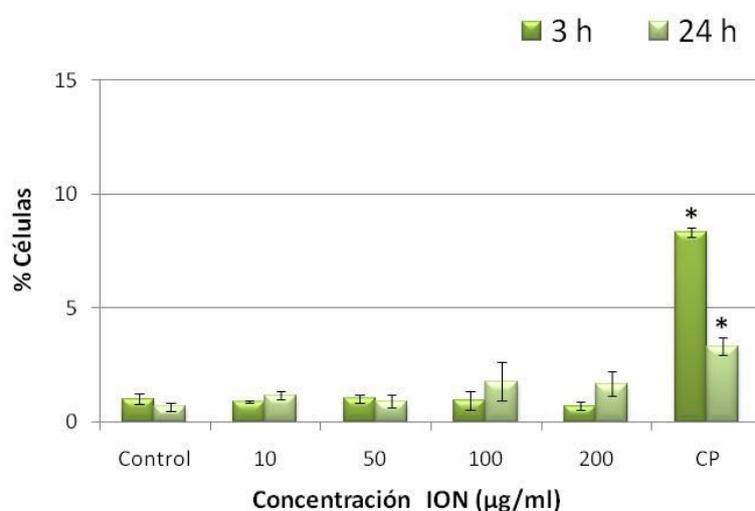
Sin embargo, tras 24h de tratamiento se observaron alteraciones significativas del ciclo celular a la concentración más alta testada (200µg/ml), en concreto un aumento del porcentaje de células en fase S. Estas alteraciones fueron también descritas por Namvar y colaboradores en 2014, tras exponer células Jurkat (linfocitos T) a nanopartículas desnudas de magnetita, pero la dosis utilizada en este caso fue mucho menor (6.4µg/ml, que corresponde a la concentración inhibitoria 50 [IC50] calculada mediante el ensayo MTT). En los ensayos de MTT realizados previamente al presente trabajo se obtuvieron porcentajes de viabilidad celular superiores al 70% en todas las condiciones testadas, por lo que se concluye que la citotoxicidad de las ION empleadas son mucho menos citotóxicas, al menos para las células SHSY5Y, que las utilizadas por Namvar y colaboradores en las células Jurkat. Estas observaciones apoyan la idea generalizada de que las ION revestidas con sílice son en general menos tóxicas que las ION desnudas.



**Figura 11.** Resultados del análisis del ciclo celular por citometría de flujo después de la exposición a ION durante 3h (a), y 24h (b).  $**P < 0.01$ , diferencias significativas respecto al control. CP: control positivo.

#### 4.2. Muerte celular

Durante el análisis del ciclo celular se evaluó también el porcentaje celular en la región subG<sub>1</sub>, como indicativo de muerte celular por apoptosis, ya que la fragmentación del ADN que se produce en las últimas etapas de la apoptosis da lugar a la aparición de eventos marcados con PI en esta región, que contienen niveles de ADN inferiores a los detectados en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Fraker *et al.*, 1995). Los resultados de este análisis se recogen en la Figura 12. En ella se puede observar que no hubo aumento significativo en la fracción subG<sub>1</sub> en ninguna de las dosis ni tiempos de exposición ensayados.

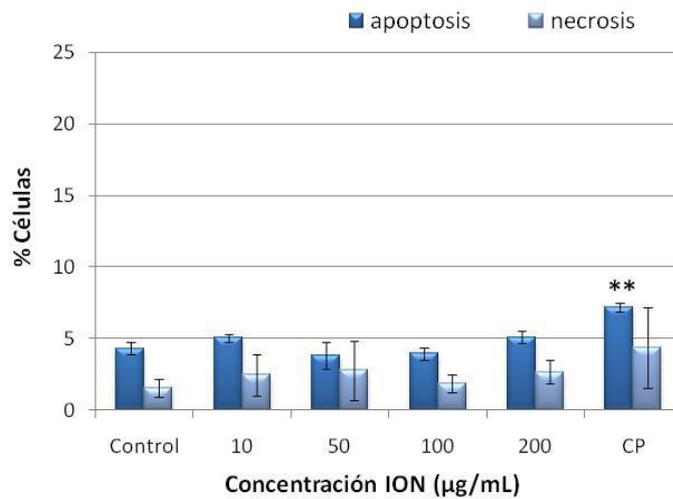


**Figura 12.** Resultados del análisis de la región subG<sub>1</sub> del ciclo celular por citometría de flujo.

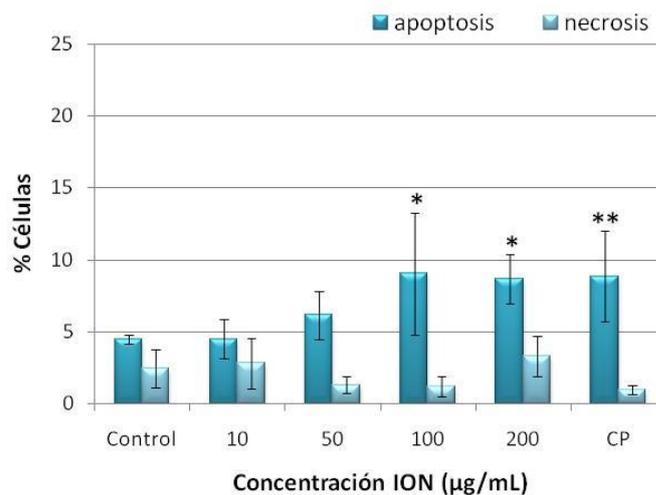
\* $P < 0.05$ , diferencias significativas respecto al correspondiente control. CP: control positivo.

Para investigar con más detalle si la exposición a ION es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis o necrosis en células neuronales, se llevó a cabo la doble tinción con anexina V y PI, y posterior evaluación por citometría de flujo. Los resultados obtenidos de este análisis mostraron que el tratamiento de 3h con ION no indujo apoptosis temprana (eventos positivos para anexina V pero negativos para PI) a ninguna concentración testada (Figura 13). Sin embargo, después de 24h de tratamiento sí se encontraron incrementos significativos en la tasa de apoptosis para las dosis más altas (100 y 200µg/ml).

## a) Tratamiento 3 h



## b) Tratamiento 24 h



**Figura 13.** Resultados del análisis de la muerte celular por apoptosis y necrosis después de la exposición a ION durante 3h (a), y 24h (b). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , diferencias significativas respecto al correspondiente control. CP: control positivo.

Al comparar las dos metodologías empleadas en este trabajo para el estudio de la muerte celular (análisis de la región subG<sub>1</sub> del ciclo celular y doble tinción con anexina V y PI por citometría de flujo) observamos que los resultados obtenidos con ambas estrategias fueron en gran medida similares. El único incremento significativo en la tasa de apoptosis se observó tras 24h de tratamiento con las concentraciones de ION más altas testadas, pero solamente en la doble tinción con anexina V/PI. Esta aparente discrepancia entre las técnicas utilizadas se puede explicar en base a las diferencias

metodológicas propias de cada una de ellas. El análisis de la doble tinción anexina V/PI se realiza justo después de los tratamientos con ION y evalúa estadios tempranos de apoptosis, mientras que la región subG<sub>1</sub> del ciclo celular se analiza tras una incubación adicional hasta 48h al finalizar los tratamientos con las nanopartículas, y es indicativa de apoptosis tardía. Es por esto que probablemente la gran mayoría de las células apoptóticas detectadas mediante la doble tinción, y que por tanto se encuentran en apoptosis temprana, ya no estuviesen presentes durante el análisis de la región subG<sub>1</sub>.

Jeng y Swanson (2006) encontraron resultados similares a los nuestros en células Neuro-2A de neuroblastoma de ratón tratadas con distintas concentraciones de ION, observando un incremento en la tasa de apoptosis a concentraciones superiores a 100µg/ml. Sin embargo, Namvar y colaboradores (2014), empleando las mismas metodologías que las usadas en este trabajo (análisis de la región subG<sub>1</sub> del ciclo celular y determinación de los niveles de apoptosis y necrosis mediante tinción anexina V/PI), encontraron aumentos significativos y dependientes del tiempo de exposición (12-48h), en las tasas de apoptosis de células Jurkat tratadas con nanopartículas de magnetita desnudas (6.4µg/ml). El mismo año, también Malvindi y colaboradores (2014) encontraron inducción de apoptosis significativa (evaluada en este caso por medio de la determinación del potencial de membrana mitocondrial) en células de cuello del útero y de pulmón expuestas a nanopartículas de magnetita (2.5nM) durante 48h. Esta concentración es aproximadamente equivalente a 30µg/ml de las ION empleadas en el presente trabajo, dosis que produjo resultados negativos en todas las condiciones testadas en nuestro estudio.

Al analizar la muerte celular por necrosis mediante la doble tinción anexina V/PI, en ningún caso se observaron niveles significativos de este tipo de muerte celular inducidos por exposición a las ION. De nuevo, Namvar y colaboradores (2014) obtuvieron resultados opuestos a los nuestros también en este caso. En su estudio, ellos observaron un aumento, dependiente del tiempo de tratamiento, en la tasa de necrosis de células Jurkat tratadas con ION, pero, como se mencionó anteriormente, la toxicidad de estas nanopartículas (en términos de disminución de la viabilidad celular) era mucho más alta.

El organismo humano contiene cantidades relativamente elevadas de hierro, pero la presencia de este metal a concentraciones más elevadas que las fisiológicas puede ser extremadamente tóxica. En condiciones fisiológicas, los iones de hierro libres están

unidos a proteínas como la ferritina, la transferrina y la hemosiderina, ya que su presencia aislada – como la causada en los casos de intoxicación por el metal–produce daños graves en los tejidos; así estos iones son acumulados en reservorios endógenos como reserva de hierro corporal para su uso posterior (Soenen y De Cuyper, 2010). El hierro tiene la capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente a través de su interconversión entre las formas  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , propiedad que lo convierte en un compuesto sumamente útil (Kim *et al.*, 2012). Por lo tanto, la homeostasis del hierro se halla estrictamente controlada.

Se piensa que los posibles efectos citotóxicos del hierro libre se deben a su habilidad, al igual que otros iones metálicos de transición, de generar en conjunción con el oxígeno especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pisanic *et al.*, 2009), que pueden causar la peroxidación de las membranas lipídicas, alterar la función mitocondrial (Au *et al.*, 2007), afectar a otras funciones celulares como la capacidad de proliferación o activación de procesos proinflamatorios (Zhu *et al.*, 2008) y dañar otros constituyentes celulares orgánicos como las proteínas o el ADN, lo que puede conducir a nuevos efectos tóxicos (genotóxicos) (Auffan *et al.*, 2009b; Stroh *et al.*, 2004).

Sin embargo, a pesar de la liberación de cantidades de importantes de iones de hierro a partir de las ION utilizadas (como se ha visto previamente, Figura 9), y considerando en conjunto todos los resultados obtenidos de los distintos ensayos de citotoxicidad empleados en el presente trabajo, se observa que, en general, las ION analizadas muestran un bajo potencial citotóxico sobre las células neuronales del estudio. Geppert y colaboradores (2009 y 2011), empleando astrocitos expuestos a ION recubiertas de citrato e ION recubiertas de ácido dimercaptosuccínico, así como Rosenberg y colaboradores (2012) en células de microglía expuestas a Feridex (unas ION recubiertas de dextrano que ya han sido aprobadas para su uso como agente de contraste en imagen por resonancia magnética) obtuvieron resultados similares a los nuestros, ya que no observaron efectos citotóxicos significativos pese al relevante incremento intracelular de hierro determinado durante los ensayos.

## **CONCLUSIONES**

La utilización de ION en investigación o aplicaciones biomédicas está ganando progresiva importancia en los últimos años, llevando consigo el rápido desarrollo de nuevos tipos de estas nanopartículas. Muchas de las ION que se producen para ser aplicadas a fines biomédicos requieren su introducción en el organismo humano, como aquellas que se utilizan para diagnóstico por imagen, liberación de medicamentos o destrucción de tumores por hipertermia. Sin embargo, todavía no está del todo claro si la ION son en general seguras, o bien si deben ser utilizadas con prudencia. Es por ello que el conocimiento de los riesgos potenciales asociados con la exposición a estas nanopartículas, a lo que contribuye el presente estudio, resulta esencial.

A la luz de los resultados obtenidos podemos concluir que:

- Las ION recubiertas de sílice mostraron capacidad para liberar iones de hierro cuando se encuentran en suspensión acuosa, así como para ser internalizadas por las células neuronales, ambos efectos dependientes de la dosis y del tiempo de exposición.
- Las ION presentan en general una baja citotoxicidad; únicamente se obtuvieron resultados positivos en la inducción de apoptosis y alteraciones en el ciclo celular a las concentraciones más altas testadas y para el tiempo de exposición más prolongado (24h).

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una mejor comprensión de la interacción de las ION con los sistemas celulares y de sus posibles consecuencias, específicamente a nivel del sistema nervioso, y ponen de manifiesto la urgente necesidad de realizar evaluaciones de las interacciones que se producen entre los nanomateriales y los organismos vivos, a fin de incrementar el conocimiento sobre los posibles efectos nocivos a diferentes niveles. Los datos generados podrán ser utilizados en la evaluación de riesgo de exposición a estas nanopartículas, y como base para el establecimiento de guías de buenas prácticas para el manejo de estos materiales, que permitan garantizar la seguridad tanto de los trabajadores implicados en su manufactura como de los consumidores finales de los productos comercializados que contienen nanomateriales.

## BIBLIOGRAFÍA

- AshaRani, P.V., Low KahMun, G., Hande, M.P., and Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279–290.
- Au, C., Mutkus, L., Dobson, A., Riffle, J., Lalli, J., and Aschner, M. (2007). Effects of nanoparticles on the adhesion and cell viability on astrocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* 120, 248–256.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., and Wiesner, M.R. (2009a). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* 4, 634–641.
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R., and Bottero, J.-Y. (2009b). Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 157, 1127–1133.
- Avdeev, M.V., Mucha, B., Lamszus, K., Vékás, L., Garamus, V.M., Feoktystov, A.V., Marinica, O., Turcu, R., and Willumeit, R. (2010). Structure and in vitro biological testing of water-based ferrofluids stabilized by monocarboxylic acids. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 26, 8503–8509.
- Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A.G., Reichel, C.A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., and Krombach, F. (2008). Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part. Fibre Toxicol.* 5, 14.
- Bjørnerud, A. and Johansson, L. (2004). The utility of superparamagnetic contrast agents in MRI: theoretical consideration and applications in the cardiovascular system. *NMR Biomed.* 17, 465–477.
- Bursch, W., and Ellinger, A. (2005). Autophagy—a basic mechanism and a potential role for neurodegeneration. *Folia Neuropathol.* 43(4), 297-310.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 23(16), 2825-2837.
- Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., and Golstein, P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr. Biol.* 9(17), 967-970.

- Chen, Z., Yin, J.-J., Zhou, Y.-T., Zhang, Y., Song, L., Song, M., Hu, S., and Gu, N. (2012). Dual enzyme-like activities of iron oxide nanoparticles and their implication for diminishing cytotoxicity. *ACS Nano* 6, 4001–4012.
- Cheng, F.-Y., Su, C.-H., Yang, Y.-S., Yeh, C.-S., Tsai, C.-Y., Wu, C.-L., Wu, M.-T., and Shieh, D.-B. (2005). Characterization of aqueous dispersions of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials* 26, 729–738.
- Choi, S.-J., Oh, J.-M., and Choy, J.-H. (2009). Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *J. Inorg. Biochem.* 103, 463–471.
- Clift, M.J.D., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. (2011). Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative. *Arch. Toxicol.* 85, 723–731.
- Das, M., Saxena, N., and Dwivedi, P.D. (2009). Emerging trends of nanoparticles application in food technology: Safety paradigms. *Nanotoxicology* 3, 10–18.
- De Toro, G. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Actas Hispanoamericanas de Patología.* 1-13.
- DECHEMA/VCI working group “Responsible Production and Use of Nanomaterials” (2011). Ten years of research: risk assessment, human and environmental toxicology of nanomaterials.
- Department for Environment, Food and Rural Affairs of the United Kingdom Government (2007). Characterising the Potential Risks posed by Engineered Nanoparticles - A Second UK Government Research Report.
- Doak, S.H., Griffiths, S.M., Manshian, B., Singh, N., Williams, P.M., Brown, A.P., and Jenkins, G.J.S. (2009). Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* 24, 285–293.
- Duprez, L., Wirawan, E., VandenBerghe, T., and Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 11, 1050-1062.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis, a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.
- European Commission Joint Research Centre (2011). Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety (ENRHES).
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic

- lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* 148(7), 2207-2216.
- Fraker, P.J., King, L.E., Lill-Elghanian, D., and Telford, W.G. (1995). Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer. *Methods Cell Biol.* 46, 57–76.
- Geppert, M., Hohnholt, M., Gaetjen, L., Grunwald, I., Bäumer, M., and Dringen, R. (2009). Accumulation of iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes. *J. Biomed. Nanotechnol.* 5, 285–293.
- Geppert, M., Hohnholt, M.C., Thiel, K., Nürnberger, S., Grunwald, I., Rezwan, K., and Dringen, R. (2011). Uptake of dimercaptosuccinate-coated magnetic iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes. *Nanotechnology* 22, 145101.
- Goodger, N.M., Gannon, J., Hunt, T., and Morgan, P.R. (1997). Cell cycle regulatory proteins-an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol.* 33, 61-73.
- Gould, P. (2006). Nanomagnetism shows in vivo potential. *Nano Today* 1, 34–39.
- Gupta, A.K., and Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995–4021.
- Häfeli, U.O., Riffle, J.S., Harris-Shekhawat, L., Carmichael-Baranauskas, A., Mark, F., Dailey, J.P., and Bardenstein, D. (2009). Cell uptake and in vitro toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery. *Mol. Pharm.* 6, 1417–1428.
- Hait, W.N., Jin, S., and Yang, J.M. (2006). A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 1961-1965.
- Hildebrand, H., Kühnel, D., Potthoff, A., Mackenzie, K., Springer, A., and Schirmer, K. (2010). Evaluating the cytotoxicity of palladium/magnetite nano-catalysts intended for wastewater treatment. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 158, 65–73.
- Hohnholt, M., Geppert, M., and Dringen, R. (2010). Effects of iron chelators, iron salts, and iron oxide nanoparticles on the proliferation and the iron content of oligodendroglial OLN-93 cells. *Neurochem. Res.* 35, 1259–1268.
- Hu, Y.-L., and Gao, J.-Q. (2010). Potential neurotoxicity of nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 394, 115–121.
- Ibuki, Y., and Toyooka, T. (2012). Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 157–166.
- Jayaraj, R., Gupta, N., and Rao, P.V. (2009). Multiple signal transduction pathways in okadaic acid induced apoptosis in HeLa cells. *Toxicology* 256(1-2), 118-127.

- Jeng, H.A., and Swanson, J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 41, 2699-2711.
- Kanwar, J.R., Sun, X., Punj, V., Sriramoju, B., Mohan, R.R., Zhou, S.-F., Chauhan, A., and Kanwar, R.K. (2012). Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 8, 399–414.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., and Möller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1726–1732.
- Kenzaoui, B.H., Bernasconi, C.C., Hofmann, H., and Juillerat-Jeanneret, L. (2012). Evaluation of uptake and transport of ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles by human brain-derived endothelial cells. *Nanomed.* 7, 39–53.
- Kim, J.-E., Shin, J.-Y., and Cho, M.-H. (2012). Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch. Toxicol.* 86, 685–700.
- Kolhatkar, A.G., Jamison, A.C., Litvinov, D., Willson, R.C., and Lee, T.R. (2013). Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15977–16009.
- Kunapuli, S., Rosanio, S., and Schwarz, E.R. (2006). "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *J. Card Fail.* 12(5), 381-391.
- Kunzmann, A., Andersson, B., Vogt, C., Feliu, N., Ye, F., Gabrielsson, S., Toprak, M.S., Buerki-Thurnherr, T., Laurent, S., Vahter, M., *et al.* (2011). Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253, 81–93.
- Larumbe, S., Gómez-Polo, C., Pérez-Landazábal, J.I., and Pastor, J.M. (2012). Effect of a SiO<sub>2</sub> coating on the magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *J. Phys. Condens. Matter Inst. Phys. J.* 24, 266007.
- Lévy, M., Lagarde, F., Maraloiu, V.-A., Blanchin, M.-G., Gendron, F., Wilhelm, C., and Gazeau, F. (2010). Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology* 21, 395103.
- Lodhia, J., Mandarano, G., Ferris, N., Eu, P., and Cowell, S. (2010). Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. *Biomed. Imaging Interv. J.* 6, e12.

- Longobardi, A. (1992). *Flow cytometry: first principles*. Ed. Wiley-Liss, Inc. New York. USA.
- Macey, M.G. (2007). *Flow cytometry. Principles and applications*. Humana Press. New Jersey.
- Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M.A., Journeay, W.S., and Laurent, S. (2011). Effect of nanoparticles on the cell life cycle. *Chem. Rev.* 111, 3407–3432.
- Mahon, E., Hristov, D.R., and Dawson, K.A. (2012). Stabilising fluorescent silica nanoparticles against dissolution effects for biological studies. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 48, 7970–7972.
- Malvindi, M.A., De Matteis, V., Galeone, A., Brunetti, V., Anyfantis, G.C., Athanassiou, A., Cingolani, R., and Pompa, P.P. (2014). Toxicity assessment of silica coated iron oxide nanoparticles and biocompatibility improvement by surface engineering. *PloS One* 9, e85835.
- Maurici, D., Aardema, M., Corvi, R., Cléber, M., Krul, C., Laurent, C., Loprieno, N., Pasanen, M., Pfuhrer, S., Phillips, B., Sabbioni, E., Sanner, T., and Vanparys, P. (2005). Genotoxicity and mutagenicity. *Altern. Lab. Anim.* 33(1), 117-130.
- Morgan, D.O. (2007). *The cell cycle: principles of control* (New Science Press in association with Oxford University Press: London).
- Moroz, P., Jones, S.K., and Gray, B.N. (2002). Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* 18, 267–284.
- Nabha, S.M., Mohammad, R.M., Dandashi, M.H., Coupaye-Gerard, B., Aboukameel, A., Pettit, G.R., and Al-Katib, A.M. (2002). Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly (ADP ribose) polymerase cleavage. *Clin. Cancer Res.* 8(8), 2735–2741.
- Namvar, F., Rahman, H.S., Mohamad, R., Baharara, J., Mahdavi, M., Amini, E., Chartrand, M.S., and Yeap, S.K. (2014). Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized via seaweed aqueous extract. *Int. J. Nanomedicine* 9, 2479–2488.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (2006). *Approaches to Safe Nanotechnology*.
- Pfaller, T., Colognato, R., Nelissen, I., Favilli, F., Casals, E., Ooms, D., Leppens, H., Ponti, J., Stritzinger, R., Puentes, V., *et al.* (2010). The suitability of different cellular

- in vitro immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. *Nanotoxicology* 4, 52–72.
- Pisanic, T.R., 2nd, Blackwell, J.D., Shubayev, V.I., Fiñones, R.R., and Jin, S. (2007). Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* 28, 2572–2581.
- Pisanic, T.R., Jin, S., and Shubayev, V.I. (2009). Iron oxide magnetic nanoparticle nanotoxicity: incidence and mechanisms. In *Nanotoxicity*, S.C. Sahu, and D.A. Casciano, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), 397–425.
- Puntarulo, S. (2005). Iron, oxidative stress and human health. *Mol. Aspects Med.* 26, 299–312.
- Le Renard, P.-E., Jordan, O., Faes, A., Petri-Fink, A., Hofmann, H., Rüfenacht, D., Bosman, F., Buchegger, F., and Doelker, E. (2010). The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia. *Biomaterials* 31, 691–705.
- Roninson, I.B., Broude, E.V., and Chang, B.D. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updat.* 4(5), 303-313.
- Rosenberg, J.T., Sachi-Kocher, A., Davidson, M.W., and Grant, S.C. (2012). Intracellular SPIO labeling of microglia: high field considerations and limitations for MR microscopy. *Contrast Media Mol. Imaging* 7, 121–129.
- Salata, O. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology* 2, 3.
- Santamaria, A. (2012). Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 926, 1–12.
- Savolainen, K., Alenius, H., Norppa, H., Pylkkänen, L., Tuomi, T., and Kasper, G. (2010). Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies-a review. *Toxicology* 269, 92–104.
- Sayes, C.M., and Warheit, D.B. (2009). Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 1, 660–670.
- Seaton, A., Tran, L., Aitken, R., and Donaldson, K. (2010). Nanoparticles, human health hazard and regulation. *J.R. Soc. Interface R. Soc.* 7 Suppl 1, S119–S129.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., and Doak, S.H. (2009). Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891–3914.

- Skaper, S.D., Floreani, M., Ceccon, M., Facci, L., and Giusti, P. (1999). Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 890, 107–118.
- Soenen, S.J.H., and De Cuyper, M. (2009). Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol. Imaging* 4, 207–219.
- Soenen, S.J.H., and De Cuyper, M. (2010). Assessing iron oxide nanoparticle toxicity in vitro: current status and future prospects. *Nanomedicine* 5 (8), 1261-1275.
- Stroh, A., Zimmer, C., Gutzeit, C., Jakstadt, M., Marschinke, F., Jung, T., Pilgrimm, H., and Grune, T. (2004). Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 976–984.
- Suh, W.H., Suslick, K.S., Stucky, G.D., and Suh, Y.-H. (2009). Nanotechnology, nanotoxicology and neuroscience. *Prog. Neurobiol.* 87, 133–170.
- Sun, C., Lee, J.S.H., and Zhang, M. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1252–1265.
- Sun, J., Zhou, S., Hou, P., Yang, Y., Weng, J., Li, X., and Li, M. (2007). Synthesis and characterization of biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* 80, 333–341.
- Suzuki, H., Toyooka, T., and Ibuki, Y. (2007). Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3018–3024.
- Taton, T.A. (2002). Nanostructures as tailored biological probes. *Trends Biotechnol.* 20, 277–279.
- Tetley, T.D. (2007). Health effects of nanomaterials. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 527–531.
- Thomsen, L.B., Linemann, T., Pondman, K.M., Lichota, J., Kim, K.S., Pieters, R.J., Visser, G.M., and Moos, T. (2013). Uptake and transport of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through human brain capillary endothelial cells. *ACS Chem. Neurosci.* 4, 1352–1360.
- Valdiglesias, V., Laffon, B., Pásaro, E., and Méndez, J. (2011). Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types. *J. Environ. Monit.* 13, 1831–1840.

- Valdiglesias, V., Costa, C., Sharma, V., Kiliç, G., Pásaro, E., Teixeira, J.P., Dhawan, A., and Laffon, B. (2013). Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 57, 352–361.
- Vasir, J.K., and Labhasetwar, V. (2005). Targeted drug delivery in cancer therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* 4, 363–374.
- Veranth, J.M., Kaser, E.G., Veranth, M.M., Koch, M., and Yost, G.S. (2007). Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part. Fibre Toxicol.* 4, 2.
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K., and Zweck, A. (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.* 24, 1211–1217.
- Wang, B., Feng, W., Zhu, M., Wang, Y., Wang, M., Gu, Y., Ouyang, H., Wang, H., Li, M., Zhao, Y., *et al.* (2009). Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice. *J. Nanoparticle Res.* 11, 41–53.
- Warheit, D.B. (2008). How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 101, 183–185.
- Weissleder, R., Stark, D.D., Engelstad, B.L., Bacon, B.R., Compton, C.C., White, D.L., Jacobs, P., and Lewis, J. (1989). Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am. J. Roentgenol.* 152, 167–173.
- Wu, W., He, Q., and Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res. Lett.* 3, 397–415.
- Xiang, J.-J., Tang, J.-Q., Zhu, S.-G., Nie, X.-M., Lu, H.-B., Shen, S.-R., Li, X.-L., Tang, K., Zhou, M., and Li, G.-Y. (2003). IONP-PLL: a novel non-viral vector for efficient gene delivery. *J. Gene Med.* 5, 803–817.
- Xiao-Feng, P., Bo, D., and Qiang, Z. (2009). Synthesis of magnetic nanobiomaterials and its biological effects. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 1369–1373.
- Xie, H., Hu, L., and Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* 123, 1086–1092.
- Xing, M.L., Wang, X.F., Zhu, X., Zhou, X.D., and Xu, L.H. (2008). Morphological and biochemical changes associated with apoptosis induced by okadaic acid in human amniotic FL cells. *Environ. Toxicol.* 24(5), 437-445.

- Xuan, S., Wang, F., Lai, J.M.Y., Sham, K.W.Y., Wang, Y.-X.J., Lee, S.-F., Yu, J.C., Cheng, C.H.K., and Leung, K.C.-F. (2011). Synthesis of biocompatible, mesoporous Fe(3)O(4) nano/microspheres with large surface area for magnetic resonance imaging and therapeutic applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3, 237–244.
- Yi, D.K., Lee, S.S., Papaefthymiou, G.C., and Ying, J.Y. (2006). Nanoparticle architectures templated by SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposites. *Chem. Mater.* 18, 614–619.
- Zhao, J., and Castranova, V. (2011). Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 14, 593–632.
- Zhu, M.-T., Feng, W.-Y., Wang, B., Wang, T.-C., Gu, Y.-Q., Wang, M., Wang, Y., Ouyang, H., Zhao, Y.-L., and Chai, Z.-F. (2008). Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology* 247, 102–111.

