

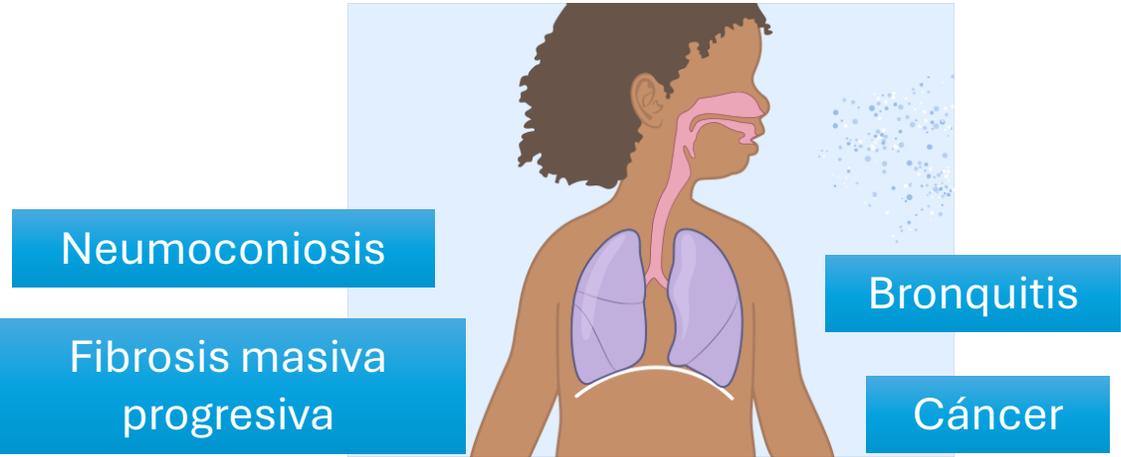
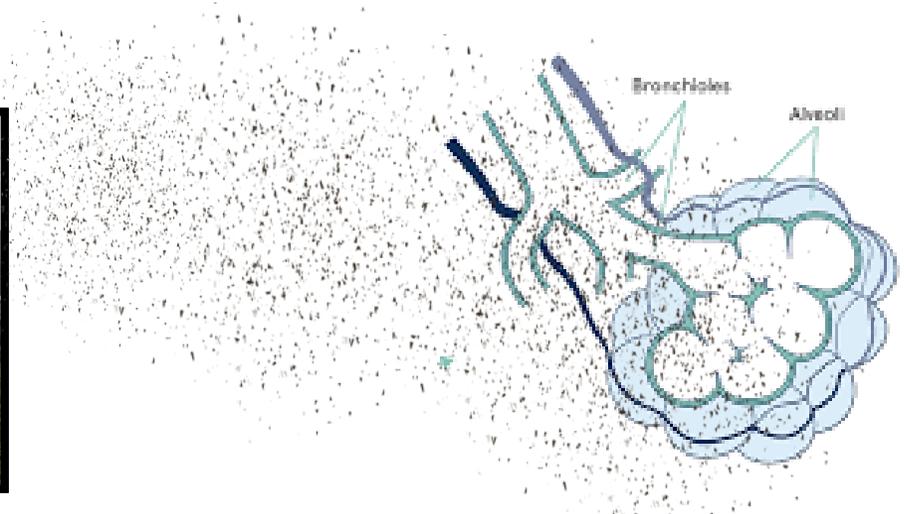
Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad en células V79 y HaCaT asociado a la exposición a nanopartículas de carbón

Grethel León Mejía, Alvaro Miranda-Guevara, Julian Rodríguez Tapia,
Wilner Martínez-Lopez, Ornella Fiorillo Moreno, Fredy Jose Torres,
Maria Fernanda Palma, Leonardo Pacheco-Londoño, Antonio Acosta-Hoyos.



Generalidades: la minería de carbón y nanopartículas

Explotación de carbón



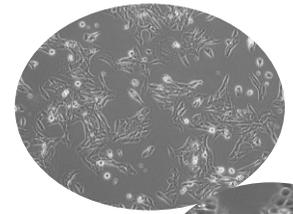
Nanopartículas:
Mayor deposición
en los pulmones

OBJETIVO: Evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos *in vitro*, utilizando líneas celulares V79 y HaCaT.

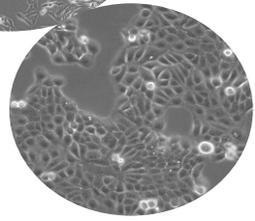
METODOLOGÍA



METODOLOGIA

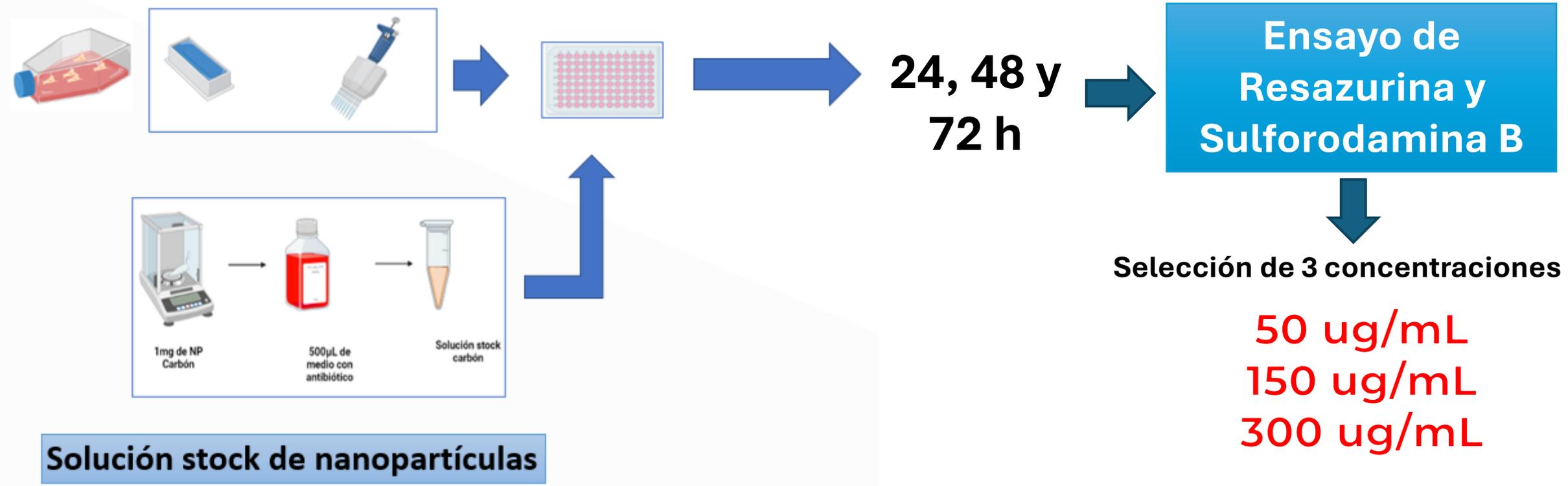


V79, línea celular, fibroblasto de pulmón de hámster chino



HaCaT, Queratinocitos humanos transformados espontáneamente de piel histológicamente normal

Ensayos de viabilidad celular

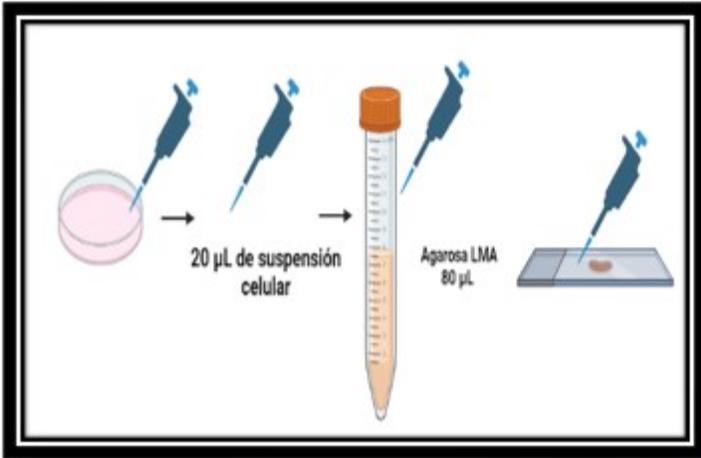


METODOLOGIA

Análisis de genotoxicidad

Ensayo cometa con enzimas

Ensayo cometa alcalino



60 µL enzima formamidopirimidina-DNA-glicosilasa (FPG) o endonucleasa III (EndoIII)



LISIS
pH 10; 4°C
17 horas



DENATURACIÓN
pH > 13
20 minutos



ELECTROFESIS
25V – 300mA
15 minutos



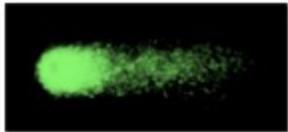
TINCIÓN



NEUTRALIZACIÓN
pH 7.5
3 lavados de 5 minutos

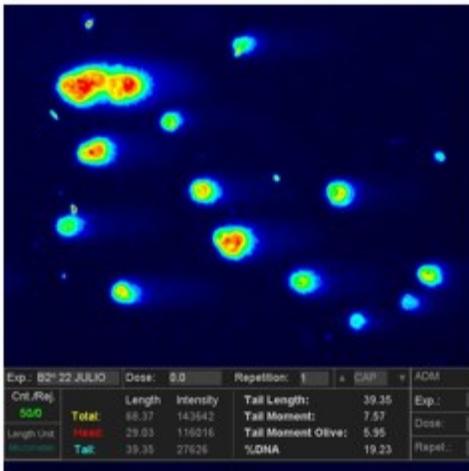


ANÁLISIS



100 Células

Parámetro: % ADN en la cola



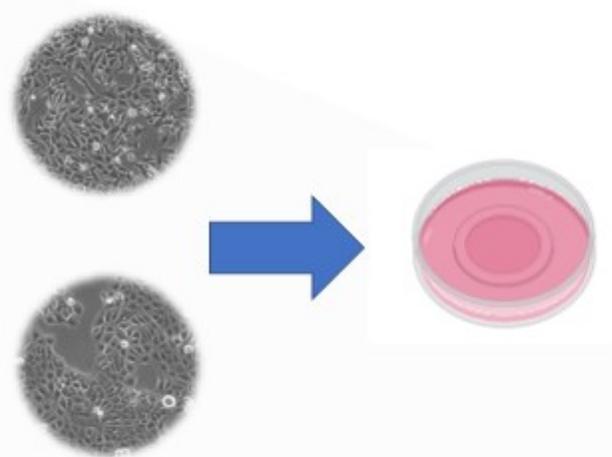
Software OpenComet

METODOLOGIA

Análisis de muerte celular



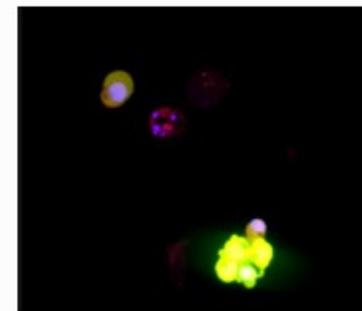
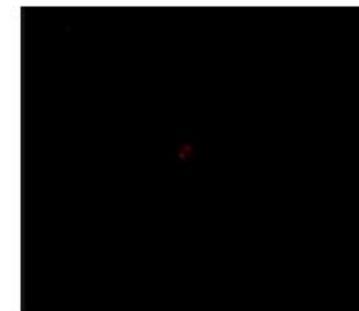
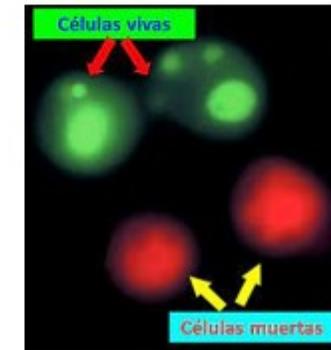
Triple tinción



DIACETATO DE FLUORESCEÍNA

YODURO DE
PROPIDIO

HOECHST 33342 (HO)



Análisis estadístico: ANOVA y prueba de Tukey en GraphPad Prism 5.0
($p < 0,05$ significativo).

RESULTADOS

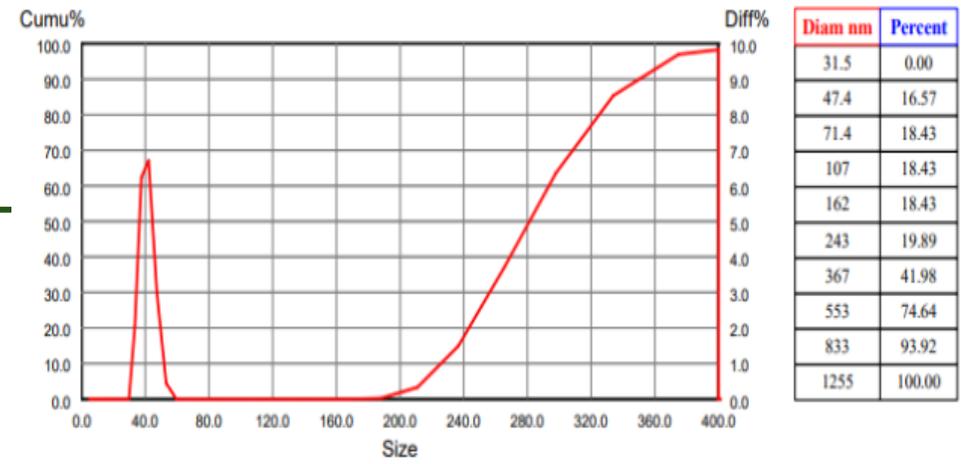


Figura 1. Tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de carbón (NP) analizado mediante dispersión de luz dinámica (DLS).

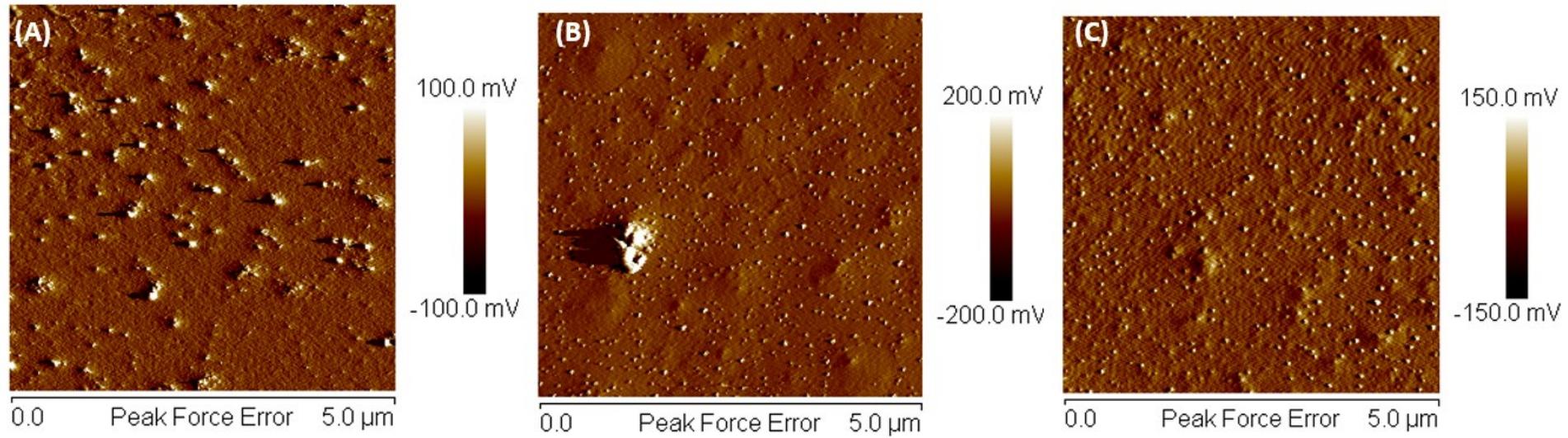


Figura 2. Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) de las NP de carbón a diferentes concentraciones: A) 50 µg/mL; B) 150 µg/mL; C) 300 µg/mL.

RESULTADOS

Carbono, oxígeno, hierro, calcio, aluminio, silicio y cobre

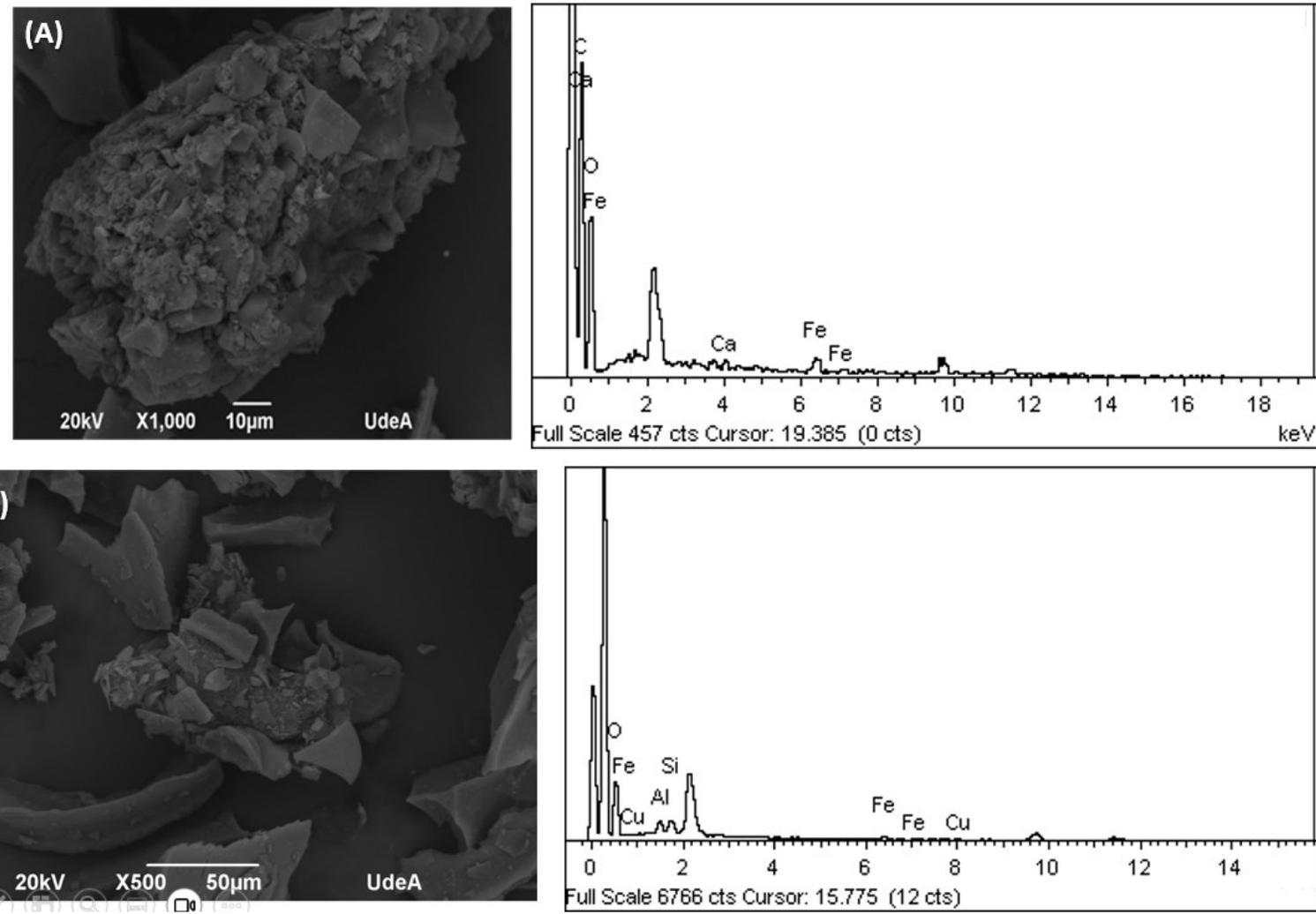
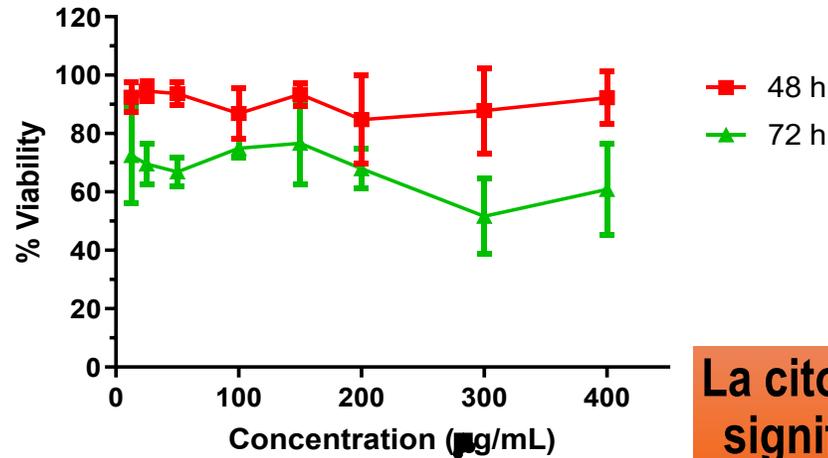
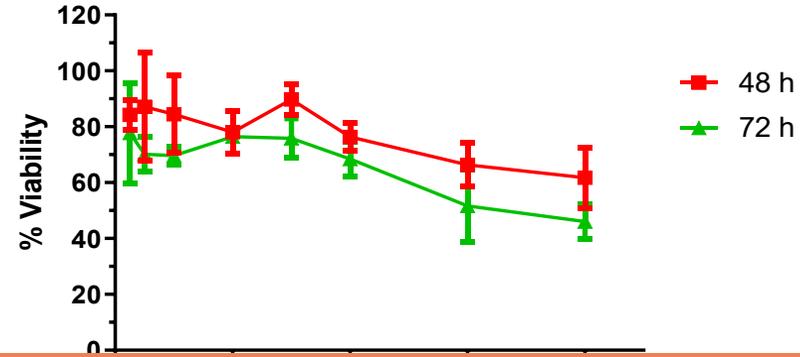


Figura 3. Análisis SEM-EDS de las NP de carbón provenientes de las minas de La Loma-Cesar. Las Figuras A y B muestran la forma irregular de las NP y, a continuación, el espectro composicional por EDS.

(A) V79- Coal NP Resazurin (RZ)

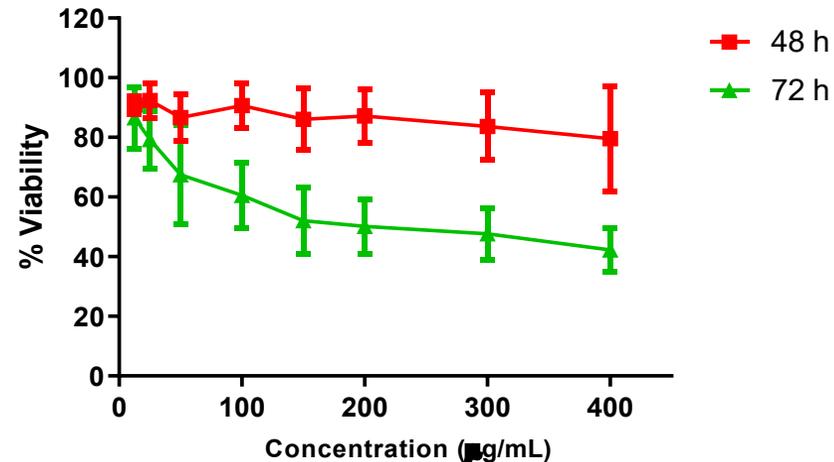


(B) V79- Coal NP Sulforhodamine B (SRB)



La citotoxicidad, evaluada en células V79 y HaCaT, muestra una disminución significativa en la viabilidad celular, especialmente a concentraciones más altas, indicando una respuesta dosis-dependiente.

(C) HaCaT - Coal NP Resazurin (RZ)



(D) HaCaT - Coal NP Sulforhodamine B (SRB)

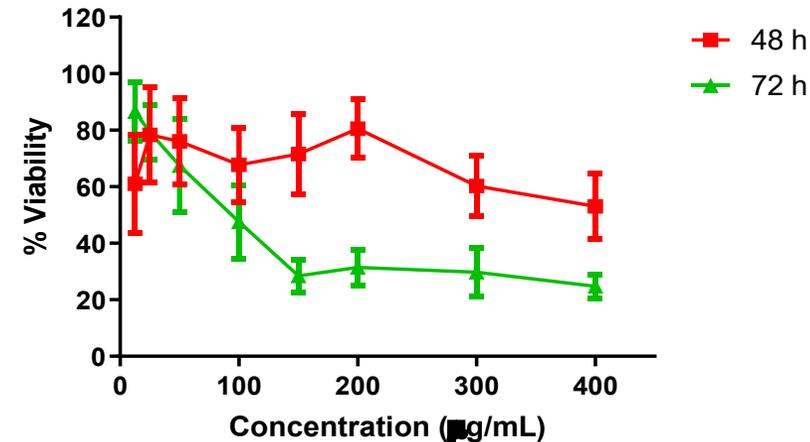


Figura 4. Análisis de viabilidad celular utilizando diferentes ensayos: A) Resazurina y B) Sulforodamina B en distintos periodos de exposición en células V79. C) Resazurina y D) Sulforodamina B en distintos periodos de exposición en células HaCaT. Experimentos realizados por triplicado.

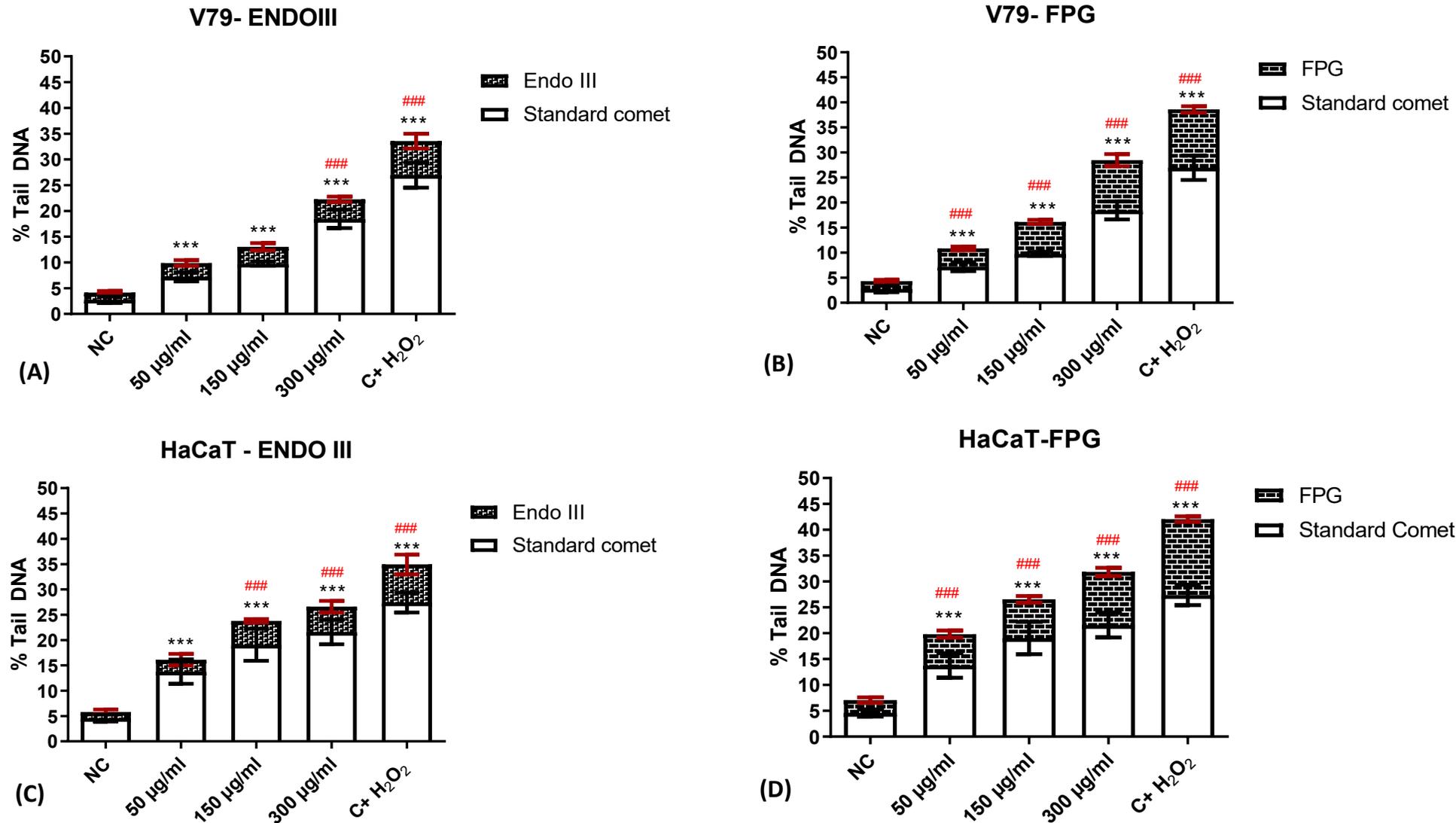


Figura 5. Porcentaje de ADN en la cola (% Tail DNA) en el ensayo cometa alcalino (barras blancas) y porcentaje de daño oxidativo en el ADN en el ensayo cometa modificado (barras punteadas) tras el tratamiento con las enzimas ENDO III y FPG.

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo (NC) ($P < 0.05$).

#Aumento significativo en el daño oxidativo comparado con el control negativo con ENDO III y FPG ($P < 0.05$).

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar.



■ **RESULTADOS**

La composición química de las NPs de carbón, especialmente su contenido de carbono, metales y metaloides, puede influir en su toxicidad al facilitar la penetración celular y favorecer la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), contribuyendo así a la muerte celular (Cheng et al., 2009; Géloën et al., 2021).

Tabla 1. Análisis de muerte celular en células V79 y HaCaT expuestas a diferentes concentraciones de NP de carbón

Parámetros	CN	H ₂ O ₂	50 µg/mL	150 µg/mL	300 µg/mL
Células V79					
Apoptosis temprana	0.0±0.0	50.0±1.0***	5.0±0.6***	22.0±1.6***	40.0±1.5***
Apoptosis tardía	3.0±0.5	99.0±1.4***	3.5±0.4	34.0±0.8***	82.0±2.7***
Necrosis	5.0±1.4	51.0±3.5***	6.0±0.6	19.0±1.5***	31.0±0.6***
Células HaCaT					
Apoptosis temprana	3.0±0.3	58.0±0.7***	4.0±0.3	40.5±0.3***	57.0±0.5***
Apoptosis tardía	4.0±0.2	92.0 ±0.7***	6.0±0.4**	17.0±0.4***	73.0±0.5***
Necrosis	2.0±0.2	65.0±0.4***	10.0±0.4***	13.0±0.4***	29.0±0.6***

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo (NC) (P < 0.05).

CONCLUSIONES

La evaluación de las nanopartículas de carbón revela una **compleja interacción entre su tamaño, composición química** y la respuesta celular.

La predominancia de **partículas de aproximadamente 40 nm y su aglomeración**, evidenciada por la microscopía de fuerza atómica y DLS, destaca su influencia en la viabilidad celular.

Los análisis de AFM y SEM revelaron una topografía **predominantemente esférica**, con una marcada tendencia a la agregación debido a su alta energía superficial, un fenómeno clave que puede alterar su biodisponibilidad y toxicidad (Augustine et al., 2020; Yuan et al., 2019).



CONCLUSIONES

La evaluación mediante **ensayo cometa** mostró que las NPs de carbón inducen **daño en el ADN dosis-dependiente en células V79 y HaCaT**, y que la inclusión de FPG reveló daño oxidativo significativo incluso a bajas concentraciones (50 µg/mL).

La triple tinción utilizada para evaluar la **muerte celular** mostró una incidencia significativa desde la menor concentración de exposición a las NPs, lo cual podría estar asociado con un **exceso de lesiones en el ADN**. Esta sobrecarga de daño podría superar los mecanismos de **reparación** y **activar rutas apoptóticas o necróticas** para eliminar las células comprometidas (León-Mejía et al., 2016; Roos et al., 2016).

CONCLUSIONES

La capacidad de las nanopartículas de carbón para **interactuar directamente con el ADN** destaca un mecanismo potencial para la inducción de **daño genético y la generación de ERO en la célula.**

Estos resultados refuerzan la evidencia del impacto genotóxico de las NPs de carbón asociadas a las actividades mineras y su potencial para **inducir inestabilidad genética y muerte celular.**

Este estudio contribuye significativamente a la **comprensión de los riesgos ambientales y para la salud vinculados a la exposición** a estas partículas, destacando la importancia de investigar los mecanismos moleculares asociados para mitigar sus efectos.



IMPLICACIONES EN POLÍTICAS PÚBLICAS Y PARA LA PRÁCTICA

Los resultados obtenidos destacan la necesidad de **fortalecer la regulación en torno a la exposición a nanopartículas de carbón, especialmente en entornos industriales, ocupacionales y en las poblaciones aledañas**. La capacidad de estas nanopartículas para generar estrés oxidativo y daño genético evidencia la importancia de establecer límites de exposición y desarrollar estrategias de mitigación del riesgo.

Además, es fundamental **promover una colaboración interdisciplinaria entre toxicología, nanotecnología y salud ocupacional** para diseñar políticas de seguridad basadas en evidencia.



Medellín, Colombia

CASAP X

CONGRESO COLOMBIANO Y
CONFERENCIA INTERNACIONAL
DE CALIDAD DE AIRE, CAMBIO CLIMÁTICO Y SALUD PÚBLICA

Gracias!

Más información



<https://casap.science/>



casap@casap.science