

Efecto teratogénico de nanopartículas de oro de 20 nm durante la septación cardiaca

Roberto Lazzarini Lechuga,* Omar Alcántar Ramírez,**
Ricardo Jaime Cruz,*** Luis Enrique Gómez Quiroz****

RESUMEN: La venta libre de productos cosméticos con nanopartículas de oro se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Adicionalmente, las nanopartículas de oro se posicionan como opciones terapéuticas principalmente contra el cáncer. Sin embargo, no se conoce a fondo los posibles efectos tóxicos de estas nanopartículas en células ni organismos sanos, tampoco los posibles efectos teratogénicos durante el desarrollo. El proceso de septación cardiaca, tanto en aves como mamíferos, consiste en pasar de una circulación unidireccional a una bidireccional, evento altamente sensible al estrés oxidante. Razón por la cual nos propusimos conocer los posibles efectos teratogénicos de las nanopartículas de oro durante el desarrollo cardiaco en el embrión de pollo, modelo muy usado que permite la manipulación directa del embrión. En el estudio encontramos: 1. Un incremento de 7.9 veces la tasa de mortalidad por exposición a las nanopartículas de oro contra el grupo control. 2. Defectos en la cardiogénesis, principalmente “doble salida del ventrículo derecho”, siempre acompañada de comunicación interventricular. Los datos presentados muestran efectos adversos de nanoAu durante el desarrollo embrionario.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas de oro, septación cardiaca, teratogénesis.

ABSTRACT: Gold nanoparticles enriched products has considerable increased in the last years. Beside their cosmetic use nanoAu therapy is now considered as a novel alternative to treat a diversity of diseases, including cancer. Nonetheless there are no sufficient research about the possible toxic effects of these nanoAu particles over cells or the whole organism to be safely use as anticancer-drugs or about it teratogenic effects during development. Cardiac septation is a very important and controlled process during development in humans and birds which basically consist in shifting unidirectional blood flow into bidirectional. This event is highly susceptible to stress. The aim of this work was to test the possible gold nanoparticles teratogenic effects during the cardiac development on chicken embryos as this model is very well accepted because it allows direct embryonic manipulation. Our results showed: 1. A 7.9-fold increase in the mortality rate due to gold nanoparticles exposure when compared with the control groups. 2. Cardiogenetic defects after gold nanoparticles exposure as double outlet right ventricle that was always accompanied with interventricular communication. The data presented show the adverse effects of nanoAu exposure during embryonic development.

KEYWORDS: gold nanoparticles, cardiac septation, teratogenesis.

* Departamento Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I). San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, México D.F. Correspondencia: (lazzarini@xanum.uam.mx). Tel. (55) 5804 4706. Fax. (55) 5804 4702. Autor para correspondencia.

** Departamento Ciencias de la Salud. UAM-I. Correspondencia: (cbs209220683@titlani.uam.mx).

*** Departamento de Biología. UAM-I. Correspondencia: (ricardo.jaime.cruz@gmail.com).

**** Departamento Ciencias de la Salud. UAM-I. Correspondencia: (legq@xanum.uam.mx).

Introducción

En los últimos años se ha incrementado el uso de nanopartículas metálicas principalmente de oro (nanoAu) y plata (nanoAg) en productos cosméticos de aplicación tópica. NanoAu también se pueden encontrar en productos etiquetados como “complementos alimenticios” (oro coloidal bebible), en ambos casos prometen efectos rejuvenecedores y están disponibles a la población general por ser productos de libre venta. Sin embargo, una de las principales aplicaciones propuestas para las nanoAu es el uso biomédico, actuando como transportadores selectivos de fármacos principalmente contra cánceres humanos, perspectiva fundada en: estudios *in vitro*, donde se describe que las nanoAu elevan las especies reactivas de oxígeno (Mateo *et al.*, 2014), se transportan selectivamente al núcleo de células malignas, causando deformaciones en su morfología (Dam *et al.*, 2012); daño al material genético, detención de la citocinesis, así como muerte celular por apoptosis (Kang *et al.*, 2010; Selim y Hendi, 2012; Tsai *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). Sin embargo, se conoce poco sobre los efectos tóxicos tanto en células como en organismos sanos. Algunos efectos adversos reportados en modelos *in vivo* indican que las nanoAu pueden bioacumularse principalmente en hígado, corazón y cerebro; hasta por más de un mes después de una dosis intravenosa única (Fraga *et al.*, 2014), causando respuesta inflamatoria crónica, congestión y dilatación de vasos sanguíneos en corazón e hígado (Abdelhalim, 2011; Abdelhalim y Jarra, 2012;). Respecto a los efectos de las nanoAu durante el desarrollo, se presentan resultados controversiales. Asharani y cols. (2011) describen defectos del desarrollo en crías de pez cebra expuestos a las nanoAu, entre otros cambios, funciones fisiológicas alteradas, principalmente bradicardia (función anómala del corazón). Sin embargo, recientemente se afirma que las nanoAu y las nanoAg son biocompatibles durante el desarrollo preimplantacional de los mamíferos (Taylor *et al.*, 2014). A pesar de que las nanoAu menores a 50 nm de diámetro tienen la capacidad de atravesar la barrera hemato-placentaria y biodistribuirse en embriones de ratón (Yang *et al.*, 2012).

Por otro lado, durante la cardiogénesis en aves y mamíferos, el proceso de septación consiste en pasar de circulación unidireccional a bidireccional mediante la formación de tres septos a todo lo largo del corazón (Cruz *et al.*, 1989; Webb *et al.*, 2003), proceso altamente sensible a estrés oxidante (Fisher *et al.*, 2007). El corazón es el primer órgano en adquirir capacidad funcional aunque anatómicamente se encuentra incompleto. Inicialmente, el corazón se compone de un tubo de miocardio con capacidad contráctil, en humanos aparece al inicio de la tercera semana después de la fertilización (Davis, 1927) y en pollo en estadio 9HH (Stalberg y DeHaan, 1969) de la clasificación de Hamburger y Hamilton (1951). Posteriormente, sufre cambios morfológicos, se curva y tuerce debido a la adición de nuevas poblaciones celulares desde el “segundo campo cardiogénico” (Kelly *et al.*, 2001;

Waldo *et al.*, 2001), estas células se internan al corazón desde su extremo cefálico (cono-tronco), y del extremo caudal (Cruz *et al.*, 1989; 1991), en esta etapa la región del cono-tronco emerge sólo del primordio del ventrículo derecho (VD). Más tarde en el desarrollo se adiciona otra población celular que va migrando desde la cresta neural, finalmente, invaden la gelatina cardíaca de la porción cono-tronco y forman el septo aorticopulmonar, estructura temporal que causara la separación del cono-tronco, en los tractos de salida ventriculares así como tronco de las grandes arterias (Kirby *et al.*, 1983). Posteriormente, el miocardio del cono-tronco debe acortarse mediante apoptosis, para la correcta alineación ventrículo arterial (Watanabe *et al.*, 2001); en conjunto, la migración celular desde la cresta neural y la apoptosis del cono-tronco permiten que el ventrículo izquierdo (VI) adquiera su propio tracto de salida, dividiendo así la circulación en sistémica y pulmonar (circulación dual). Afectaciones en alguno de los eventos antes descritos producen defectos del desarrollo conocidos como cardiopatías congénitas “tronco-conales”, siendo la “doble salida del ventrículo derecho” (DsVD) una de las variantes de mayor incidencia en humanos (Hoffman y Kaplan, 2002). Por lo anterior, nos propusimos evaluar el efecto de nanoAu de 20nm, durante la septación cardíaca en el embrión de pollo. Encontramos que la exposición de nanoAu, puede causar interrupción del desarrollo embrionario así como cardiopatías congénitas tronco-conales del tipo DsVD acompañada de comunicación interventricular (CiV).

Materiales y métodos

Se utilizaron huevos fértiles de gallina (*Gallus domesticus*) libres de patógenos específicos adquiridos de la granja ALPES S.A. (Tehuacán, México), se incubaron a 37.8 °C y 60% de humedad hasta estadio 22HH. Posteriormente, se perforó una ventana de aproximadamente 1 cm² en los cascarones y se disecó la membrana vitelina. El grupo experimental estuvo formado por 30 embriones con características normales del desarrollo para el tiempo de incubación, se inyectó vía intra-pericárdica 5µl de nanoAu de 20 nm, solución coloidal en búfer de fosfatos [6.54 × 10⁹ nanoAu/ml] (Sigma-Aldrich No. 753610); posteriormente, se reincubaron los huevos en las mismas condiciones iniciales hasta estadio 36HH (corazón maduro). En otros 30 embriones (grupo control), se administró por la misma vía y dosis, solución de búfer de fosfatos. Los embriones, sin las características anatómicas para el tiempo de incubación, no fueron considerados para el experimento. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se calculó el índice de mortalidad entre grupos, posteriormente se disecaron los corazones, se fijaron en formalina neutra y se almacenaron a 4 °C hasta ser procesados. Se analizó mediante microscopio estereoscópico acoplado a cámara fotográfica (Carl Zeiss, Stereo Discovery V.12): la silueta cardíaca, las relaciones anatómicas entre segmentos cardíacos y se realizó microcirugía de la pared libre del VD

de todos los corazones del experimento. Las relaciones anatómicas se analizaron mediante el empleo del “análisis secuencial segmentario” (ASS), método ampliamente aceptado sobre el abordaje anatómico que revela cardiopatías congénitas o adquiridas (Anderson *et al.*, 1984).

Resultados y discusión

Con el propósito de conocer el efecto que tienen las nanoAu de 20 nm en la interrupción del desarrollo embrionario, medimos la tasa de mortalidad de los embriones en ambos grupos, encontramos en el grupo experimental 17 embriones muertos, correspondientes al 56.6% del total de embriones expuestos. Por el contrario en el grupo control, sólo encontramos 2 decesos 7.1%. La relación entre ambos grupos arrojó un incremento de 7.9 veces la mortalidad en el grupo experimental (tabla 1). Acceder directamente al embrión implica por sí mismo, un posible riesgo de muerte embrionaria principalmente por contaminación; sin embargo, al tener un grupo control “tipo Sham”, en el cual se realizan los mismos procedimientos del grupo experimental con excepción de la administración de nanoAu, pudimos comparar ambos grupos y evidenciar sólo el efecto de las nanoAu. Todos los embriones se monitorearon cada 12 horas, los embriones muertos fueron retirados de inmediato de la incubadora, ningún cadáver fue analizado para ASS debido a que en algunos casos ya presentaban estado de necrosis.

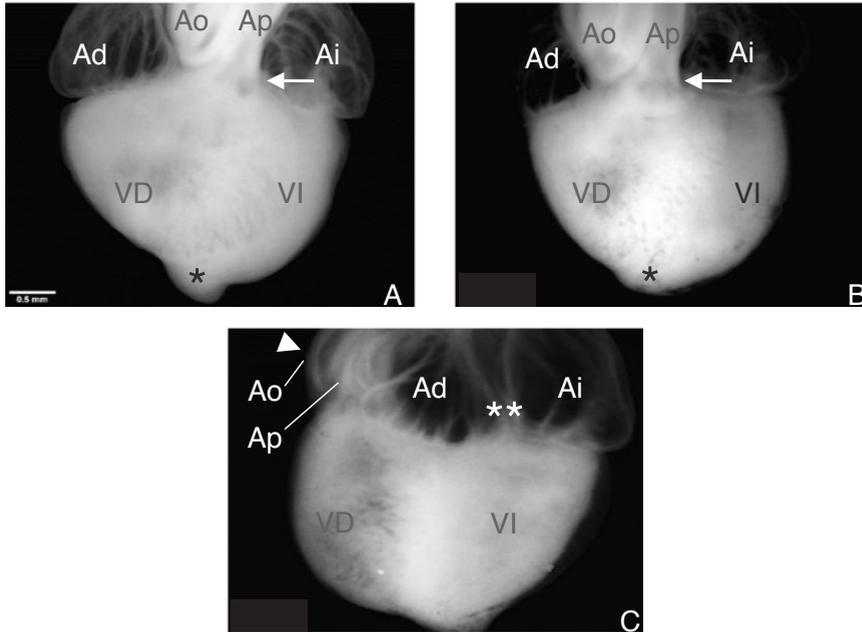
A fin de censar cambios morfológicos durante el desarrollo cardiaco por exposición de nanoAu, disecamos los corazones embrionarios de ambos grupos en estadio 36HH. Mediante microscopio estereoscópico medimos en primera instancia las relaciones de la silueta cardiaca, encontramos en el grupo experimental, cuatro piezas anatómicas con distorsión del ángulo de

TABLA 1. Efecto de NanoAu de 20 nm sobre el desarrollo en embrión de pollo.

| | GRUPO CONTROL n = 30 100 µl bufer de fosfatos | GRUPO EXPERIMENTAL n = 30 100 µl nanoAu de 20 nm |
|---|--|---|
| Embriones muertos durante el experimento (22-36HH) | 2 | 17 |
| Corazones con análisis secuencial segmentario (36HH) | 28 | 13 |
| Embriones con defectos cardiacos | 0 | 4 |
| Corazones con doble salida del ventrículo derecho y comunicación interventricular | 0 | 3 |
| Corazones con comunicación interventricular | 0 | 1 |

Fuente: Elaboración de los autores.

FIGURA 1. Análisis de la silueta cardíaca. (A) Corazón representativo del grupo control, anatomía normal n = 28. (B) Corazón con distorsión del ángulo característico de la arteria pulmonar (flecha), con distorsión del ápice (*), comparar con A. (C) Translocación de los grandes vasos (cabeza de flecha) y segmento atrial en posición anterior con drenaje hacia el VI, (**). AP = arteria pulmonar. Ao = aorta. Ad = atrio derecho. Ai = atrio izquierdo. VD = ventrículo derecho. VI = ventrículo izquierdo.

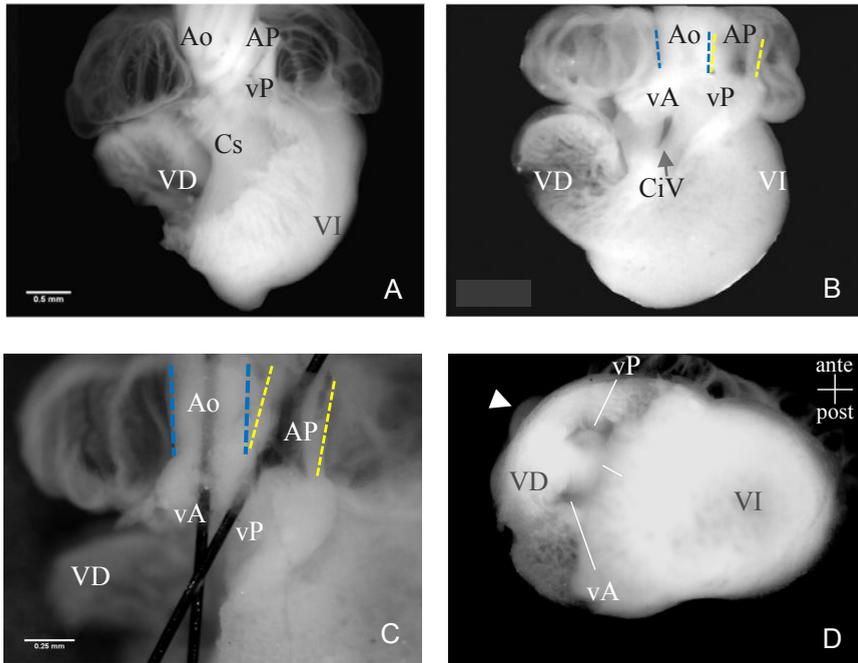


Fuente: Imágenes obtenidas por los autores.

inclinación del tronco de la arteria pulmonar, así como modificación del ápice cardíaco, indicio de posible cardiopatía congénita (figuras 1a, b y c). En uno de los corazones encontramos también, evidente translocación de las grandes arterias así como presencia del segmento atrial fuera de su situación anatómica (figura 1c).

A fin de evidenciar el efecto teratogénico de las nanoAu en el corazón, realizamos microcirugía la pared libre del VD en todos los corazones del experimento. Utilizamos el ASS y confirmamos cuatro corazones con cardiopatía congénita inducida en el grupo experimental, incidencia del 30.77%. En tres de ellos DsVD acompañada de CiV, en el corazón restante sólo encontramos CiV (tabla 1). Algunas características de los corazones malformados fueron: A) Relación del segmento arterial: en dos corazones el tronco de la arteria pulmonar se encontró anterior a la aorta, característica de las relaciones normales entre grandes arterias (comparar figura 2a con 2d); otro con las grandes arterias “lado a lado” (figuras 2b y c) y, en el tercer corazón, las arterias no se encontraban en su ubicación anatómica; sin embargo, con la arteria pulmonar anterior a la aorta (figuras 1c y 2d). B) Relación

FIGURA 2. Análisis anatómico interno del ventrículo derecho. (A) Corazón representativo del grupo control, con anatomía normal n = 28. La válvula pulmonar se aloja en el VD, la cresta supraventricular divide los tractos de salida ventriculares. (B) Corazón representativo del grupo experimental con DsVD n = 3, acompañada de CiVn = 4. (C) Magnificación del segmento arterial de la imagen B, se insertaron filamentos por los troncos arteriales para evidenciar la DsVD del tipo grandes arterias “lado a lado”. (D) Corazón con DsVD “arteria pulmonar anterior y aorta posterior”, los pisos valvulares emergen exclusivamente del VD, se observan parcialmente las grandes arterias (cabeza de flecha), vista inferior. Abreviaturas: Cs = cresta supraventricular; vA = válvula aórtica; vP = válvula pulmonar; VD = ventrículo derecho; VI = válvula pulmonar; ante = anterior; post = posterior.



Fuente: Imágenes obtenidas por los autores.

atrio-ventricular: tres de los corazones malformados mostraron concordancia atrio-ventricular, es decir, los atrios conectaron con sus correspondientes ventrículos, en un corazón se encontró que ambos atrios drenaban sólo al VI (figuras 1c y 2d). C) Tabique interventricular: en cuatro corazones se evidenció CiV, defecto septal del tabique interventricular, consecuente con cortocircuito sanguíneo (figura 2b). D) Tracto de salida ventricular: en tres corazones los pisos valvulares de las grandes arterias (pulmonar y aorta) emergieron exclusivamente del VD (figuras 2b, c y d); en los tres corazones con DsVD no fue posible distinguir la cresta supraventricular. Respecto al grupo control, en los 28 corazones analizados se encontraron las relaciones anatómicas del corazón normal, con tasa de cardiopatías congénitas del 0% (figuras 1a y 2a). Los defectos antes descritos afectan mayoritariamente los

tractos de salida ventriculares así como el tronco de las grandes arterias, patologías que en conjunto se conocen como cardiopatías congénitas troncoconales. Es posible que las nanoAu eleven las especies reactivas de oxígeno en células que intervienen en dos procesos morfogenéticos de la cardiogénesis: la migración desde la cresta neural hacia el corazón en desarrollo o interfieran en el patrón apoptótico normal del cono-tronco. Finalmente, hacemos énfasis en las virtudes del modelo de embrión de pollo, que permite la manipulación directa del embrión, en nuestro caso, la exposición de nanoAu dentro de la cavidad pericárdica, nuestro modelo es ampliamente aceptado para interpretar el desarrollo normal y patológico en humanos (Harvey 1847; Stalberg y DeHaan 1969; de la Cruz *et al.*, 1989, 1991; Kirby *et al.*, 1983; Watanabe *et al.*, 2001; Schroeder 2003; Webb *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2007; Red-Horse *et al.*, 2010).

Conclusiones

Los resultados del presente trabajo muestran que las nanoAu de 20 nm pueden ser causa de la interrupción del desarrollo embrionario, pudiendo incrementar la incidencia de cardiopatías congénitas principalmente la “doble salida del ventrículo derecho” así como defectos septales del tabique interventricular por exposición directa con el corazón embrionario del pollo. Pensamos que es necesaria más investigación profunda que contribuya a regular la disponibilidad de productos con nanoAu para el consumo humano.

Referencias

- Abdelhalim, M. (2011) Gold nanoparticles administration induces disarray of heart muscle, hemorrhagic, chronic inflammatory cells infiltrated by small lymphocytes, cytoplasmic vacuolization and congested and dilated blood vessels. *Lipids in Health and Disease*, 10: 233.
- Abdelhalim, M. y Jarrar, B. (2012) Histological alterations in the liver of rats induced by different gold nanoparticles sizes, doses and exposure duration. *J Nanobiotechnology*, 10: 5.
- Anderson, R., Becker, A., Freedom, R. *et al.* (1984) Sequential segmental analysis of congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*, 5: 281-8.
- Asharani, P., Lianwu, Y., Zhiyucan, G. *et al.* (2011) Comparison of the toxicity of silver gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, vol. 5 núm. 1: 43-54.
- Chen, W., Lou, G., Xu, X. *et al.* (2014) Cancer-targeted functional gold nanoparticles for apoptosis induced and real-time imaging base don FRET. *Nanoscale*, 6(16): 9531-5.
- Cruz de la, M., Sánchez-Gómez, C., Cayre, R. (1991) The developmental components of ventricles: Their significance in congenital malformations. *Cardiol Young*, 1: 123-8.

- Cruz de la, M., Sánchez-Gómez, C., Palomino, M. (1989) The primitive cardiac regions in the straight tube heart (stage 9-) and their anatomical expression in the mature heart: And experimental study in the chick embryo. *J Anat*, 165: 121-31.
- Dam, D., Lee, J., Sisco, P. *et al.* (2012) Direct observation of nanoparticles-cancer cell nucleus interactions. *ACSNANO*, vol. 6 núm. 4: 3318-3326.
- Davis, C. (1927) Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Carnegie Contrib Embryol*, 19: 245-84.
- Fisher, S. (2007) The developing embryonic cardiac outflow tract is highly sensitive to oxidant stress. *Developmental Dynamics*, 236: 3496-3502.
- Fraga, S., Brandao, A., Soares, M. (2014) Short-and long-term distribution and toxicity of gold nanoparticles in the rat after a single-dose intravenous. *S1549-9634(14) 00318-9*.
- Hamburger, B. y Hamilton, L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88: 49-92.
- Harvey, W. (1847) *The works of William Harvey*, traducido por Robert Willis. Impreso para la Sydenham Society. London: C. and J. Adlard. (Publicado *post mortem*).
- Hoffman, J. y Kaplan, S. (2002) The incidence of congenital heart disease. *Journal of the American Collage of Cardiology*. 1890-900.
- Kang, B., Mackey, M. y El-Sayed, M. (2010) Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *J Am Chem Soc*. 132(5): 1517-1519.
- Kelly, R., Brown, N., Buckingham, M. *et al.* (2001) The arterial pole of the mouse heart form Fgf10-expressing cells on pharyngeal mesoderm. *Dev. Cell*, 1: 435-440.
- Kirby, M., Gale, T., Stewardt, D. (1983) Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*, 1059-1061.
- Mateo, D., Morles, S. P., Ávalos *et al.* (2014) Oxidative stress cointrubutes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Toxicol Mech methods*, 24(3): 161-72.
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I. *et al.* (2010) Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature*, 464: 549-553.
- Schroeder, J., Jackson, L., Lee, D. *et al.* (2003) Form and function of developing heart valves: Coordination by extracellular matrix and growth factor signaling. *J Mol Med*, 81: 392-403.
- Selim, M. y Hendi, A. (2012) Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol 13.
- Stalberg, H. y DeHaan, R. (1969) The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol*, 19: 128-59.
- Taylor, U., Garrels, W., Barchanski, A. *et al.* (2014) Injection of ligand-free gold an silver nanoparticles into murine embryos does not impact pre-implantation development. *Beilstein J Nanotechnol*, 5: 677-688.
- Tsai, T., Hou, C., Wang, H. *et al.* (2012) Nucleocytoplasmatic transport blockage by SV40 peptide-modified gold nanoparticles induces cellular autophagy. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 5214-5234.

- Waldo, K., Kumiski, D., Wallis, K. *et al.* (2001) Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*, 128: 3179-3188.
- Watanabe, M., Jafri, A., Fisher, S. (2001) Apoptosis is required for the proper formation of the ventriculo-arterial connections. *Dev Biol*, 240: 274-288.
- Webb, S., Qayyum, S., Anderson, R. *et al.* (2003) Septation and separation within the outflow tract of the developing heart. *J. Anat.*, 202: 327-342.
- Yang, H., Sun, C., Fan, Z. *et al.* (2012) Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Scientific Reports*, 2: 847. DOI: 10.1038.