

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE NANO
PARTÍCULAS DE PLATA EN EL MODELO MURINO BALB/c**

Tesis que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

Presenta:

IDALIA YAZMIN CASTAÑEDA YSLAS

Ensenada, Baja California, Enero de 2022



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERIA

“EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE NANO PARTÍCULAS DE PLATA EN
EL MODELO MURINO BALB/c”

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

IDALIA YAZMIN CASTAÑEDA YSLAS

Aprobado por:

DRA. MARÍA EVARISTA ARELLANO
GARCÍA

Director de tesis
Presidente del Comité

DR. JUAN CARLOS GARCIA RAMOS
Co-director de tesis
Miembro del Comité

DRA. PATRICIA RADILLA CHAVEZ
Sinodal
Miembro del Comité

DRA. OLIVIA TORRES BUGARÍN
Sinodal
Miembro del Comité

DRA. NINA BOGDANCHIKOVA
Sinodal
Miembro del Comité

RESUMEN

Las nanopartículas de plata se utilizan ampliamente en diversas aplicaciones médicas por sus propiedades antifúngicas, antivirales y bactericidas, pero sigue persistiendo un vacío y controversia respecto a su toxicidad. Existen dudas sobre si las propiedades de las nanopartículas desde su producción, preparación, almacenaje, funcionalización, entre otras características influyen en sus niveles de toxicidad. Es por esto que en el presente trabajo, se explora la citotoxicidad y genotoxicidad de las nanopartículas de plata Argovit® en el modelo murino BALB/c, de forma que sea posible contrastar su cito-genotoxicidad contra los agentes antineoplásicos ciclofosfamida (CP) y citosina arabinosa (Ara-C), sustancias conocidas por sus propiedades citotóxicas y genotóxicas, con la finalidad de contribuir en el diseño de tratamientos quimioterapéuticos que disminuyan el efecto adverso causado por los tratamientos actuales. Se determinó la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) para determinar la estabilidad medular y la de eritrocitos micronucleados (EMN) para evaluar genotoxicidad, y se observó frecuencia similar de EPC en el grupo control como en el grupo expuesto a AgNPs, sin embargo los organismos expuestos a 6 mg /kg de AgNPs de forma oral posterior a la administración de 50 mg/kg de CP disminuyeron la mielo supresión. La administración de AgNPs disminuyó el efecto genotóxico agudo de la CP, reduciendo hasta en 50% la frecuencia registrada de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (EPCMN). Es la primera vez que se describe una formulación de AgNPs como amortiguador de daño genotóxico provocado por un antineoplásico, se observó retraso de la aparición de micronúcleos después de administrar múltiples

veces CP. Estos resultados pueden contribuir a nuevos diseños de tratamientos terapéuticos.

Palabras Clave: AgNPs, Argovit®, Citotóxico, Genotóxico, Antineoplásicos, Ciclofosfamida, Prueba de micronúcleos en sangre periférica, Micronúcleos en eritrocitos.

DEDICATORIA

A mi esposo e hija:

Miguel Antonio Flores Galvan

Yazmin Esmeralda Flores Castañeda

A mi madre y hermanos:

María Petra Islas Hernández

Laura Leticia Castañeda Islas

Carlos Alberto Castañeda Islas

Y en memoria de mi padre:

Guillermo Castañeda Martínez

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca # 417307, a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y su programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI), a la Red Internacional de Bionanotecnología con Impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad por su apoyo económico y académico durante la realización de este trabajo, al Centro de Producción Científica Vector Vita (Novosibirsk, Rusia) por donar las nanopartículas de plata con las que se realizó este estudio. A la Universidad Autónoma de Guadalajara por recibirnos y prestarnos las instalaciones para la realización de los esquemas de tratamiento y la toma de muestra de los ratones.

A mi directora de tesis, la Dra. María Evarista Arellano García, quien ha sido un pilar para la realización de este trabajo, por su apoyo, confianza y cariño, su ayuda a nivel académico y personal han permitido que yo pudiera seguir con mis estudios y tener la oportunidad de alcanzar este gran logro. Toda mi vida estaré agradecida con usted, siempre estará presente en mis recuerdos y forma parte de mi corazón.

A la Dra. Olivia Torres Bugarín por sus enseñanzas en las técnicas de micronúcleos, gracias por todo su apoyo académico y también por su enseñanza a nivel personal y profesional, le agradezco abrirnos la puerta de su casa y por darnos esa confianza para conocer a su bonita familia, a ambas Doctoras les deseo siempre lo mejor para ellas y sus familias.

A mi Co-Director de tesis y Sinodales, Dr. Juan Carlos García Ramos, Dra. Nina Bogdanchikova, Dra. Patricia Radilla Chávez, quienes supervisaron académica y logísticamente las diferentes etapas de mi trabajo de tesis, además por alentarme a terminar y no abandonar este trabajo. Le agradezco por lo mismo a la Dra. Yanis Toledano Magaña que, aunque no es parte de mi sínodo, es como si lo fuera, por todo su apoyo y sugerencias tanto en el transcurso de la tesis como en la realización del artículo.

A mis compañeros M.C. Carmen Jáuregui, Dr. Balam Ruiz, Dr. Francisco Casillas y al Dr. Roberto Luna, muchas gracias por formar parte de este gran equipo de genotoxicidad y por todo su apoyo, sobre todo al Dr. Balam Ruiz Ruiz por su ayuda en Guadalajara para realizar la parte metodológica de este trabajo ya que, sin su ayuda en la sujeción y aplicación de fármacos a los ejemplares experimentales, el trabajo de laboratorio hubiese llevado más tiempo. También agradezco a la Maestra en Ciencias Verónica Campos por su ayuda como doble ciego en el conteo de los biomarcadores, gracias Vero.

A la Doctora Karla Oyuki Juárez Moreno quien en su momento también me brindó su apoyo tanto en lo académico como en lo personal.

A los profesores de la UABC, por todas sus enseñanzas.

A mi mamá y hermanos, sobre todo a Carlos Alberto Castañeda ya que me ayudo en tiempos difíciles, sobre todo quiero agradecer a mi amado esposo Miguel Antonio Flores Galvan y a mí amada hija Yazmin Flores Castañeda, quienes han

soportado las largas jornadas de trabajo que han provocado mi ausencia, por su comprensión, ayuda y apoyo, los amo.

¡GRACIAS A TODOS!

INDICE

AGRADECIMIENTOS	V
INDICE	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	4
Nanopartículas de plata.....	4
Argovit®.....	12
Actividad antiviral	12
Efecto bactericida	14
Efectos en sistema inmunológico	14
Genotoxicidad y citotoxicidad en plantas	15
Efectos genotóxicos y citotóxicos en células sanguíneas humanas.....	16
Genotoxicidad y citotoxicidad en células de cáncer y efecto antitumoral y antiproliferativo.....	17
Antineoplásicos: ciclofosfamida y citosina arabinosa	19
Genotoxicidad y citotoxicidad	22
OBJETIVOS.....	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
METODOLOGÍA	27
Propiedades fisicoquímicas de las AgNPs	27
Compuestos evaluados	28

Diseño experimental.....	28
Ratones BALB/c.....	28
Grupos de trabajo: Ciclofosfamida.....	29
Grupos de trabajo: Arabinosa-C.....	31
Prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica	32
Análisis de datos	34
Toxicidad general.....	35
Citotoxicidad en grupo de trabajo Ciclofosfamida	35
Genotoxicidad con grupo de trabajo Ciclofosfamida.....	37
Citotoxicidad y genotoxicidad con Arabinosa-C.....	41
DISCUSIÓN GENERAL	46
CONCLUSIONES.....	56
RECOMENDACIONES	57
LITERATURA CITADA	58
Anexo 1.....	80
Eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos totales (EPC/1000 ET) en los diferentes grupos de estudio.	80
Anexo 2.....	81
Eritrocitos micronucleados (EMN/10,000 ET) en los diferentes grupos de estudio. 	81
Anexo 3.....	82
Productos obtenidos	82
Anexo 4.....	89
Abreviaturas	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de formación de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica	25
Figura 2. Esquemas de administración.....	30
Figura 3. Esquemas de administración con Ara-C.....	31
Figura 4. Secuencia de pasos seguidos en el laboratorio para la obtención de laminillas y tinción con naranja de acridina.	33
Figura 5. Imagenes representativas de cada biomarcador.	34
Figura 6. Eritrocitos policromáticos observados en 1000 eritrocitos totales	36
Figura 7. Eritrocitos policromáticos micronucleados observados en 1000 eritrocitos policromáticos	38
Figura 8. Número de eritrocitos micronucleados observados en 10, 000 eritrocitos totales..	41
Figura 9. Eritrocitos policromáticos observados en 1000 eritrocitos totales (Grupo de trabajo Ara-C)	42
Figura 10. Número de eritrocitos micronucleados observados en 10, 000 eritrocitos totales (Grupo de trabajo Ara-C).....	44
Figura 11. Eritrocitos policromáticos micronucleados observados en 1000 eritrocitos policromáticos (Grupo de trabajo Ara-C).....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos (EPCMN/1000 PCE).	40
--	----

Tabla II. Estudios de citotoxicidad y genotoxicidad de AgNPs con la prueba de micronúcleos en eritrocitos de ratones.	51
---	----

INTRODUCCIÓN

El uso de nanomateriales induce a considerarlos como desarrollos tecnológicos de reciente data, aunque sus antecedentes pueden rastrearse desde los primeros siglos de nuestra era. Uno de los primeros y más antiguos registros que se tienen sobre el uso de los nanomateriales por el hombre se remonta al siglo cuatro después de Cristo, cuando los sopladores de vidrio romanos utilizaban pequeñas partículas de oro para crear una copa cuya característica era su cambio de coloración de un verde a un color rubí al ser atravesada por los rayos de luz; propiedad atribuida al tamaño de las partículas de oro con las que estaba fabricada la copa, dichas partículas tenían un diámetro menor a 30 nanómetros. Esta característica incitó a Michael Faraday a estudiar ese fenómeno y tratar de explicarlo, por lo que a partir de 1857 en adelante se dio a conocer la relación existente entre las propiedades de una partícula y el tamaño que esta poseía. Este fue el origen hacia finales del siglo XX de la acuñación del término nanotecnología, el cual contempla el entendimiento y control de la materia con dimensiones entre 1 y 100 nanómetros. En ese mismo siglo se vieron grandes avances en el campo de la nanotecnología gracias a la creación del microscopio de efecto túnel (Leon *et al.*, 2019; Mulvaney, 2015).

Todos los avances científicos en el área de los nanomateriales de la última década ayudaron a que en la actualidad se puedan sintetizar nanopartículas de diferentes materiales; a partir de carbono, sílice, compuestos orgánicos, de biopolímeros como el quitosano e inorgánicos (metales) (Plácido *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2005; Salamat *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2018; Younes *et al.*, 2020). De estos

últimos se destaca la categoría de nanopartículas de metales nobles, Pt (platino), Au (oro), Rh (rodio), Ru (rutenio), Ir (iridio), Os (osmio), Pd (paladio) y Ag (plata) (Bing Tan *et al.*, 2020).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, el uso de este tipo de nanopartículas en diferentes campos va en aumento. En el caso de las nanopartículas de plata o AgNPs por sus siglas en inglés, es relevante, principalmente en el campo de la biomedicina. Esto se debe a que se le atribuyen propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales (Biswas y Dey, 2015) e incluso actividad anti inflamatoria, por lo cual las AgNPs son ampliamente utilizadas para diagnóstico, tratamiento, administración de fármacos, recubrimiento de dispositivos médicos y para el cuidado de algunos padecimientos. Todas estas aplicaciones en un área tan importante y delicada como el de la biomedicina incentivó el aumento en los últimos cinco años del número de investigaciones sobre la toxicidad de las AgNPs, aun así, poco se ha concluido sobre los factores que inciden en su toxicidad a nivel celular y se desconoce si presentan propiedades anti genotóxicas (Liangpeng , *et al.* 2014).

El interés por el desarrollo de aplicaciones terapéuticas y farmacológicas de las AgNPs plantea la necesidad de establecer las condiciones de su uso seguro para los seres humanos, sobre todo cuando se trata del diseño de mecanismos de entrega de fármacos a nivel molecular (Martínez-Espinosa , *et al.* 2012). Aún existen serias dudas sobre si las propiedades de las nanopartículas desde su producción, preparación, almacenaje, funcionalización, entre otros procesos tales como el tipo

de agente precursor, el agente reductor utilizado, tamaño promedio de la partícula, la forma, tipo de ligando, etc., influyen en sus niveles de toxicidad (Monge 2014).

En la investigación sobre la toxicidad de las nanopartículas de plata, sigue persistiendo un vacío y controversia respecto al entendimiento de las vías del daño a nivel celular, en lo referente a las pruebas experimentales y su tamaño. Diversas investigaciones demuestran que son tóxicas por ejemplo en animales acuáticos, ya que producen especies reactivas de oxígeno (ROS), aberraciones cromosómicas, sobreexpresión del gen p53, necrosis, apoptosis, formación de micronúcleos, entre otros daños (El Mahdy, *et al.* 2015, Huk, *et al.* 2015).

Los micronúcleos son considerados como marcadores biológicos que permiten identificar la genotoxicidad e inestabilidad genómica de diferentes materiales y sustancias en diversos tejidos y mucosas. Esto es debido a su proceso de formación, ya que el micronúcleo consiste en un cromosoma completo o solo fragmentos de cromosomas rezagados fuera del núcleo durante la división celular, por lo que, la técnica de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica evalúa el número de eritrocitos maduros e inmaduros y la presencia de micronúcleos en estas células (Hayashi *et al.*, 1994; Zúñiga-González *et al.*, 2001).

Esta técnica proporciona cuatro biomarcadores para la interpretación del proceso de citotoxicidad y genotoxicidad en eritrocitos de sangre periférica: eritrocitos normocromáticos (EN), eritrocitos policromáticos (EPC), eritrocitos micronucleados (EMN) y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) (Torres-Bugarín *et al.*, 2007). Los valores obtenidos de estos cuatro biomarcadores

son esenciales para la determinación de la citogenotoxicidad de materiales y sustancias.

El presente trabajo explora la citogenotoxicidad de nanopartículas de plata Argovit® en el modelo murino BALB/c mediante la técnica de micronúcleos de sangre periférica, de forma que sea posible contrastar su citogenotoxicidad contra agentes antineoplásicos como ciclofosfamida (CP) y citosina arabinosa (Ara-C), ampliamente conocidos por sus propiedades citotóxicas y genotóxicas. La información obtenida permite sugerir que algunas dosis de las AgNPs Argovit® son seguras y biocompatibles para uso en aplicaciones biomédicas.

ANTECEDENTES

Nanopartículas de plata

En el mercado actual se pueden encontrar varias compañías que ofrecen distintos tipos de AgNPs. Nano XACT por ejemplo, ofrece varios tipos de AgNPs con diversas formas: esféricas, planas o nanocubos. Las hay sin recubrimiento o con diversos revestimientos como la polivinilpirrolidona (PVP), citrato, o en solución acuosa y también con tamaños diversos (Oldenburg, 2004). Otras compañías como Vector-Vita ofrece actualmente más de cuatro formulaciones y productos distintos basados en AgNPs, entre ellos Argovit™ (Burmistrov, 2005). Otros productos también pueden encontrarse como unas nano partículas de plata con posición del

pico de absorción en ancho intervalo de longitud de onda de 400 nm hasta los 950 nm (Huk, Izak-Nau and Reidy, *et al.* 2014, Massarsky, *et al.* 2014, Olasagast, *et al.* 2014).

Los métodos químicos por los cuales son sintetizadas las nanopartículas metálicas incluyen la reducción química, fotoquímica, la electrolisis y pirólisis. Los métodos físicos incluyen el método de vaporización y molienda, mientras que los biológicos emplean bacterias, plantas y hongos (Kushwaha *et al.* 2015). Algunos de estos métodos de síntesis utilizan químicos tóxicos para estabilizar las nanopartículas, lo cual los convierte en un riesgo potencial tanto para la salud como para el ambiente.

Los nanomateriales, deben ser caracterizados con respecto a sus diferentes propiedades fisicoquímicas, para lo cual se puede utilizar el espectrofotómetro de luz UV visible, microscopia por escaneo de electrón (SEM) y difracción de rayos X (XRD), (Umoren, Obot, y Gasem, 2014).

Actualmente las nanopartículas de plata y oro son muy utilizadas en aplicaciones en diferentes áreas como: electrónica, en revestimientos, embalaje, biotecnología, tecnología de alimentos y especialmente en medicina; el uso de AgNPs en esta última rama es debido a que presenta, además de cualidades anti fúngicas y antivirales, propiedades bactericidas, abarcando un gran espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como bacterias asociadas a infecciones intrahospitalarias (Swathy 2014; Biswas y Dey 2015).

Para las aplicaciones biomédicas, el tipo de recubrimiento que se utiliza en muchas formulaciones es el PVP, polímero que evita que las AgNPs se aglomeren en soluciones acuosas, permite la dispersión estable y prolonga el tiempo de circulación de las nanopartículas en el retículo endotelial; lo más importante de este polímero es su hidrosolubilidad, no tiene carga y no es tóxico, por lo que se le considera seguro para utilizarse en biomateriales para aplicaciones médicas (Hayama *et al.*, 2004; Kumar y Abraham, 2016).

La gran demanda de uso de las nanopartículas de plata, han llevado a conducir diversos estudios en los cuales se utiliza una gran diversidad de modelos biológicos como ratones, plantas, y cultivos celulares que a su vez generan controversia respecto a encontrar el mejor modelo para detectar toxicidad al mismo nivel celular.

En las líneas celulares se pueden mencionar algunos estudios como el de Souza *et al.* (2016), donde se utilizaron las líneas celulares de ovario de hámster chino CHO- K1 y CHO-XRS5 para evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad de las AgNPs e identificar si presentan toxicidad dependiente del tamaño de la nanopartícula. Expusieron a los cultivos a diferentes concentraciones de AgNPs 0.025 – 5.0 µg/ml durante 24 horas, utilizaron dos tamaños de nanopartículas, 10 nm y 100 nm, no especificaron el recubrimiento. Analizaron mediante el ensayo de viabilidad celular, ensayo clonogénico, ensayo cometa, citometría de flujo y prueba de micronúcleos. Encontraron que las nanopartículas de 100 nm indujeron mayor citotoxicidad y genotoxicidad en comparación con las de 10 nm. Por lo que sugieren

que la exposición a nanopartículas de un tamaño mayor puede producir más daño que aquellas con menor tamaño.

Park y colaboradores (2011), también llevaron a cabo un estudio de citotoxicidad y genotoxicidad en líneas celulares, utilizaron fibroblastos embrionarios (MEF-Lac) los cuales se expusieron a 0.1 – 100 µg/ml de AgNPs nano Composix Inc. de diferentes diámetros, 20, 80 y 110 nm, recubrimiento no especificado, durante 16 horas. En estos experimentos revelan que las AgNPs de 20 nm no indujeron, e incluso no incrementaron la frecuencia de mutación con 3 µg/ml, pero al contrario, por arriba de dicha concentración resultaba ser demasiado citotóxica. Por otra parte, los experimentos tratados con las nanopartículas de 113 nm de diámetro sí incrementaron la frecuencia de mutación en comparación con el grupo control, aunque observaron que el incremento no estaba relacionado con la dosis ni fue estadísticamente significativa. Observaron los mismos resultados para las nanopartículas de 80 nm, pero a diferencia de las de 113 nm, si indujo un detrimento del 20% de la actividad metabólica. Los autores sugieren que las concentraciones que indujeron un incremento en la frecuencia de mutación de genes eran citotóxicas.

Entre los estudios con mamíferos resalta el realizado por Nallanthighal *et al.*, (2017) quienes investigaron el estrés oxidativo, el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) y acumulación de nanopartículas de plata con dos diferentes recubrimientos, uno de citrato y el otro de PVP en el estómago de ratones C57BL / 6J pun / pun. Ambas AgNPs se administraron de forma oral diariamente durante siete días, con una dosis de 4 mg/Kg. Sus resultados mostraron que nano partículas de plata recubiertas con PVP no generaban una inducción de daño al ADN por estrés

oxidativo, además de que no se presentó incremento en la frecuencia de micronúcleos en la célula. En relación con la acumulación en el estómago, estos autores mencionan que las AgNPs recubiertas con PVP no son muy susceptibles a aglomerarse, en cambio las AgNPs recubiertas con citrato, tienden a aglomerarse, ya sea en presencia o ausencia de proteínas en los jugos gástricos y por lo tanto, a inducir genotoxicidad tanto en sangre periférica como en medula ósea. Los autores concluyen que una alta aglomeración en el jugo digestivo de nanopartículas está asociada a una alta genotoxicidad en tejidos debido a la liberación de los iones de plata.

Li y colaboradores (2014) realizaron un estudio para evaluar el efecto dosis respuesta de la formulación de AgNPs NanoComposix, Inc., además de evaluar el posible efecto del tamaño de la nanopartícula y el recubrimiento. Su estudio se llevó a cabo en ratones macho B6C3F1, conformaron 2 grupos de 5 ratones de 7 semanas de edad con un peso entre 25-30 gr. Al primer grupo le suministraron nanopartículas de plata con un tamaño de 5 nm recubiertas de PVP, una sola inyección, vía intravenosa, con dosis de 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 o 20.0 mg/kg; para tratar de registrar el efecto dosis respuesta. Al segundo grupo los autores le suministraron nano partículas de plata con un tamaño de 15-100 nm o de 10-80 nm con recubrimiento de silicón mediante una inyección vía intravenosa, empleando una dosis única de 25 mg/Kg, durante 3 días consecutivos. De esta manera, ellos pudieron observar el efecto del tamaño y el recubrimiento mediante el ensayo de micronúcleos *in vivo* y el ensayo cometa, tanto en sangre como en medula ósea (Li *et al.*, 2014). Los resultados que obtuvieron son opuestos al de todos los autores

anteriores, ya que en este estudio observaron una reducción de reticulocitos (EPC) en los animales con tratamiento de nanopartículas de plata recubiertas con PVP y, aunque no observaron aumento de micronúcleos en reticulocitos, si demostraron que las AgNPs pueden afectar medula ósea e hígado del ratón y generar citotoxicidad para los reticulocitos y daño al ADN por las especies reactivas de oxígeno en el hígado (Li *et al.*, 2014).

En cuanto a las diferencias de los recubrimientos a los que se deben sus resultados, Li y colaboradores, (2014) concluyen que en el caso de las AgNPs recubiertas con PVP, la citotoxicidad en medula ósea se debió a que este recubrimiento prolonga el tiempo de acción de las nanopartículas, porque permanecen más tiempo en el plasma. En cambio, los autores atribuyen la diferencia de daño en medula ósea por las nanopartículas recubiertas con silicona debido a que estas tienen gran tamaño, de donde infieren que no tienen acceso a la medula ósea, la cual tiene en su endotelio discontinuo poros de 50 a 100 nm de tamaño. Con base en estos hallazgos, los autores sugieren que los diferentes recubrimientos de las nano partículas tienen efectos significativos tanto en la distribución como en la citotoxicidad en los diferentes tejidos (Li *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Dobrzyńska y colaboradores (2014) en ratas Wistar machos de 14 semanas de nacidas investigaron la citotoxicidad y genotoxicidad de dos diferentes nanopartículas, una de dióxido de titanio (TiO₂NPs) y la otra, nanopartículas de plata (PlasmaChem). Experimentaron con 6 grupos de 7 ratones cada uno y con una inyección en la vena de la cola, les suministraron una dosis única a cada grupo de la siguiente manera: de 5 mg/kg de AgNPs de 20 nm,

10 mg/kg de AgNPs de 20 nm, 5 mg/kg de AgNPs de 200 nm, 5 mg/kg de TiO₂NPs de 21 nm, los dos grupos restantes conformaron el grupo control sin tratamiento y el grupo control del disolvente (disolución acuosa de NaCl). Para las pruebas de geno- y citotoxicidad usaron el ensayo cometa y ensayo de micronúcleos. Utilizaron sangre de la medula ósea del fémur de las ratas y las analizaron a las 24 h, a la semana y a las 4 semanas de haber estado expuestas. En sus resultados observaron que las nanopartículas no causaban citotoxicidad en glóbulos rojos y blancos de medula ósea, sin embargo, una sola dosis de AgNPs inducía una frecuencia elevada de micronúcleos en eritrocitos policromáticos, no solo después de 24 horas de exposición sino a la semana, incluso cuatro semanas después. Al contrario, las nanopartículas de dióxido de titanio solo elevaron la frecuencia de los micronúcleos policromáticos después de 24 horas de exposición (Dobrzyńska *et al.*, 2014).

Otro estudio en ratas, en este caso Sprague-Dawley, realizado por Kim *et al.* (2008) con el objetivo de investigar la toxicidad oral de las nanopartículas de plata así como su genotoxicidad y distribución en el tejido relacionado con el género. Para ello utilizaron AgNPs de NAMATECH Co., Ltd. con un tamaño promedio de 60 nm administrando de forma oral durante 28 días a ratas hembra y macho de 4 semanas de nacidas, de esta manera formaron 4 grupos de 10 ratas y utilizaron la siguiente administración: vehículo control (0.5% carboximetil celulosa), grupo de dosis baja (30 mg/kg), dosis media (300 mg/kg) y grupo de dosis altas (1000 mg/kg). Fue hasta la sexta semana que los autores administraron AgNPs con una dosis de 10 ml/kg vía oral durante 28 días, al término de los cuales se les practico eutanasia y se les

realizaron análisis de bioquímica y hematología, histopatología, determinación de la cantidad de plata en el tejido y para la genotoxicidad, el ensayo de micronúcleos en medula ósea. A pesar de haber administrado tantos días de forma oral las nanopartículas, ellos no notaron ningún cambio en el peso corporal, aunque si registraron un daño al hígado tanto de machos como de hembras en dosis de más de 300 mg de nano partículas de plata. Además, la distribución en el tejido la registraron como dosis dependiente en todos los órganos, solo en riñón observaron que, específicamente en el de las hembras, la acumulación era mayor. Con respecto al estudio de genotoxicidad, ellos no observaron diferencia estadística significativa entre el número de micronúcleos policromáticos o el número de eritrocitos policromáticos comparados con el grupo control, por lo que sugieren que las AgNPs que utilizaron no induce toxicidad genética en medula ósea en un experimento *in vivo* (Kim *et al.*, 2008).

Para observar los efectos producidos por nanopartículas de plata de diferentes tamaños y recubrimientos en la cinética de eliminación fecal, así como la acumulación de las nanopartículas en el tejido, Bergin y colaboradores en 2016 realizaron un estudio donde utilizaron ratones macho C57BL/6NCrl de 6 semanas de nacidos, con los cuales fueron creados 9 grupos. Utilizaron la siguiente administración para cada uno de ellos: agua como grupo control negativo; acetato de plata (AgOAc); AgNP recubierta de citrato con un tamaño de 20 nm; AgNP recubierta de citrato de 110 nm; AgNP con recubrimiento de PVP con un tamaño de 20 nm; AgNP con recubrimiento de PVP de 110 nm; buffer de citrato 2 mM; PVP 10 kDa en agua estéril y PVP 40 KDa en agua estéril; algunos de los tratamientos con

AgNPs fueron combinados con antibióticos. La dosis de AgNPs que los autores aplicaron fue de 0.1, 1.0 o 10 mg/kg de forma oral por 3 días consecutivos. A pesar de haber utilizado la misma marca de nano partículas de plata que Li y colaboradores en 2014, NanoComposix, ellos no encontraron signos de toxicidad y tampoco una acumulación significativa en órganos. Además, entre el 70.5% y el 98.6% de la dosis administrada de plata fue recuperada en las heces, tanto el tamaño como el recubrimiento, no afectaron sus resultados en heces y en la acumulación en órganos, por lo que ellos sugieren que una dosis relevante a una exposición oral en humanos a este tipo de nanopartículas de plata se vería asociada más a una eliminación fecal y no a una acumulación en tejidos y toxicidad (Bergin *et al.*, 2016).

Argovit®

Argovit® es una formulación comercial de nano partículas de plata producidas en Rusia por la compañía Vector Vita, LTD, la cual desde el año 2004 ha sido estudiada tanto *in vitro* como *in vivo* por sus múltiples aplicaciones biomédicas las cuales se mencionan a continuación

Actividad antiviral

En el 2004 estudiaron de manera *in vitro* la efectividad antiviral de 11 diferentes fármacos entre ellas Argovit® contra el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y la diarrea viral bovina (DVB). La concentración inhibitoria del 50% la determinaron en cultivos celulares de MDBK y KCT, donde encontraron que esta formulación de nanopartículas de plata inhibía la reproducción de IBR por 100 veces

al igual que otro fármaco utilizado llamado eracond. En cuanto al DVB, Argovit® junto con otros fármacos entre ellos el Aciclovir disminuyeron la efectividad productiva del virus (Glotov *et al.*, 2004)

La efectividad antiviral de Argovit® no solo se ha estudiado en cultivos celulares, sino que también en animales o en una combinación de ambos, como es el caso del estudio realizado por Borrego y colaboradores en el 2016, los cuales utilizaron mono capas de células Vero y ratones transgénicos 129Sv/Ev IFNAR de 8 –10 semanas de nacidos para probar la efectividad de las nano partículas de plata en contra del virus de la fiebre del valle del Rift. Para lograr sus objetivos ellos utilizaron 12 mg/ml de Argovit® los cuales se aplicaron antes y después de inocular animales y cultivos celulares con el virus. Los autores encontraron que al utilizar Argovit® antes de la infección con el virus reducía la fuerza en la que el virus ataca las células sanas tanto en los estudios con cultivo celular como en ratones (Borrego *et al.*, 2016).

Otro de los estudios que se pueden encontrar sobre este tema es en perros, Bogdanchikova y colaboradores en el 2016 encontraron que al utilizar nanopartículas Argovit® con una dosis de 1.8 mg/ml en perros enfermos con el virus del moquillo canino presentaban una alta tasa de recuperación sin secuelas, pero solo aquellos animales que no tenían daños neurológicos provocados por la enfermedad, ya que en caninos con síntomas de daño neurológico el tratamiento no era suficiente para poder revertir la enfermedad (Bogdanchikova *et al.*, 2016).

Ochoa Meza y colaboradores, 2019 estudiaron la efectividad de Argovit® al aplicar una sola dosis equivalente a 12 ng/ml de nanopartículas de plata en contra del virus de la mancha blanca, la cual es la enfermedad que más ataca los cultivos de camarón. Observaron que bajo esta dosis se produjo un 20% de sobrevivencia en camarones infectados con el virus de la mancha blanca y que además al aplicar nanopartículas se incrementaba una respuesta inmunológica sin ocasionar efectos tóxicos en los camarones, tanto sanos como los expuestos al virus (Ochoa-Meza *et al.*, 2019).

Efecto bactericida

En un estudio conducido por Semenov y Fidarova en 2012, exploraron la eficacia de las nanopartículas Argovit® como tratamiento en pacientes que presentaban otitis media crónica supurativa, su estudio se llevó a cabo en 35 pacientes que iban desde los 12 a los 69 años y quienes habían tenido una intervención quirúrgica en la cavidad timpánica del oído medio. Observaron que los síntomas se eliminaron y se redujo la exudación además de ayudar en el proceso de la formación de nueva epidermis (Semenov y Fidarova, 2012).

Efectos en sistema inmunológico

Kalmantaeva y colaboradores en el año 2014 realizaron un estudio con ratones hembra BALB/c de 7 y 8 semanas de edad con un peso de 18-20 g, el objetivo de los autores fue analizar el efecto de las nanopartículas de plata Argovit® en el sistema inmunológico del ratón bajo diferentes rutas de administración (inhalada, intragástrica y subcutánea) con una dosis de 0.1 µg/kg durante 28 días.

Estudiaron los pulmones, hígado, riñones, bazo, ganglios linfáticos y suero sanguíneo mediante histología y métodos inmunológicos. En sus resultados ellos observaron la inexistencia de efectos tóxicos en las células inmunológicas de los órganos, aunque si registraron cambios en la cantidad de linfocitos T y B en bazo, así como en la producción de citosinas pro inflamatoria en las administraciones inhaladas e intragástricas. En cuanto a la administración subcutánea, incrementó la producción de linfocitos T (Kalmantaeva *et al.*, 2014).

Genotoxicidad y citotoxicidad en plantas

No solo en líneas celulares o en animales se ha probado la efectividad de Argovit® sino que también en plantas. Debido a la gran demanda de algunos cultivos y los problemas que tienen al producirlos a gran escala han buscado alternativas como la nanotecnología sobre todo en lo relacionado con microorganismos que atacan las plantas. Por ello, Bello-Bello y colaboradores en 2018 estudiaron los efectos genotóxicos y citotóxicos de las AgNPs en la vainilla (*Vanilla planifolia*). Expusieron explantes a crecer con dosis de 25 a 50 mg/L, observaron que a pesar de un largo periodo de haber estado expuestas a la formulación de nanopartículas presentaron un total de porcentaje de aberraciones cromáticas menor del 5%, es decir solo tres micronúcleos en 3000 células sanas, por lo que la dosis utilizada por ellos la consideraron como segura para uso en explantes de *Vanilla planifolia* bajo condiciones *in vitro*. Además encontraron que la formulación de nanopartículas incrementaba el polimorfismo en esta planta (Bello-Bello *et al.*, 2018).

Otro estudio, pero ahora realizado en *Allium cepa* conducido por Casillas-Figueroa y colaboradores en 2020, aborda la preocupación por el uso seguro de estas nanotecnologías y evalúan la citotoxicidad y la genotoxicidad mediante la técnica de micronúcleos. Observaron que con un intervalo de 5–100 µg/mL las AgNPs no induce ningún daño citotóxico o genotóxico a la planta, sugieren que es el resultado de utilizar nanopartículas de plata con una recubierta de PVP específico. Mencionan que en otros estudios con diferentes formulaciones de AgNPs independientemente de su tamaño y concentración utilizadas producían fitotoxicidad (Casillas-Figueroa *et al.*, 2020).

Efectos genotóxicos y citotóxicos en células sanguíneas humanas

Para probar la efectividad y la nula toxicidad de Argovit® en células sanguíneas humanas se pueden mencionar dos estudios. El primero, realizado por Ruiz-Ruiz y colaboradores en 2020 donde comparó dos formulaciones comerciales diferentes de nanopartículas de plata: Argovit® y nanoComposix ambas con recubrimiento de PVP, en concentraciones de 0.012 a 12 µg/mL y las muestras las analizaron mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citoquinesis. En sus resultados observaron que no había evidencia de daño genotóxico y citotóxico causado por Argovit®, por el contrario, la formulación nanoComposix si presentó daño cito y genotóxico (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2020).

El segundo estudio es el de Luna-Vázquez en 2021, donde se evaluó la toxicidad mediante el ensayo de hemólisis, comparando Argovit® con nitrato de

plata (AgNO_3), utilizando una concentración de 24 $\mu\text{g/mL}$ de plata metálica en eritrocitos de una persona sana que donó su sangre y un donador diabético. Sus resultados mostraron que bajo esa concentración Argovit® no mostró efecto hemolítico en los eritrocitos de ambos donadores, mientras que AgNO_3 en la misma concentración produjo más del 10% de hemólisis en ambos donadores (Luna-Vázquez-Gómez *et al.*, 2021). Es necesario tomar en cuenta que, para que un compuesto sea considerado no hemolítico debe de generar menos del 5% de hemólisis comparado con el control, entre 5 y 10% de hemólisis se considera un agente hemolítico potencial y más de 10% de hemólisis se considera un franco agente hemolítico.

Genotoxicidad y citotoxicidad en células de cáncer y efecto antitumoral y antiproliferativo

En 2017 se evaluó el potencial citotóxico en 8 líneas de cáncer y el genotóxico para las líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa) y de mama (MDA-MB-231 y MCF7). Encontraron que con una concentración máxima inhibitoria se inducía la formación de especies reactivas de oxígeno y que a las 12 o 24 horas de incubación se observaba genotoxicidad mediante ensayo cometa. También evaluaron la dosis media de la concentración máxima inhibitoria, pero en este caso, no observaron resultados con diferencia estadísticamente significativa, por lo que los autores concluyen que el efecto genotóxico y citotóxico es dosis dependiente en las 8 líneas celulares de cáncer. De esta manera exploraron una aplicación

terapéutica de las nanopartículas de plata en células cancerígenas que dio una pauta para el estudio de la genotoxicidad y citotoxicidad en células normales y cancerígenas en modelos murinos (Juarez-Moreno *et al.*, 2016).

Con respecto a estudios enfocados en una respuesta antiproliferativa y antitumoral de las nanopartículas Argovit® Valenzuela-Salas y colaboradores en 2019, estudiaron la efectividad de dicha fórmula con células de melanoma cutáneo murino en ratones macho C57BL/6J de 8 a 10 semanas de edad. La línea celular de cáncer cutáneo murino se trató con nanopartículas de plata ($4.2 \mu\text{g/mL}$) y Cisplatino ($2.0 \mu\text{g/mL}$) y fueron evaluados durante, 6, 12, 18 y 24 horas. Observaron que las nanopartículas solo inducen apoptosis mientras que el Cisplatino induce apoptosis y necrosis, nos indican en su estudio que ambas formulaciones desencadenan mecanismos diferentes para generar la muerte celular. Por otro lado, los ratones inducidos previamente con los separaron por varios tratamientos nanopartículas de plata (3 mg/kg; 6 mg/kg y 12 mg/kg), PVP (12 mg/kg) y Cisplatino (2 mg/kg). Los trataron durante 21 días, después detuvieron los tratamientos pero siguieron observándolos durante 7 días más. A los ratones les extrajeron una gota de sangre de la cola y cuantificaron la frecuencia de micronúcleos en células de sangre periférica, en estas muestras observaron que con una dosis de 6 mg/kg el número de eritrocitos micronucleados era mayor que el control negativo. A pesar de esto, nos muestran que todas las dosis con nanopartículas de plata presentan menor daño genotóxico y menor daño citotóxico comparado con Cisplatino, con excepción a la dosis de 3 mg/kg de AgNPs que causa más mielo supresión que Cisplatino. Sus resultados manifiestan una actividad antitumoral para la formulación

de AgNPs que utilizaron, no observaron genotoxicidad ni citotoxicidad para las células sanas a diferencia del quimioterapéutico Cisplatino, por lo que sugieren que las AgNPs Argovit® sean consideradas como un tratamiento seguro contra el melanoma (Valenzuela-Salas *et al.* 2019).

Antineoplásicos: ciclofosfamida y citosina arabinosa

Los agentes antineoplásicos son todos aquellos fármacos que son utilizados para el tratamiento contra el cáncer, se pueden clasificar en varias clases de acuerdo con su mecanismo de acción: antimetabolitos, agentes alquilantes, anticuerpos monoclonales, productos naturales y hormonas. Se ha descubierto que estos medicamentos no solo dañan las células cancerígenas, sino que también generan muchas reacciones adversas medicamentosas. Algunos autores mencionan que a los agentes antineoplásicos en sus pruebas farmacológicas utilizan muy pocos ensayos clínicos, de forma que su administración en los pacientes puede llegar a ser incluso de menor duración y también en dosis menores, en comparación con los ensayos que se realizan para fármacos convencionales, por ello se cuenta con poca información relacionada con los efectos secundarios que provocan al ser comercializados (Hansen 1992; Aagaard y Hansen 2013; Gerardo *et al.* 2019).

La importancia de los anticancerígenos en el área de la medicina ha conducido a generar más estudios que proporcionen información más completa acerca del daño que causan y los efectos que generan.

Ciclofosfamida (CP)

Este medicamento es muy utilizado como agente quimioterapéutico en oncología. Está clasificado como un antineoplásico alquilante, ya que el grupo fosforamida, generado tras una reacción enzimática en el hígado, añade grupos alquilo al átomo de nitrógeno y oxígeno de la guanina, provocando que la guanina pierda su afinidad por la citosina. Lo anterior ocasiona que la guanina se una a la timina generando pares aberrantes que producen un crosslinking (siglas en inglés), rompiendo las hebras del ADN, efecto que impide la replicación y conduce a la célula a una muerte celular programada o apoptosis (Ponticelli *et al.*, 2018).

Un efecto secundario de la CP radica en que la toxicidad no es específica para células cancerígenas, por lo que causa efectos adversos a los pacientes con cáncer a los que se les administra. Algunos de los efectos dañinos son: anemia, sepsis causada por mielosupresión, hiponatremia, insuficiencia hepática aguda, en niveles altos del antineoplásico puede causar neumonía intersticial; también daño a la vejiga urinaria, cistitis hemorrágica, miocardiopatías, oligospermia, azoospermia, amenorrea e insuficiencia ovárica (Beck *et al.*, 2013; Faurschou *et al.*, 2008; Koyama *et al.*, 1977; Latta *et al.*, 2001; Ponticelli *et al.*, 2018; Velásquez *et al.*, 2016; Yilmaz *et al.*, 2015).

La CP es uno de los antineoplásicos más usados como control positivo de mielosupresión (citotoxicidad) y daño al ADN, el cual ha probado su efectividad en el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratones, debido a su toxicidad y dosis dependencia (Araujo-Espino *et al.*, 2017; OCDE, 2016). Además

de inducir daño al ADN, es micronucleogénico y causa mielosupresión al conducir a una disminución del número de eritrocitos (Adhikari, 2019; Hatanaka, 1992). Es importante mencionar que se ha registrado la ciclofosfamida como clastogénica (Arrebola *et al.*, 2011).

La Citosina Arabinosa (Ara-C)

En el grupo de los antimetabolitos es posible encontrar el subgrupo de los análogos de las pirimidinas, este grupo se considera muy importante en el tratamiento antineoplásico ya que su actividad es de amplio espectro. Citarabina, Ara-C o citosina arabinosa son los nombres con los que se les conoce a uno de estos antineoplásicos pertenecientes al subgrupo de los análogos de las pirimidinas. Ara-C es análogo de la histidina y desoxicitidina y su mecanismo de acción es la inhibición de la ADN polimerasa. Puede causar efectos directamente sobre quinasas ácidas, por lo que ejerce un efecto citotóxico directamente a los ácidos nucleicos. Debido a que actúa sobre las células que proliferan rápidamente, se utiliza en tratamientos para la fase blástica de la leucemia mieloide crónica, leucemia aguda mieloide, leucemia meníngea, linfomas no hodgkinianos y eritroleucemia (García-Milián *et al.*, 2018).

Los daños adversos de los cuales tienen registro para este fármaco usado como régimen terapéutico específicamente para leucemia mieloide en niños son cirrosis, enfermedad veno-oclusiva y hepatomegalia; otros efectos adversos son, mielosupresión grave, toxicidad gastrointestinal, toxicidad del sistema nervioso central, cutánea y ocular (Cano P. *et al.*, 2017; Grille *et al.*, 2013).

Se ha descrito que Ara-C es causante de la muerte celular inmediata y casi completa de las células en la fase S y como bloqueador de la fase G1 tardía; bloqueo que decae exponencialmente en el tiempo (Gray y Pallavicini, 1982). Un modelo matemático simulando una dosis única de Ara-C sobre el número de células clonogénicas mostró disminución inmediata que se debe a la muerte de las células clonogénicas en fase S. El número de células en ambas poblaciones permanece en nivel bajo hasta que el bloqueo transitorio de la fase G 1/S decae y las poblaciones se reponen mediante la división de las células previamente bloqueadas (Gray y Pallavicini, 1982). Este hallazgo supone que la aplicación de dosis única de Ara-C disminuye el número de células cancerosas, pero no induce mielosupresión. Al igual que el agente antineoplásico ciclofosfamida, Ara-C induce el rompimiento de cromosomas por lo cual se le considera clastogénico y es utilizado como control positivo en pruebas de micronúcleos (Palo *et al.*, 2009).

Genotoxicidad y citotoxicidad

La genotoxicidad se evalúa mediante la detección y cuantificación del daño genotóxico, el cual se define como el daño que se genera a nivel del ADN provocado por un agente físico, químico o biológico. Este daño produce errores durante la replicación del ADN lo que genera que un fragmento de cromosoma, o cromosomas completos no puedan incorporarse al núcleo de la célula hija durante la división celular en la etapa de anafase, a este fragmento se le denomina micronúcleo. Por otra parte, el daño citotóxico constituye la alteración del ciclo celular y es tan

perjudicial para las células, que provoca la muerte celular. En el caso de la medula ósea, la citotoxicidad es un reflejo de la mielosupresión que se observa con la disminución de reticulocitos en sangre, que son eritrocitos inmaduros que se incorporan a la circulación sanguínea (Baéz-Ramírez 2005; Zalacain, Sierrasesúmaga y Patiño 2005).

Existe un buen número de marcadores biológicos que son muy utilizados para evaluar e identificar diversos materiales y sustancias citotóxicas y genotóxicas. En este contexto uno de los ensayos más utilizados para un estudio *in vivo* es la prueba de micronúcleos, la cual evalúa e identifica material genético dañado producido por diversos materiales o sustancias y es tan versátil que puede utilizarse en mucosas y tejidos de diversa índole (Fenech y Morley, 1986; Heddle *et al.*, 1991; Torres-Bugarín *et al.*, 2013).

En estudios *in vivo* donde se requiere obtener muestras a lo largo del tiempo sin sacrificar al organismo, la mejor opción es el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica (Hayashi *et al.*, 2007). Esta técnica es una de las mejores para evaluar el número de eritrocitos maduros e inmaduros y la presencia de micronúcleos en dichas células. Esta técnica proporciona una ventaja significativa directamente aplicable a los efectos de impacto ambiental, exposición laboral o salud/enfermedad, seguimiento mediante la generación de datos de daños al material genético a lo largo del tiempo, en comparación con otros métodos genotóxicos *in vitro* que proporcionan información de punto final (Sommer *et al.*, 2020; Zúñiga-González *et al.*, 2001).

En este contexto, la “biomonitorización *in vivo*” se utiliza comúnmente para evaluar e identificar el daño al material genético producido por varios materiales y sustancias que no necesariamente matan a la célula (Sommer *et al.*, 2020) . El daño nuclear o la genotoxicidad pueden manifestarse como la pérdida de un fragmento de cromosoma (evento clastogénico) o de todo el cromosoma (evento aneugénico). La fracción de material genético que no se incorpora a las células hijas en la mitosis se rodea de citoplasma en la célula progenitora y se observa en su interior como micronúcleos (MN). La Figura 1 muestra una representación esquemática de la maduración de los eritrocitos de sangre periférica con y sin daño genotóxico. El ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica es uno de los mejores métodos para evaluar el número de eritrocitos maduros e inmaduros y la presencia de micronúcleos en las células. En este contexto, los marcadores biológicos se utilizan comúnmente para evaluar e identificar varios materiales y sub-posturas citotoxicidad y genotoxicidad. El ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica (MNESP) (Hayashi *et al.*, 2007; Zúñiga-González *et al.*, 1998) es una técnica que proporciona una ventaja significativa directamente aplicable a los efectos de impacto ambiental, la exposición al trabajo o el monitoreo de la salud/enfermedad mediante la generación de datos de daños a materiales genéticos a lo largo del tiempo. En comparación con otros métodos genotóxicos *in vitro*, que proporcionan información de un tiempo específico, se basa en la evaluación del número de eritrocitos maduros e inmaduros y la presencia de micronúcleos en las células que son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que han quedado fuera de los núcleos durante la división celular.

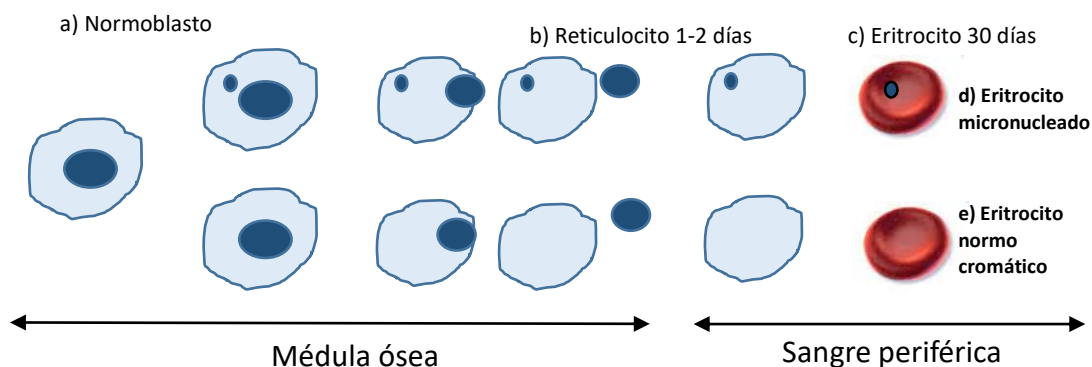


Figura 1. Proceso de formación de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica. a), normoblasto (b) y reticulocito (c). El eritrocito maduro carece de núcleo, pero en presencia de daño clastogénico o aneu-génico puede contener material genético (d) en forma de micronúcleos

Basado en la evaluación del número de eritrocitos maduros e inmaduros y la presencia de micronúcleos en las células, el ensayo MNESP proporciona cuatro biomarcadores que permiten explicar los procesos de citotoxicidad y genotoxicidad: eritrocitos normocromáticos (EN), eritrocitos policromáticos (EPC), también llamados reticulocitos), eritrocitos micronucleados (EMN), y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) (Torres-Bugarín *et al.*, 2007). Los EMN son eritrocitos maduros que carecen de núcleo, pero mantienen los micronúcleos cuando se produce daño genotóxico (Igl *et al.*, 2019). Este hecho permite un fácil monitoreo fluorométrico/colorimétrico utilizando un agente de tinción adecuado (Zalacain *et al.*, 2005). Varios compuestos han sido evaluados e identificados como agentes genotóxicos. El compuesto antineoplásico ciclofosfamida es ampliamente utilizado como control positivo de la mielosupresión (citotoxicidad) y el daño

irreversible del ADN (genotoxicidad) en el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratón (Araujo-Espino *et al.*, 2017; OCDE, 2016). Su toxicidad depende de la dosis, induce daño en el ADN, genera micronúcleos, mielosupresión, reduce el número de eritrocitos (Adhikari, 2019; Hatanaka, 1992) y el daño no es específico para células cancerosas (Beck *et al.*, 2013; Faurschou *et al.*, 2008; Koyama *et al.*, 1977; Latta *et al.*, 2001; Ponticelli *et al.*, 2018; Velásquez *et al.*, 2016; Yilmaz *et al.*, 2015).

Un ejemplo de este tipo de estudios es el que se realizó sobre una planta medicinal de la especie *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv, donde evaluaron el posible efecto genotóxico y citotóxico *in vivo* del extracto acuoso de *J. dioica* mediante la prueba de micronúcleos de eritrocitos en sangre periférica de ratón. Para ello utilizaron cuatro dosis del extracto (30, 60, 100, and 300 mg/kg); las dosis se administraron de manera oral cada 24 horas durante 5 días a ratones macho BALB/c. Se obtuvieron muestras por duplicado de sangre de la cola a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. De los muestreos obtuvieron el número de eritrocitos policromáticos o reticulocitos (EPC), eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) y eritrocitos micronucleados (EMN) en diferentes tiempos de muestreo en los diferentes grupos de estudio, como control positivo utilizaron ciclofosfamida, dosis de 60 mg/kg. Sus resultados mostraron que en el grupo que recibió la dosis de ciclofosfamida disminuyeron significativamente los EPC ($p = 0.044$) y un incremento significativo de EMN ($p = 0.032$, $p = 0.0001$). Observaron que por el contrario, los resultados obtenidos con el extracto de la planta no inducían genotoxicidad ni citotoxicidad incluso en dosis elevadas (Araujo-Espino *et al.*, 2017).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la posible actividad citotóxica y genotóxica de las nanopartículas de plata (AgNPs) Argovit® en eritrocitos de ratones macho BALB/c, mediante la técnica de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica.

Objetivos específicos

1. Estimar el daño citotóxico y genotóxico de las nanopartículas de plata Argovit® utilizando el agente antineoplásico ciclofosfamida como control positivo, mediante la frecuencia de EMN, EPC y EPCMN.
2. Determinar la genotoxicidad de las nano partículas de plata Argovit ® y el agente antineoplásico Ara-C en contraste con un control de agua, mediante la frecuencia de EMN y EPCMN.

METODOLOGÍA

Propiedades fisicoquímicas de las AgNPs

Las nanopartículas de plata Argovit ® fueron donadas por el centro de Producción Científica Vector Vita (Novosibirsk, Rusia) y sus características fisicoquímicas ya han sido anteriormente reportadas por nuestro grupo (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2020). Las partículas metálicas de plata son esféricas y su tamaño va desde 1 a 90 nm con un tamaño promedio de 35 nm, las nano partículas de plata Argovit® tienen una cubierta de 18.8% (p/p) de PVP (polivinilpirrolidona), la concentración de plata metálica es de 1.2 % (p/p) y el resto de la fórmula es agua destilada. La absorbancia

del plasmón superficial se encontró en los 420 nm con un potencial zeta de -15 mV, con un diámetro hidrodinámico de 70 nm (Juarez-Moreno *et al.*, 2017). La resonancia del plasmón a 421 ± 1 nm del lote utilizado en este trabajo confirma la presencia de nanopartículas de plata.

Compuestos evaluados

- CP, se aplicó mediante inyección intraperitoneal (i.p.) como control positivo. La dosis administrada por inyección intraperitoneal fue de 50 mg/kg, lo que garantiza la generación de micronúcleos (Naghshvar *et al.*, 2012; OCDE, 2016).
- Ara-C 6 mg/kg, inyección intraperitoneal (i.p.)
- Agua destilada (200 μ L, i.p.)
- AgNPs Argovit [®] 6 mg/kg, administración oral (Bogdanchikova *et al.*, 2016; Borrego *et al.*, 2016; Valenzuela-Salas *et al.*, 2020).

La aplicación a través de diferentes rutas de administración de los controles positivo y negativo es aceptado para este tipo de estudio (Hayashi *et al.*, 2007) y todas las dosis administradas fueron ajustadas al peso de los ratones.

Diseño experimental.

Ratones BALB/c

El estudio se llevó a cabo en ratones macho *Mus musculus* de la cepa BALB/c de 5 a 6 semanas de edad y peso medio de 20.11 ± 2.38 g. Los animales se

obtuvieron de Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Guadalajara, Jalisco, México. Los animales fueron colocados dentro de jaulas de policarbonato, con una cama de polvo de aserrín y aserrín en la parte superior, aclimatados a las condiciones del laboratorio durante dos semanas antes de la aplicación de los tratamientos, fueron alimentados *ad libitum* con pellets para roedores y agua. El manejo de los organismos se llevó a cabo según lo establecido en el Comité, Guía para el cuidado y uso de animales de Laboratorio (SAGARPA, 1999). Para todos los grupos, los signos clínicos, incluyendo condición de piel y pelaje, ojos, membranas, conducta, patrones respiratorios, presencia de náuseas, vómito, diarrea, temblores, convulsiones y letargo se registraron a través del experimento. Al principio y al final del experimento los animales se pesaron. Los valores obtenidos fueron comparados con los valores de peso promedio reportados por el proveedor de acuerdo con la edad del animal.

Grupos de trabajo: Ciclofosfamida

Fueron formados cinco grupos al azar con seis ratones machos por cada grupo, como se sugiere en la guía de la OECD para la prueba de químicos (Velásquez *et al.*, 2016). Antes del primer tratamiento, los animales fueron pesados y marcados de una manera no invasiva para su posterior identificación. Cada grupo recibió un tratamiento específico como se muestra en la Figura 2. En todos los tratamientos una dosis única diaria de AgNPs (6 mg/kg) o CP (50 mg/kg) se administró durante la mañana de acuerdo al peso del ratón, como se recomienda

en la guía de la OECD (OCDE, 2016). Todos los animales se sacrificaron a las 168 h con la ayuda de una cámara de cloroformo para anestesiarnos y posteriormente se realizó una dislocación cervical.

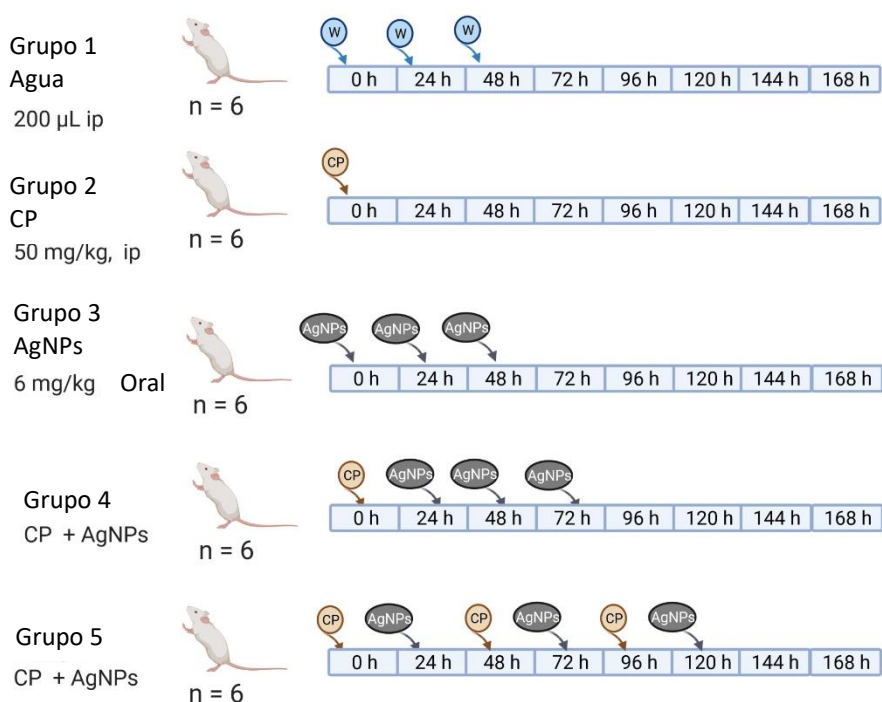


Figura 2. Esquemas de administración Grupo 1 Agua (0, 24, 48 h), Grupo 2 CP (0 h), Grupo 3 AgNPs (0, 24, 48 h), Grupo 4 CP + AgNPs: CP (0 h) + AgNPs (24, 48, 72 h) y Grupo 5 CP + AgNPs: CP (0, 48, 96 h) + AgNPs (24, 72, 120 h) (Arellano-García).

Grupos de trabajo: Arabinosa-C

Se utilizaron ratones BALB/c de 5 a 6 semanas de edad y peso promedio de 19.94 g, se formaron 7 grupos aleatorios de 7 ratones cada uno. Los esquemas de administración se muestran en la Figura 3. La dosis administrada para Ara-C fue de 6 mg/kg, i.p., y para las AgNPs Argovit® 6 mg/kg, vía oral. Al séptimo día se practicó la eutanasia a todos los animales.

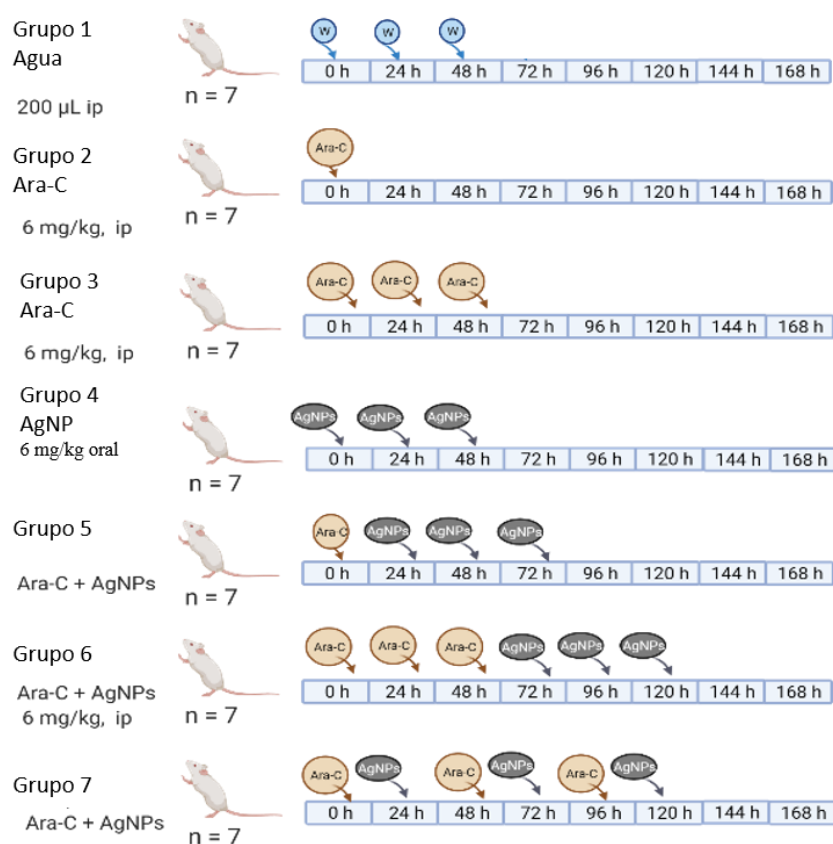


Figura 3. Esquemas de administración con Ara-C: Grupo 1 Agua (0, 24, 48 h), Grupo 2 Ara-C (0 h), Grupo 3 Ara-C (0, 24, 48 h), Grupo 4 AgNPs (0, 24, 48 h), Grupo 5 Ara-C + AgNPs: Ara-C (0 h) + AgNPs (24, 48, 72 h), Grupo 6 Ara-C + AgNPs: Ara-C (0, 24, 48 h) + AgNPs (72, 96, 120 h) y Grupo 7 Ara-C + AgNPs: Ara-C (0, 48, 96 h) + AgNPs (24, 72, 120 h) (Arellano-García).

Prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica

Como se muestra en la Figura 4, antes de la primera y de cada administración durante el tratamiento, se tomó una gota de sangre de la punta de la cola de cada ratón, la cual se obtuvo cada 24 horas hasta las 168 horas. Con la sangre se realizaron dos frotis por cada organismo en una laminilla previamente etiquetada, posteriormente se dejaron secar al aire libre por 10 minutos. Después las muestras fueron fijadas en etanol (80%, JT Backer, Phillipsburg, NJ, USA) durante 10 minutos, nuevamente se dejan secar al aire libre, todas las muestras una vez secas fueron teñidas con anaranjado de acridina (Sigma-Aldich, St. Louis, MO, USA), el cual se preparó agregando 0,05 g de naranja de acridina en 250 ml de solución amortiguadora de fosfatos (11.49 g. de fosfato monobásico de sodio y 2.16 g. de fosfato de sodio dibásico por litro), la solución se llevó a pH 6,8, las laminillas se acomodaron en rejillas y teñidas durante un minuto, pasado ese tiempo las laminillas fueron enjuagadas en la solución buffer de fosfatos para eliminar el exceso de colorante.



Figura 4. Secuencia de pasos seguidos en el laboratorio para la obtención de laminillas y tinción con naranja de acridina.

Una vez concluido este paso las laminillas se dejaron secar al aire libre y se almacenaron en un lugar oscuro (Torres-Bugarín *et al.*, 2007). Para poder observar las células en el microscopio fue colocada una gota de amortiguador de fosfatos sobre la laminilla previamente teñida y se cubrió con un cubreobjetos, después de este proceso se examinaron en un microscopio de fluorescencia (Axio Lab A1 Zeiss, Zeiss, Darmstadt, Alemania), con el objetivo 100X y aceite de inmersión. Se analizaron un total de 10.000 eritrocitos por laminilla de acuerdo con el criterio de identificación de Schmid (1975), de los cuales se registraron los biomarcadores que permitieron explicar el proceso de citotoxicidad y genotoxicidad que son: el número de eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos totales (EPC / 1000 ET), eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos (EPCMN / 1000

EPC) y eritrocitos micronucleados en 10 000 eritrocitos totales (MN / 10000 ET). La figura 5 muestra imágenes representativas de los biomarcadores que cuantifican la

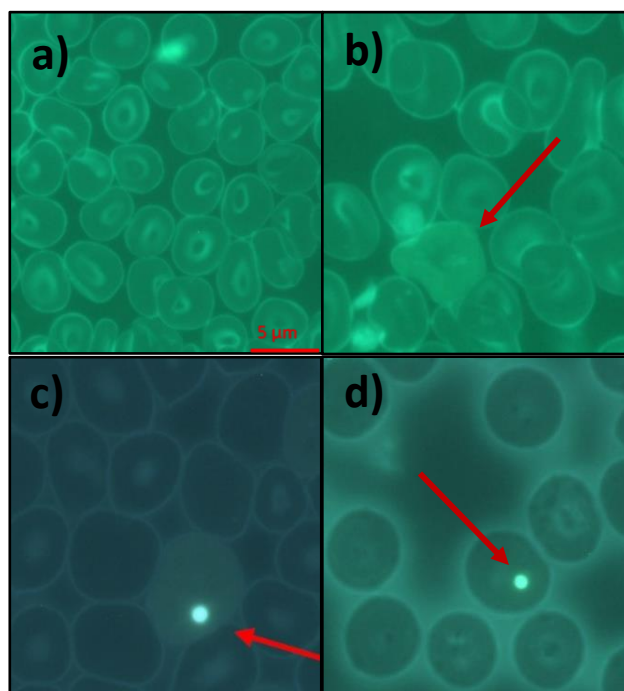


Figura 5. Imágenes representativas de cada biomarcador. . Eritrocitos maduros o también llamados normocromáticos a). Las flechas rojas muestran eritrocitos policromáticos (EPC) b), eritrocitos micronucleados policromáticos EPMN c) y eritrocitos micronucleados (EMN) d). Tinción con anaranjado de acridina, objetivo 100X, microscopio Axio Lab A1 Zeiss (Zeiss, Darmstadt, Alemania).

frecuencia en cada grupo.

Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías y *post-hoc* prueba de Tukey ($p < 0.0001$) utilizando el programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Hamburg, Germany, 2008). Las gráficas fueron realizadas en el programa GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, 5 noviembre 2020).

Toxicidad general

Al evaluar el efecto de la ciclofosfamida en los diferentes grupos no se observó pérdida de peso, pelo erizado, falta de movilidad o cambios en el apetito, se debe señalar que en algunos ratones tratados con nanopartículas de plata (AgNPs) presentaron arqueamiento de espalda (indicación de dolor de estómago) y heces líquidas. Por otro lado, aquellos ratones que se trataron con Ara-C, presentaban pelo erizado, irritabilidad y agresividad.

Citotoxicidad en grupo de trabajo Ciclofosfamida

Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros, también llamados eritrocitos policromáticos; son células que no tienen núcleo, ni tampoco presentan micronúcleos pero si residuos de ARN que los hacen verse bajo el microscopio de fluorescencia de un color anaranjado cuando son teñidos previamente con el colorante anaranjado de acridina, están presentes en el torrente sanguíneo por menos de 24 horas y si se observa un descenso significativo en el número de eritrocitos policromáticos es debido a una mielosupresión por un efecto citotóxico (Krishna y Hayashi, 2000). Es por ello por lo que se utiliza como un biomarcador de mielosupresión.

En la figura 6 se muestra la frecuencia de EPC a través del tiempo, se puede observar que en el grupo de agua (control) la frecuencia de EPC no tuvo cambios significativos a través del tiempo (Grupo 1), por el contrario, se observó

mielosupresión en el grupo de CP (Grupo 2) como se esperaba. La frecuencia de los EPC disminuyó a las 72 y 96 horas ($p < 0.0001$, letra E en Figura 6) desapareciendo ese efecto a las 120 horas. Con respecto al grupo de las AgNPs (Grupo 3) la frecuencia de PCE fue similar a través del tiempo con el grupo agua. En el caso de la administración de AgNPs 24 horas antes de la administración de

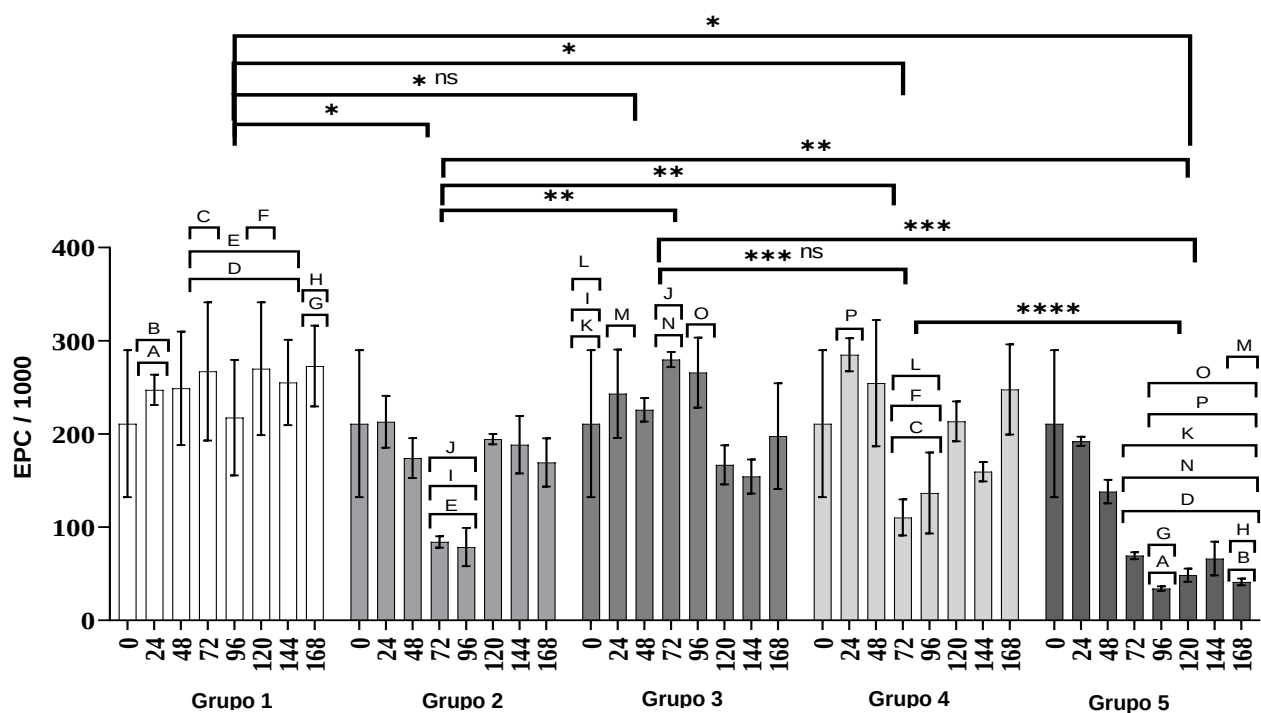


Figura 6. Eritrocitos policromáticos observados en 1000 eritrocitos totales. Grupo 1: agua (0, 24, 48 h), Grupo 2: CP (0 h), Grupo 3: AgNPs (0, 24, 48 h), Grupo 4: CP + AgNPs; CP (0 h) + AgNPs (24, 48, 72 h) y Grupo 5: CP + AgNPs; CP (0, 48, 96 h) + AgNPs (24, 72, 120 h). ns: no diferencia significativa, *, **, *** y **** significan diferencias significativas entre grupos ($p < 0.0001$); letras A – P significan diferencias significativas entre concentraciones inter e intra grupos ($p < 0.0001$). Datos utilizados para generar la tabla Anexo 1.

CP (Grupo 4) presento menos mielosupresión comparada con el grupo de una sola dosis de CP (Grupo 2), pero a las 120 horas la medula ósea se recupera. Mientras que el Grupo 5 la mielo supresión es evidente y la medula ósea no se puede recuperar en comparación con el Grupo 4.

Genotoxicidad con grupo de trabajo Ciclofosfamida

Los eritrocitos micronucleados (EMN) son eritrocitos maduros los cuales 24 horas antes eran considerados eritrocitos policromáticos micronucleados, sin embargo, estos últimos solo pueden pasar 24 horas en el torrente sanguíneo antes de convertirse en maduros o eritrocitos normo cromáticos (Igl *et al.*, 2019). La frecuencia de los EMN está fuertemente relacionada con los PCE y se deben de interpretar en conjunto. La frecuencia de PCE mostrada en la Figura 6 muestra la producción de eritrocitos nuevos o eritrocitos policromáticos que han sido incorporados al torrente sanguíneo. La información mostrada en la Figura 6 nos permite discernir si la frecuencia de eritrocitos micronucleados registrada en la Figura 7 se deriva directamente del daño genotóxico o si hay interferencia por mielosupresión.

En la Figura 7 se muestra la genotoxicidad aguda a través de la frecuencia de EPCMN. Estos micronúcleos son generados por la sustancia o el químico aplicado como tratamiento, ya que como se mencionó anteriormente, solo duran 24 horas como eritrocito inmaduro en el torrente sanguíneo. En el caso del grupo administrado con tres dosis consecutivas de AgNPs (Grupo 3), la frecuencia de EPCMN fue similar a la frecuencia del control a través del tiempo, sugiriendo que las AgNPs no son genotóxicas. Incluso al administrarlas después de una aplicación de CP (Grupo 4), las nanopartículas mostraron un efecto citoprotector ya que reducen el efecto genotóxico agudo de la CP, lo cual se corrobora con una

frecuencia 50% menor de EPCMN ($p < 0.0001$, 48 h) en comparación con los organismos tratados solo con CP a las mismas 48 horas de la toma de la muestra. Sin embargo, el efecto citoprotector no puede ser mantenido cuando se aplica CP por más días, ya que el daño genotóxico agudo es evidente como se observa en el Grupo 5, incluso cuando se observa una mielosupresión de este grupo en la Figura 6.

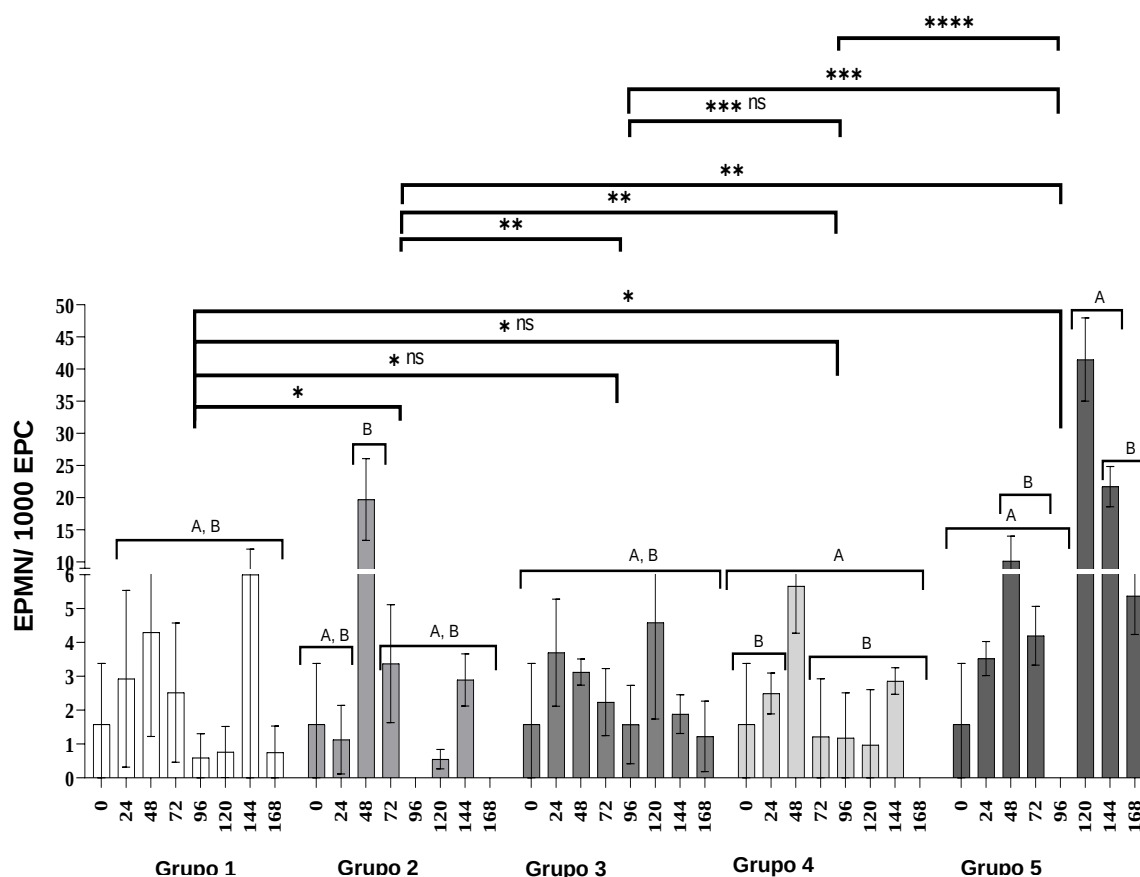


Figura 7. Eritrocitos policromáticos micronucleados observados en 1000 eritrocitos policromáticos. Grupo 1: agua (0, 24, 48 h), Grupo 2: CP (0 h), Grupo 3: AgNPs (0, 24, 48 h), Grupo 4: CP + AgNPs; CP (0 h) + AgNPs (24, 48, 72 h) y Grupo 5: CP + AgNPs; CP (0, 48, 96 h) + AgNPs (24, 72, 120 h). ns: no diferencia significativa, *, **, *** y **** significan diferencias significativas entre grupos ($p < 0.0001$); letras A y B significan diferencias significativas entre concentraciones inter e intra grupos ($p < 0.0001$).

Haciendo hincapié en lo observado, una sola dosis de CP produce un incremento significativo de EPCMN 48 horas después de la administración (19.7 ± 6.4), mostrados en la Tabla I; resultado similar a aquellos reportados por otros autores (Araujo-Espino *et al.*, 2017; Gómez-Meda *et al.*, 2016). Por otra parte, la administración de tres dosis consecutivas de nanopartículas de plata no producen ningún daño genotóxico agudo (Grupo 3). La administración de AgNPs al parecer disminuye el efecto genotóxico agudo de las CP, ya que la frecuencia de EPCMN registrada a las 48 horas en el Grupo 4 es la tercera parte de la frecuencia registrada en el Grupo 2 (5.7 ± 1.4 EPCMN/1000 ET; letra B, $p < 0.0001$, Figura 7). La genotoxicidad aguda es evidente en el Grupo 5, donde se aplicaron tres dosis alternadas de CP seguidas de la administración de AgNPs 24 horas después. El número de EPCMN a las 48 horas fue de 10.1 ± 3.9 (Tabla I), con el incremento más significativo a las 120 horas con 41.5 ± 6.5 EPCMN/1000 ET (Grupo 5, Figura 7, letra A $p < 0.0001$). El daño por genotoxicidad aguda en el Grupo 5 es notable considerando la mielo supresión observada a partir de las 72 horas (Grupo 5, Figura 6).

Tabla I. Numero de eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos (EPCMN/1000 PCE).

		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5	
Horas	n	Media	(±)	Media	(±)	Media	(±)	Media	(±)	Media	(±)
0	30	1.6	1.8	1.6	1.8	1.6	1.8	1.6	1.8	1.6	1.8
24	6	2.9	2.6	1.1	1.0	3.7	1.6	2.5	0.6	3.5	0.5
48	6	4.3	3.1	19.7	6.4	3.1	0.4	5.7	1.4	10.1	3.9
72	6	2.5	2.1	3.4	1.7	2.2	1.0	1.2	1.7	4.2	0.9
96	6	0.6	0.7	0.0	0.0	1.6	1.2	1.2	1.3	0.0	0.0
120	6	0.8	0.8	0.6	0.3	4.6	2.8	1.0	1.6	41.5	6.5
144	6	6.0	6.0	2.9	0.8	1.9	0.6	2.9	0.4	21.7	3.1
168	6	0.7	0.8	0.0	0.0	1.2	1.0	0.0	0.0	5.4	1.1

n= tamaño de la muestra, media y desviación estándar. Eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos. Grupo 1: agua (0, 24, 48 h), Grupo 2: CP (0 h), Grupo 3: AgNPs (0, 24, 48 h), Grupo 4: CP + AgNPs; CP (0 h) + AgNPs (24, 48, 72 h) y Grupo 5: CP + AgNPs; CP (0, 48,96 h) + AgNPs (24, 72, 120 h).

La Figura 8 muestra el daño genotóxico acumulado obtenido a partir de la frecuencia de EMN de cada grupo. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de EMN entre los grupos tratados con agua (Grupo 1) y AgNPs (Grupo 3) y se debe señalar que la frecuencia de EMN en ambos fue similar a través del tiempo ($p < 0.0001$).

El incremento en la frecuencia de EMN observada a las 24 y 48 horas, a pesar de ser digno de mención, no se tomó en cuenta en el análisis de daño genotóxico siguiendo las recomendaciones de la guía 474 de la OECD (OCDE, 2016). Por otra parte, la disminución de la frecuencia de EMN en los grupos tratados con tres dosis de AgNPs y una dosis de CP observadas a las 96 y 120 horas, respectivamente, es un fenómeno que probablemente se dé por el tiempo de administración del medicamento, en vez de ser por los procesos de mielosupresión y por la recuperación de la medula ósea.

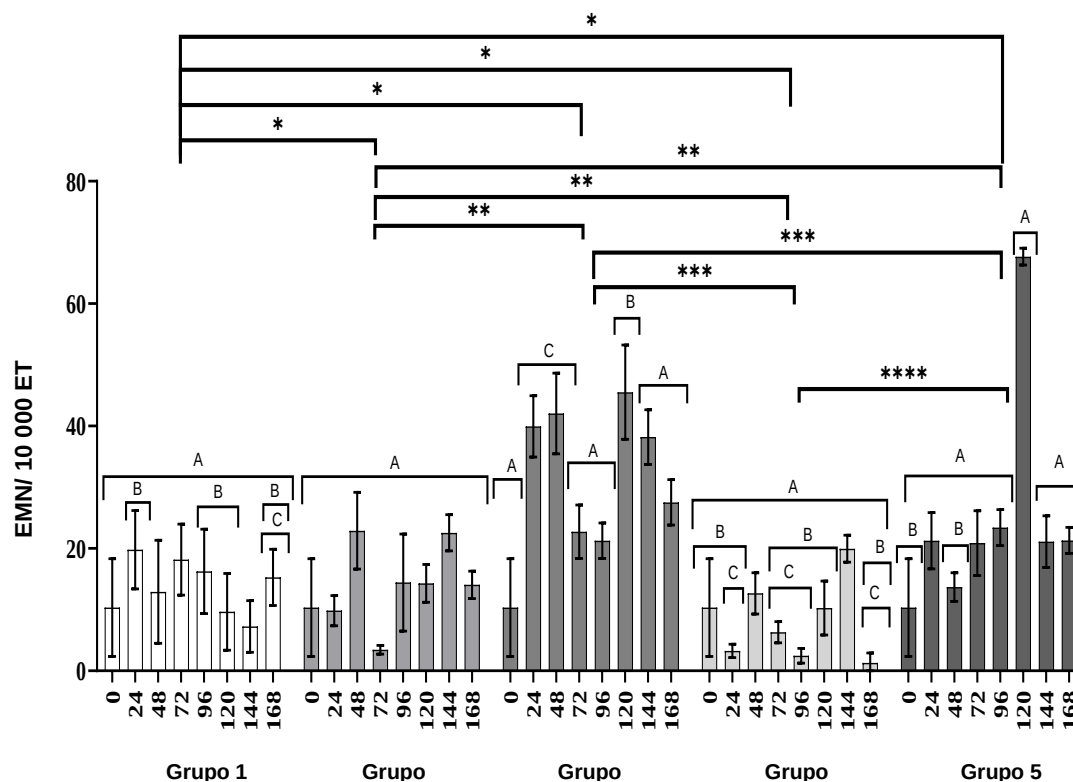


Figura 8. Número de eritrocitos micronucleados observados en 10, 000 eritrocitos totales. Grupo 1: agua (0, 24, 48 h), Grupo 2: CP (0 h), Grupo 3: AgNPs (0, 24, 48 h), Grupo 4: CP + AgNPs; CP (0 h) + AgNPs (24, 48, 72 h) y Grupo 5: CP + AgNPs; CP (0, 48, 96 h) + AgNPs (24, 72, 120 h). ns: no diferencia significativa, *, **, *** y **** significan diferencias significativas entre grupos ($p < 0.0001$); letras A – C significan diferencias significativas ($p > 0.0001$) entre concentraciones inter e intragrupo ($p < 0.0001$). Datos para realizar la gráfica en Anexo 2.

Citotoxicidad y genotoxicidad con Arabinosa-C

En general, los esquemas de tratamiento aplicados con Ara-C, no causaron daño citotóxico como lo muestra la Figura 9. La producción de EPC, se mantuvo en general con altos niveles de eritrocitos inmaduros, lo que significa que ni los tratamientos con Ara-C de un día (Grupo 2) produjeron mielosupresión significativa,

a diferencia de los tratamientos con CP. Ligeras disminuciones no significativas en EPC pudieron observarse cuando se aplicaron por varios días tanto Ara-C como los tratamientos combinados de Ara-C y AgNPs. Como ya se había establecido en los experimentos con CP, las AgNPs aplicadas por tres días consecutivos no indujeron citotoxicidad considerable (Figura 9, Grupo 4)

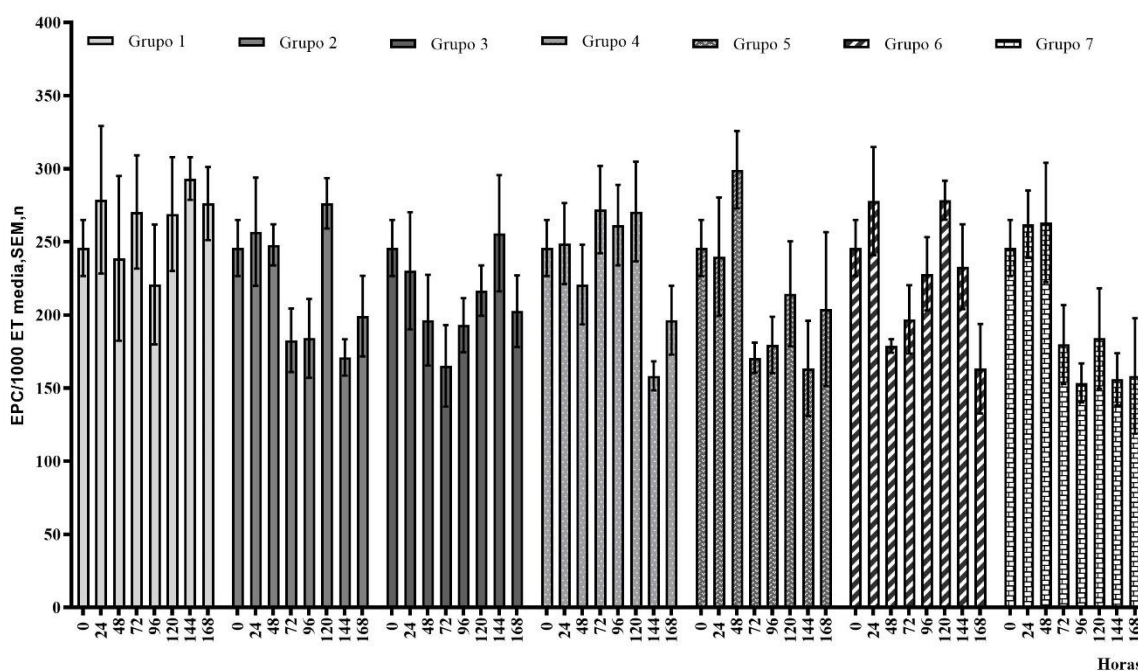


Figura 9. EPC/1000 ET. Grupo 1: Agua (0, 24,48,72); Grupo 2: Ara-C (0 h); Grupo 3: Ara-C (0, 24, 48 h); Grupo 4: AgNPs (0, 24 48 h) Grupo 5: Ara-C (24 h), AgNPs (24, 48, 72); Grupo 6: Ara-C (0, 24,48 h), AgNPs (72, 96, 120 h); Grupo 7 Ara-C (0, 48, 96 h), AgNPs (24, 72, 120 h).

El número de eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos totales (EPCMN) es un biomarcador de genotoxicidad ocurrida dentro de las primeras 24 horas de haberse inducido (Figura 11). En el grupo control, se puede advertir que, sin estímulo, los EPCMN no aumentan más allá de 4 ± 1.5 . En el grupo

2, se muestra que cuando se aplica una sola dosis de Ara-C, los EPCMN aumentan 24 h después de la aplicación y posteriormente disminuyen a niveles normales por el resto del tiempo que duro el experimento. Al aplicar tres dosis diarias consecutivas de Ara-C, los EPCMN aumentan 24 h después de cada aplicación hasta un máximo de 4 veces más que en el grupo control (Figura 11).

Como también pudo verificarse en la Figura 11, la administración de 3 dosis de AgNPs (24, 48 y 72 h), no induce genotoxicidad significativa a lo largo del experimento (Grupo 4), en cambio cuando se administra una dosis de Ara-C y tres dosis posteriores de AgNPs (Grupo 5), parece contribuir de manera aditiva para un aumento significativo de EMN (Figura 10).

Los otros 2 tratamientos en los que primero se aplican tres días consecutivos Ara-C y luego se administran tres días consecutivos de nanopartículas de plata no parece aumentar la genotoxicidad a 24 horas; esto aparentemente es un reflejo de como las nanopartículas de plata pueden mitigar el efecto genotóxico de Ara-C en el grupo 6. Un patrón similar se observa en el grupo 7 cuando se administra de manera alternada Ara-C y nanopartículas de plata en este grupo no se observa genotoxicidad inducida a 24 horas, todo el patrón es muy similar al grupo control.

El número de micronúcleos en 10 000 eritrocitos totales (EMN / 10 000 ET) que registra la genotoxicidad acumulada, desde la incorporación del eritrocito al torrente sanguíneo del organismo hasta la toma de la muestra, presentó en general una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la mayoría los tratamientos (Figura 10). En el Grupo 2, donde los ratones se trataron con una sola dosis de Ara-C, el número

de EMN / 10 000 ET aumentó significativamente ($p>0.01$), con más de 38 ± 9 MN al tercer día después de la aplicación, condición que se mitiga las horas subsiguientes. Cuando se aplica Ara-C por tres días consecutivos (Grupo 3), el número de MN se eleva significativamente a 72, 96, 120 y 144 h.

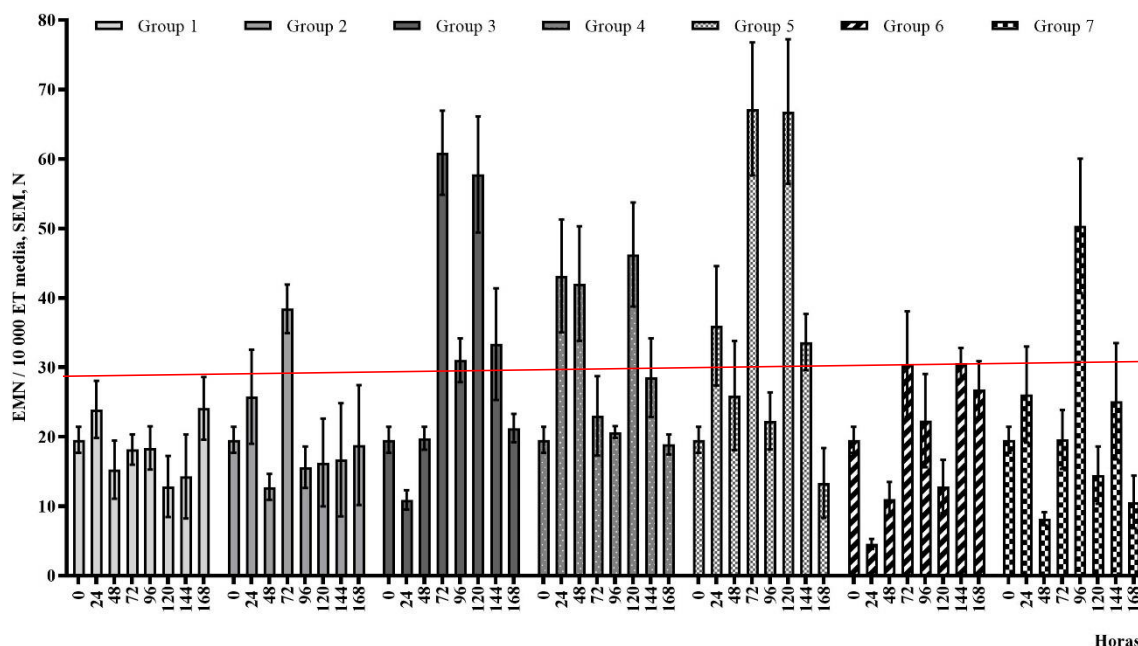


Figura 10. EMN/10 000 ET. Grupo 1: Agua (0, 24,48,72); Grupo 2: Ara-C (0 h); Grupo 3: Ara-C (0, 24, 48 h); Grupo 4: AgNPs (0, 24 48 h) Grupo 5: Ara-C (24 h), AgNPs (24, 48, 72); Grupo 6: Ara-C (0, 24,48 h), AgNPs(72, 96, 120 h); Grupo 7 Ara-C (0, 48, 96 h), AgNPs (24, 72, 120 h). La línea roja muestra el valor promedio de EMN encontrados en el grupo control.

En el grupo 4, en el que se aplicó AgNPs por tres días consecutivos, los micronúcleos (EMN / 10 000 ET), aumentan significativamente ($p>0.05$) a 24 h 48 h y 120 h, regresando a niveles normales similares al grupo control a 144 h y 168 h, cuando al parecer cesa la inducción al daño genotóxico de las AgNPs (Figura 10). En el grupo 5, en el que los organismos se retaron con una dosis de Ara-C y

posteriormente se trataron con tres dosis de AgNPs (0, 24 y 48 h), es el que indujo mayor genotoxicidad a 24, 72, 120 y 144 h con 36 ± 23 , 67 ± 25 , 67 ± 34 y 34 ± 11 eritrocitos micronucleados (Figura 10).

En el grupo 6, cuando los organismos se retaron con tres dosis consecutivas de Ara-C (0, 24 y 48 h), y agregando posteriormente AgNPs en 72, 96 y 120 h, de forma inesperada no se observó aumento significativo de EMN en 10 000 ET, por encima del grupo control (Grupo 1) ni del grupo de ratones que recibió tres dosis consecutivas del antineoplásico como se aprecia en el grupo 3 la figura 10.

En el esquema de tratamiento del grupo 7, que inició con la aplicación de Ara-C y alternando con AgNPs por seis días consecutivos como lo muestra la figura 10, solo se advierte un aumento significativo de 50 ± 25 EMN / 10 000 ET a 96 h. La aplicación de AgNPs tanto después de tres dosis de Ara-C (Grupo 6) como en el esquema alternado de Ara-C y AgNPs con intervalos de 24 h, muestra que aparentemente las nanopartículas parecen mitigar la genotoxicidad inducida por Ara-C. Aunque las AgNPs aplicadas de manera independiente también inducen genotoxicidad acumulada (Grupo 4), el efecto combinado de la aplicación de ambas formulaciones con diferentes esquemas de tratamiento, inducen genotoxicidad también diferenciada. Mientras que en grupo 5 las AgNPs potencian la genotoxicidad, la aplicación de estas mismas formulaciones en los esquemas de los grupos 6 y 7 aparentemente disminuyen el efecto genotóxico de ambas por separado. Esto último se confirma al analizar la figura 11, en la que se muestra la genotoxicidad después de 24 h de haberse presentado el estímulo en la médula ósea.

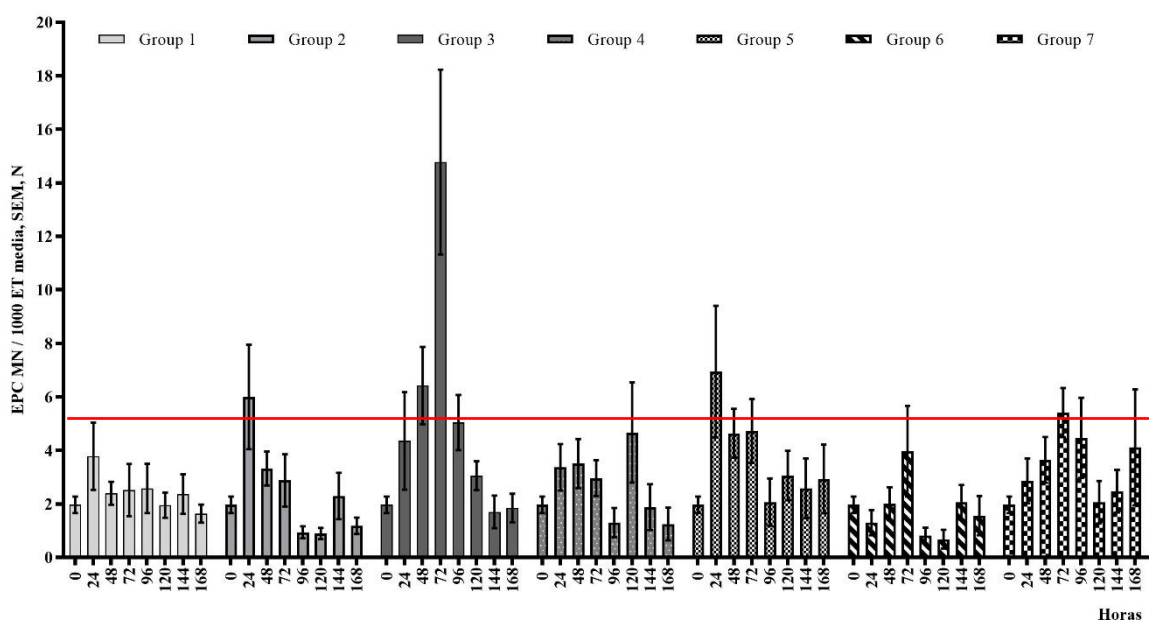


Figura 11. EPCMN/1000 EPC. Grupo 1: Agua (0, 24,48,72); Grupo 2: Ara-C (0 h); Grupo 3: Ara-C(0, 24, 48 h); Grupo 4: AgNPs (0, 24 48 h) Grupo 5: Ara-C (24 h), AgNPs (24, 48, 72); Grupo 6: Ara-C (0, 24,48 h), AgNPs (72, 96, 120 h); Grupo 7 Ara-C (0, 48, 96 h), AgNPs (24, 72, 120 h)

DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo investigó el potencial genotóxico de las nanopartículas de plata de la formulación comercialmente disponible Argovit® en ratones BALB/c. Esta formulación ha demostrado tener notables resultados como antiviral (Bogdanchikova *et al.*, 2016; Borrego *et al.*, 2016; Ochoa-Meza *et al.*, 2019; Romo-Quíñonez *et al.*, 2020), antimicrobiano (Álvarez-Suárez *et al.*, 2020; Guerra *et al.*, 2020; Stephano-Hornedo *et al.*, 2020; Valenzuela-Salas *et al.*, 2021; Vazquez-Muñoz *et al.*, 2019) promotor de crecimiento en cultivos de relevancia comercial

(Bello-Bello *et al.* 2017) de poca citotoxicidad (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2020) y bajo daño fitotóxico (Casillas-Figueroa *et al.*, 2020). Por el propósito del estudio, la formulación de AgNPs se administró de manera oral con una dosis diaria de 6 mg/kg por tres días consecutivos y durante cinco días más solo se mantuvieron en observación. Muestras de sangre obtenida de la cola de la rata fueron colectadas cada 24 horas para determinar la frecuencia de EMN, EPC y EPCMN en un lapso de ocho días.

No se encontró evidencia de mielosupresión (Grupo 3, Figura 6) o de daño genotóxico agudo (Grupo 3, Figura 7) en ratones BALB/c a los que se les administro una dosis de 6 mg AgNPs/kg de acuerdo con el peso del ratón, durante tres días consecutivos. No hay duda de que la captación celular de las AgNPs con recubrimiento de PVP ocurre en monocitos, linfocitos y eritrocitos. Este proceso ha sido demostrado por diversas técnicas, incluyendo microscopia electrónica de transmisión (TEM), microscopia de contraste de fase, citometría, microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX) (Ahlberg *et al.*, 2014; Ferdous *et al.*, 2018; Greulich *et al.*, 2011). De manera interesante, es necesario mencionar que el daño genotóxico acumulado a las 72 horas después de la última administración de AgNPs, disminuye a través del tiempo (Grupo 3, Figura 8). Sin embargo, el sistema hematopoyético respondió a un estímulo externo incrementando la producción de eritrocitos (Grupo 3, Figura 6), que eventualmente disminuyo la frecuencia de EMN a través del tiempo (Grupo 3, Figura 8). Esta observación refleja la capacidad del organismo para estabilizarse de forma relativamente rápida, la actividad de la medula ósea evita la mielo supresión (Shokrzadeh *et al.*, 2014), sugiriendo un daño no permanente de la medula ósea.

Como se observa en la Tabla II, los efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de plata no son claros, pero tanto el tamaño de las nanopartículas, el contenido o el tipo de metal que las conforma, la cantidad y tipo de materiales para recubrimiento pueden tener un papel importante en cuanto a la genotoxicidad (Dobrzyńska *et al.*, 2014; Nallanthighal *et al.*, 2017; Narciso *et al.*, 2020). La Tabla II muestra que las AgNPs con cubierta de citrato o TiO₂ inducen rupturas de ADN y por lo tanto la formación de micronúcleos (Dobrzyńska *et al.*, 2014). Por el contrario, las formulaciones con PVP no muestran daño citotóxico o genotóxico; por lo que, se sugiere que el recubrimiento de PVP parece ser un factor importante en la ausencia de genotoxicidad en estas partículas. El recubrimiento de PVP contribuye a la biodistribución de las AgNPs. Estudios en ratas mostraron que el 98% de esta formulación es excretada en las heces (Platonova *et al.*, 2013), que ayudan a explicar el bajo efecto genotóxico. Desafortunadamente, la falta de información fisicoquímica completa acerca del contenido de plata o relación molar del PVP: Ag no nos permite profundizar en la discusión de este tema.

La gran estabilidad de la formulación de Argovit® y su baja citotoxicidad puede ser la razón por la que la mielosupresión y del daño genotóxico agudo no se haya observado. Algunas formulaciones de AgNPs de 20 nm han reportado que han comprometido la viabilidad (>10 µg/mL) y los sistemas enzimáticos y no enzimáticos (>0.4 µg/mL) de eritrocitos en una forma de concentración-dependiente, siendo los iones de plata los responsables por dichos efectos (Fang *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2016). Los iones de plata que son liberados de las nanopartículas están directamente relacionados con su estabilidad (Cunningham *et al.*,

2021). Recientemente se describió que el radio del agente que recubre el metal juega un papel importante en el potencial hemolítico de las formulaciones de AgNPs. Específicamente, para aquellas formulaciones recubiertas con PVP, se ha encontrado que a mayor cantidad de polímero como recubrimiento, es más bajo el potencial hemolítico. La hemólisis producida por 400 µg/mL de Argovit® en eritrocitos humanos es mínima, mientras que otras formulaciones de AgNPs con PVP producen más del 5% de hemólisis con la mitad o hasta diez veces menos concentración (Luna-Vázquez-gómez *et al.*, 2021). De forma similar, la relación molar del metal/PVP le proporciona a Argovit® una mayor biocompatibilidad para los linfocitos humanos de sangre periférica, comparado con otras formulaciones de AgNPs con un tamaño similar pero con menor contenido de PVP como recubrimiento (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2020).

Por otra parte, la administración de una sola dosis de CP produce una mielosupresión muy notoria (Grupo 2, Figura 6) y daño genotóxico agudo (Grupo 2, Figura 7) después de 48 y 72 horas, respectivamente. La genotoxicidad acumulada puede ser enmascarada por la baja producción de eritrocitos y la baja eficiencia del sistema retículo endotelial (Kissling *et al.*, 2007; Zúñiga-González *et al.*, 2001). Varios autores ya habían descrito resultados similares al nuestro utilizando CP (Gómez-Meda *et al.*, 2016; Hatanaka, 1992; Krishna *et al.*, 1995). De manera interesante en este trabajo encontramos que Argovit® parece reducir la mielosupresión (Grupo 4, Figura 6) y hasta 50% del daño genotóxico agudo causado por CP (Grupo 4, Figura 7). Una respuesta similar se observó cuando se colocó la administración alternada de CP y AgNPs a los ratones del Grupo 5. La Figura 6 muestra que la

mielosupresión no está solucionada, sin embargo la genotoxicidad aguda a las 48 horas es casi la mitad registrada con una sola dosis de CP (Grupo 5, Figura 7) sin evidencia de genotoxicidad acumulativa a ese tiempo (Grupo 5, Figura 8). Sin embargo, el efecto protector no fue muy efectivo para la administración continua de CP, pues las frecuencias de MN, EPC y EMN incrementaron significativamente a las 120 horas.

Tabla II. Estudios de citotoxicidad y genotoxicidad de AgNPs con la prueba de micronúcleos en eritrocitos de ratones.

Modelo	Figura	Tamaño nm	Diámetro Hidrodinámico nm	Contenido de plata	Recubrimiento	Potencial Z mV	Biomarcador	Esquema de Administración	Efecto Observado	Referencia
Ratas Wistar 14 semanas de edad	Esferoidal	20 ± 5	20-77.29± 1.4	ND	ND	33.6	MN de medula ósea	Dosis única i.v. -AgNPs 20 nm 5 mg/Kg -AgNPs 20 nm 10 mg/Kg	Genotoxicidad después de 24 h de exposición p<0.5 en ambas.	(Dobrzyńska et al., 2014)(Dobrzyńska et al., 2014)
		200 ± 50	200-333.12± 2.5	ND	ND	37.5		Dosis única i.v. AgNPs 200 nm 5 mg/kg		
Ratones C57BL / 6J pun / pun,	ND	32 ± 0.7.	ND	ND	PVP	ND	Daño oxidativo MN	4 mg / kg/7 días/ AO	No indujeron daño oxidativo al ADN. No incrementaron la frecuencia de MN en la célula.	(Nallanthighal et al., 2017)
Ratones BALB /c 8 semanas		28.7	36.2	20 µg	PVP	22.1	Citometría de Flujo en células Hepa 1c1c7	PVP AgNPs 5 µg / ml/24 h/ i.v.	No mostro efecto	(Pang et al., 2016)
Ratas macho Wistar 6 semanas de edad	ND	ND	ND	ND	ND	ND	MN de medula ósea y ensayo citotóxico	AgNPs 4 hr/día (200 partes por billón/día)/5 días/ inhalación.	Genotoxicidad y citotoxicidad	(Nayek et al., 2020)
Ratas Sprage-Dawley	Esferoidal	6.3–629	1000	60ng/mL	ND	-22, 26.4 y 29.8	MN de medula ósea y prueba de aberraciones cromosómicas	0, 5 mg/kg/ i.v. 0.003 mg/kg/ i.v.	No mostro efecto	(Wen et al., 2017)

ND – no datos, i.v. – inyección intravenosa, AO - administración oral.

Gracias a los resultados obtenidos surge una nueva pregunta: ¿Acaso las AgNPs sirven como adyuvantes para la CP? La actividad anti proliferativa de las AgNPs Argovit® en contra de varias líneas celulares de tumor humano ha sido reportada previamente (Juarez-Moreno *et al.*, 2017; Valenzuela-Salas *et al.*, 2021). Es por ello, que se sugiere que la combinación de AgNPs + CP podría comportarse como un potente agente anti proliferativo, que disminuye significativamente el daño genotóxico inducido por CP, efecto atribuible a la acción de las AgNPs. En cuanto a la modulación del efecto genotóxico producido por ciclofosfamida encontrado en este estudio, el resultado es similar al encontrado en otro trabajo donde se administró carnosina antes de CP, en donde observaron que el resultado era muy alentado ya que también atenuaba la genotoxicidad y citotoxicidad del antineoplásico CP con una prueba en medula ósea de ratón (Naghshvar *et al.*, 2012). En ese trabajo este autor encontró que la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados presentaba un comportamiento dosis-dependiente. También otro trabajo, que administro durante 7 días mediante el alimento el extracto de *S. officinalis* tuvo como resultado un efecto anticlastogénico con el cual redujo la frecuencia de micronúcleos inducida por una sola dosis de CP (40 mg/kg peso del cuerpo) si se administraba 1.5 horas después de haber sido alimentado al organismo con *S. officinalis* (Üstün Alkan *et al.*, 2012).

Se han encontrado diversos productos naturales que al parecer tienen la habilidad de disminuir la frecuencia de MN provocada por el antineoplásico CP, pero prácticamente se ha observado que tienen que ser administrados antes del

antineoplásico para poder mostrar ese efecto quimio protector (Alves *et al.*, 2014; Delarmelina *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2017; López Nigro *et al.*, 2018). Otros, con saponinas triterpenoides mostraron el mismo efecto genoprotector al administrarlo antes de CP (Melek *et al.*, 2015).

Es sumamente importante mencionar que, hasta donde sabemos, éste es la primera vez que se ha reportado actividad antigenotóxica de las AgNPs en un modelo *in vivo* 24 horas después de haber administrado una dosis de 50 mg/kg de CP vía intraperitoneal.

La capacidad amortiguadora de las nanopartículas Argovit® contra el daño genotóxico agudo y acumulativo en etapas iniciales al parecer resulta no ser suficiente para contrarrestar el efecto producido por las dosis consecutivas de CP. Sin embargo, es muy importante recordar que la dosis de ciclofosfamida (50 mg/kg) utilizada en este trabajo es la sugerida para este tipo de estudios ya que garantiza un incremento de EPCMN. Además de ser una dosis diaria mucho más alta de la que se utiliza en algunos tratamientos médicos en donde dividen la dosis diaria de CP en 15 mg/kg durante cuatro días (Bonfim *et al.*, 2007).

Encontramos que una sola dosis de 6 mg/kg de la formulación de nano partículas Argovit® puede reducir hasta en un 50% de la frecuencia de EPCMN inducida por una sola dosis de CP, retrasando la producción de EPCMN después de una administración de dosis múltiples de una concentración genotóxica de CP. Aunque la administración de AgNPs no pudo revertir la mielosupresión causada por CP, si ayudo a reducir el daño nuclear en eritrocitos policromáticos. Tomando en

cuenta todo lo anterior, sabemos que se requieren más estudios para identificar el mecanismo o los eventos que generan el daño genotóxico acumulativo sin que haya evidencia de mielo supresión y daño genotóxico agudo. Adicionalmente, se necesitan hacer más experimentos para reconocer el esquema de administración para estas nanopartículas e identificar la dosis que pueda funcionar como agente adyuvante efectivo en los tratamientos contra el cáncer.

A pesar de la frecuencia observada del daño genotóxico acumulado después de tres dosis consecutivas de AgNPs Argovit®, los resultados nos muestran que la medula ósea no presenta daño después de una administración oral de una dosis efectiva, ya que no se observó ningún cambio en la frecuencia de eritrocitos policromáticos comparando esta con el control negativo. Las Figuras 6-8 muestran que Argovit® contrarresta la mielosupresión, el daño genotóxico agudo y acumulativo generado por repetidas dosis de CP. Por lo que estos resultados nos proporcionan evidencia del efecto antigenotóxico de las AgNPs contra un agente altamente citotóxico y genotóxico como lo es la ciclofosfamida.

En el caso de los experimentos efectuados con Ara-C, y AgNPs Argovit®, los resultados mostraron que los esquemas de tratamiento aplicados no indujeron citotoxicidad considerable ni efectos definitivos sobre la médula ósea. Como lo han establecido previamente varios autores, la administración de este antineoplásico produce citotoxicidad aguda en términos de horas, la cual decae entre 10 y 12 horas después de la aplicación aun en dosis repetidas por un máximo de 5 días y concentraciones mayores a las utilizadas en este estudio (Burke *et al.*, 1968; Fridrik

et al., 1988; Heo *et al.*, 2020; Seipelt *et al.*, 1998), esta situación es similar a la que se registró con las AgNPs Argovit® y CP, como ya se describió arriba.

Por otra parte, se encontró que dosis repetidas de Argovit® permiten aminorar la genotoxicidad inducida por Ara-C al mostrar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los esquemas en los que se utilizó Argovit® después de retar a los organismos con Ara-C y también de manera alternada. En cambio, cuando se utilizó el antineoplásico únicamente por tres días consecutivos, la genotoxicidad en términos de eritrocitos policromáticos micronucleados fue significativamente superior ($p < 0.05$) a los tratamientos en los que se utilizó Argovit®. Tratamientos que permiten potenciar o mitigar la genotoxicidad de Ara-C se han estudiado anteriormente con efectos similares, como es el caso de un trabajo en el que se usó la combinación de radotinib y Ara-C en leucemia. Encontraron que radotinib y Ara-C indujo la detención en G0/G1 a través de la inducción de CDKI como p21 y p27 y la inhibición de CDK2 y ciclina E. El efecto combinado de radotinib/Ara-C induce la apoptosis dependiente de las mitocondrias y la detención G0/G1 a través de la regulación de la cascada CDKI-CDK-ciclina en las células de leucemia e inhibe el crecimiento de las células de las células de leucemia mieloide aguda, incluyendo el volumen y el peso del tumor *in vivo* en tumores xenotransplantados. Asimismo, la combinación de radotinib y Ara-C puede sensibilizar a las células a los agentes quimioterapéuticos como daunorubicina o idarubicina en las células de leucemia y concluyen que el radotinib en combinación con el Ara-C posee una fuerte actividad antileucémica (Heo *et al.*, 2020). Lo anterior permite suponer que Argovit® puede

tener un mecanismo similar, aunque estudios más precisos son necesarios para probar esta hipótesis.

Estos resultados permiten la exploración de nuevas aplicaciones para estas nanopartículas. También contribuyen al desarrollo de nanomateriales seguros para el uso en aplicaciones biomédicas.

CONCLUSIONES

1. Las nano partículas de plata Argovit® no presentaron daño genotóxico agudo en eritrocitos de sangre periférica de ratón BALB/c con una dosis de 6 mg/kg y un esquema de tratamiento cada 24 horas por tres días.
2. Aunque se observó daño genotóxico acumulativo inducido por estas AgNPs, el efecto desaparece con el paso del tiempo y no disminuye la frecuencia de eritrocitos policromáticos.
3. Estos resultados indican la importante biocompatibilidad de estas AgNPs en el modelo murino BALB/c, comparados con la CP, el cual induce mielo supresión.
4. A nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta el amortiguamiento del daño genotóxico producido por la ciclofosfamida con el uso de una formulación no citotóxica de nanopartículas de plata.
5. Argovit® puede reducir hasta en un 50% la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (genotoxicidad aguda) cuando se administra 24 horas después de una dosis genotóxica de CP (50 mg/kg).

6. Argovit® puede reducir hasta en un 100% la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (genotoxicidad aguda) cuando se administra después de tres dosis consecutivas de Ara-C (6 mg/kg). La misma respuesta se obtiene al administrar Ara-C y AgNPs de forma alternada.
7. Argovit® retrasa la aparición de micronúcleos hasta 24 horas después de administraciones múltiples de ciclofosfamida.
8. Los resultados sugieren un efecto amortiguador sobre el daño que genera la ciclofosfamida y citosina arabinosa en células sanas conferido por la administración de nanopartícula de plata.
9. Las nano partículas de plata reducen el daño genotóxico causado por aplicaciones previas de un agente antineoplásico.
10. Estos resultados pueden contribuir al diseño de tratamientos quimioterapéuticos que puedan disminuir el efecto adverso causado por los tratamientos actuales.

RECOMENDACIONES

- Se requieren más estudios para identificar el mecanismo o los eventos que generan el daño genotóxico acumulativo sin que haya evidencia de mielosupresión y daño genotóxico agudo después de la administración de nanopartículas de plata Argovit®.
- Es necesario identificar el esquema de administración óptima para estas nanopartículas para descubrir la dosis que sea un adyuvante efectivo en los tratamientos contra el cáncer.

- Los resultados encontrados permiten proponer a las nanopartículas de plata Argovit® como un agente geno-protector. Esta aplicación no debe limitarse a los agentes antineoplásicos, podría explorarse su aplicación para aminorar el efecto genotóxico observado al tratar otros padecimientos.

LITERATURA CITADA

- Aagaard, L., Hansen, E., 2013. Side effects of antineoplastic and immunomodulating medications reported by European consumers. *J. Res. Pharm. Pract.* 2, 44. <https://doi.org/10.4103/2279-042x.114091>
- Adhikari, A., 2019. Micronuclei (MN), an Important Cancer Biomarker. *Edelweiss Cancer Open Access* 37–42. <https://doi.org/10.33805/2689-6737.109>
- Ahlberg, S., Antonopulos, A., Diendorf, J., Dringen, R., Epple, M., Flöck, R., Goedecke, W., Graf, C., Haberl, N., Helmlinger, J., Herzog, F., Heuer, F., Hirn, S., Johannes, C., Kittler, S., Köller, M., Korn, K., Kreyling, W.G., Krombach, F., Lademann, J., Loza, K., Luther, E.M., Malissek, M., Meinke, M.C., Nordmeyer, D., Pailliar, A., Raabe, J., Rancan, F., Rothen-Rutishauser, B.R., Rühl, E., Schleh, C., Seibel, A., Sengstock, C., Treuel, L., Vogt, A., Weber, K., Zellner, R., 2014. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. *Beilstein J. Nanotechnol.* 5, 1944–1965. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.205>

Álvarez-Suárez, A.S., Dastager, S.G., Bogdanchikova, N., Grande, D., Pestryakov, A., García-Ramos, J.C., Pérez-González, G.L., Juárez-Moreno, K., Toledano-Magaña, Y., Smolentseva, E., Paz-González, J.A., Popova, T., Rachkovskaya, L., Nimaev, V., Kotlyarova, A., Korolev, M., Letyagin, A., Villarreal-Gómez, L.J., 2020. Electrospun fibers and sorbents as a possible basis for effective composite wound dressings. *Micromachines* 11. <https://doi.org/10.3390/MI11040441>

Alves, A.B.C.R., Santos, R.S. Dos, Calil, S.D.S., Niero, R., Lopes, J.D.S., Perazzo, F.F., Rosa, P.C.P., Andrade, S.F., Cechinel-Filho, V., Maistro, E.L., 2014. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol.* 153, 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.033>

Araujo-Espino, D.I., Zamora-Perez, A.L., Zúñiga-González, G.M., Gutiérrez-Hernández, R., Morales-Velazquez, G., Lazalde-Ramos, B.P., 2017. Genotoxic and cytotoxic evaluation of *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. by the micronucleus test in mouse peripheral blood. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 86, 260–264. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.03.017>

Arrebola, A., Francisco, D., Fernández, R., Alfredo, L., Emilia, Y., Roche, D., Bourzac, I., Francisco, J., Rosario, L.A., Fernández, S., Infante, F., 2011. Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratones Balb / c Spontaneous and induced frequency of transplacental micronucleus in Balb / c m. *Nov. Sci.* 3, 1–15.

- Beck, L., Bomback, A.S., Choi, M.J., Holzman, L.B., Langford, C., Mariani, L.H., Somers, M.J., Trachtman, H., Waldman, M., 2013. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 62, 403–441. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.06.002>
- Bello-Bello, J.J., Chavez-Santoscoy, R.A., Lecona-Guzmán, C.A., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gómez-Merino, F.C., Pestryakov, A., 2017. Hormetic response by silver nanoparticles on in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum spp. Cv. Mex 69-290*) using a temporary immersion system. *Dose-Response* 15, 1–9. <https://doi.org/10.1177/1559325817744945>
- Bello-Bello, J.J., Spinoso-Castillo, J.L., Arano-Avalos, S., Martínez-Estrada, E., Arellano-García, M.E., Pestryakov, A., Toledano-Magaña, Y., García-Ramos, J.C., Bogdanchikova, N., 2018. Cytotoxic, genotoxic, and polymorphism effects on *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews after long-term exposure to argovit® silver nanoparticles. *Nanomaterials* 8. <https://doi.org/10.3390/nano8100754>
- Bergin, I.L., Wilding, L.A., Morishita, M., Walacavage, K., Ault, A.P., Axson, J.L., Stark, D.I., Hashway, S.A., Capracotta, S.S., Leroueil, P.R., Maynard, A.D., Philbert, M.A., 2016. Effects of particle size and coating on toxicologic parameters, fecal elimination kinetics and tissue distribution of acutely ingested silver nanoparticles in a mouse model. *Nanotoxicology* 10, 352–360. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1072588>
- Bing Tan, K., Sun, D., Huang, J., Odoom-Wubah, T., Li, Q., 2020. State of Arts on the Bio-Synthesis of Noble Metal Nanoparticles and their Biological Application.

Chinese J. Chem. Eng. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.11.010>

Biswas, P.K., Dey, S., 2015. Effects and Applications of Silver Nanoparticles in Different Fields. *Int. J. Recent Sci. Res.* 6, 5880–5883.

Bogdanchikova, N., Vázquez-Muñoz, R., Huerta-Saquero, A., Pena-Jasso, A., Aguilar-Uzcanga, G., Picos-Díaz, P.L., Pestryakov, A., Burmistrov, V., Martynyuk, O., Luna-Vázquez-Gómez, R., Almanza, H., 2016. Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *Int. J. Nanotechnol.* 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1504/IJNT.2016.074536>

Bonfim, C.M., de Medeiros, C.R., Bitencourt, M.A., Zanis-Neto, J., Funke, V.A.M., Setubal, D.C., Ruiz, J., Sanders, J.E., Flowers, M.E.D., Kiem, H.P., Storb, R., Pasquini, R., 2007. HLA-Matched Related Donor Hematopoietic Cell Transplantation in 43 Patients with Fanconi Anemia Conditioned with 60 mg/kg of Cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 1455–1460. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.08.004>

Borrego, B., Lorenzo, G., Mota-Morales, J.D., Almanza-Reyes, H., Mateos, F., López-Gil, E., de la Losa, N., Burmistrov, V.A., Pestryakov, A.N., Brun, A., Bogdanchikova, N., 2016. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12, 1185–1192. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.021>

Burke, P.J., Serpick, A.A., Carbone, P.P., Tarr, N., 1968. A Clinical Evaluation of

Dose and Schedule of Administration of Cytosine Arabinoside (NSC 63878).
Cancer Res. 28.

Burmistrov, V.A., 2005. No <http://vector-vita.com/products.html>Title [WWW Document].

Cano P., A., Cifuentes P., L., Amariles, P., 2017. Liver toxicity caused by medicines: Structured review. *Rev. Colomb. Gastroenterol.* 32, 337–348.

Casillas-figueroa, F., Arellano-garcía, M.E., Leyva-aguilera, C., Ruíz-ruíz, B., Vázquez-gómez, R.L., Radilla-chávez, P., Chávez-santoscoy, R.A., Pestryakov, A., Toledano-magaña, Y., García-ramos, J.C., Bogdanchikova, N., 2020. Argovit™ silver nanoparticles effects on allium cepa: Plant growth promotion without cyto genotoxic damage. *Nanomaterials* 10, 1–20.
<https://doi.org/10.3390/nano10071386>

Cunningham, B., Engstrom, A.E., Harper, B.J., Harper, S.L., Mackiewicz, M.R., 2021. Silver nanoparticles stable to oxidation and silver ion release show size-dependent toxicity in vivo. *Nanomaterials* 11.
<https://doi.org/10.3390/nano11061516>

Delarmelina, J.M., Dutra, J.C.V., Batitucci, M. do C.P., 2014. Antimutagenic activity of ipriflavone against the DNA-damage induced by cyclophosphamide in mice. *Food Chem. Toxicol.* 65, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.028>

Dobrzyńska, M.M., Gajowik, A., Radzikowska, J., Lankoff, A., Dušínská, M., Kruszewski, M., 2014. Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles

- in bone marrow cells of rats in vivo. *Toxicology* 315, 86–91.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.11.012>
- Fang, W., Chi, Z., Li, W., Zhang, X., Zhang, Q., 2019. Comparative study on the toxic mechanisms of medical nanosilver and silver ions on the antioxidant system of erythrocytes: From the aspects of antioxidant enzyme activities and molecular interaction mechanisms. *J. Nanobiotechnology* 17, 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s12951-019-0502-2>
- Faurschou, M., Sorensen, I.J., Mellemkjaer, L., Loft, A.G.R., Thomsen, B.S., Tvede, N., Baslund, B., 2008. Malignancies in Wegener's granulomatosis: Incidence and relation to cyclophosphamide therapy in a cohort of 293 patients. *J. Rheumatol.* 35, 100–105.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(86\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(86)90010-2)
- Ferdous, Z., Beegam, S., Tariq, S., Ali, B.H., Nemmar, A., 2018. The in Vitro Effect of Polyvinylpyrrolidone and Citrate Coated Silver Nanoparticles on Erythrocytic Oxidative Damage and Eryptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 49, 1577–1588.
<https://doi.org/10.1159/000493460>
- Fridrik, M.A., Wahl, G., Herbinger, W., 1988. Low dose cytosine arabinoside in refractory anemia with excess of blasts in transformation. *Blut* 57.
<https://doi.org/10.1007/BF00320758>

- García-Milián, A.J., Gálvez-Alvarez, Y., González-del Sol, M., León-Cabrera, P., 2018. Patrón de consumo de antineoplásicos utilizados para el tratamiento del cáncer en La Habana del 2011-2015. *Horiz. Sanit.* 17, 39–50. <https://doi.org/10.19136/hs.a17n1.1989>
- Gerardo, G., Jesús, G., Pilar, M., Paz, S. De, Isa, S., Bres, M., Victoria, M., Fernando, X., Aldinio, V., Laura, V., Gustavo, G., Pereira, N., Silva, D., Gatto, M., 2019. *Neurología Argentina* 1, 136–144.
- Gherasim, Oana, Rebecca Alexandra Puiu, Alexandra Catalina Bîrca, Alexandra Cristina Burduşel, and Alexandru Mihai Grumezescu. 2020. *An Updated Review on Silver Nanoparticles in Biomedicine. Nanomaterials.* Vol. 10. <https://doi.org/10.3390/nano10112318>.
- Glotov, A.G., Glotova, T.I., Sergeev, A.A., Belkina, T. V, Sergeev, A.N., 2004. [Antiviral activity of different drugs in vitro against viruses of bovine infectious rhinotracheitis and bovine diarrhea]. *Vopr Virusol* 49, 43–46.
- Gómez-Meda, B.C., Bañales-Martínez, L.R., Zamora-Perez, A.L., Lemus-Varela, M.D.L., Trujillo, X., Sánchez-Parada, M.G., Torres-Mendoza, B.M., Armendáriz-Borunda, J., Zúñiga-González, G.M., 2016. Micronucleated erythrocytes in peripheral blood from neonate rats exposed by breastfeeding to Cyclophosphamide, Colchicine, or Cytosine-Arabinoside. *Biomed Res. Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9161648>
- Gray, J.W., Pallavicini, M.G., 1982. Ara-C scheduling: Theoretical and experimental

considerations. Med. Pediatr. Oncol. 10, 93–108.

<https://doi.org/10.1002/mpo.2950100711>

Greulich, C., Diendorf, J., Geßmann, J., Simon, T., Habijan, T., Eggeler, G., Schildhauer, T.A., Epple, M., Köller, M., 2011. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomater.* 7, 3505–3514. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.030>

Grille, S., Guadagna, R., Boada, M., Irigoín, V., Stevenazzi, M., Guillermo, C., Díaz, L., 2013. Citarabina y reacciones cutáneas en leucemia aguda mieloide. *Med.* 73, 535–538.

Guerra, J.D., Sandoval, G., Patron, A., Avalos-Borja, M., Pestryakov, A., Garibo, D., Susarrey-Arce, A., Bogdanchikova, N., 2020. Selective antifungal activity of silver nanoparticles: A comparative study between *Candida tropicalis* and *Saccharomyces boulardii*. *Colloids Interface Sci. Commun.* 37, 100280. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2020.100280>

Hansen, E.H., 1992. Technology Assessment In A User Perspective-Experiences With Drug Technology. *Int. J. Technol. Assess. Health Care* 8, 150–165. <https://doi.org/10.1017/S0266462300008011>

Hatanaka, Y., 1992. Micronucleus test with cyclophosphamide using mouse peripheral blood reticulocytes. *Mutat. Res. Toxicol.* 278, 99–101. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90216-M](https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90216-M)

Hayama, M., Yamamoto, K.I., Kohori, F., Uesaka, T., Ueno, Y., Sugaya, H., Itagaki,

- I., Sakai, K., 2004. Nanoscopic behavior of polyvinylpyrrolidone particles on polysulfone/polyvinylpyrrolidone film. *Biomaterials* 25, 1019–1028. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00629-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00629-X)
- Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, D.G., Blakey, D.H., Dertinger, S.D., Abramsson-Zetterberg, L., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Asano, N., Suzuki, H., Ohyama, W., Gibson, D., 2007. In vivo erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 627, 10–30. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.010>
- Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Kirsh-Volders, M., Oleson, F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S., Vannier, B., 1994. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90039-6)
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P., MacGregor, J.T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18, 277–291. <https://doi.org/10.1002/em.2850180414>
- Heo, S.K., Noh, E.K., Yu, H.M., Kim, D.K., Seo, H.J., Lee, Y.J., Cheon, J., Koh, S.J., Min, Y.J., Choi, Y., Jo, J.C., 2020. Radotinib enhances cytarabine (Ara-C)-induced acute myeloid leukemia cell death. *BMC Cancer* 20. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07701-8>
- Huang, H., Lai, W., Cui, M., Liang, L., Lin, Y., Fang, Q., Liu, Y., Xie, L., 2016. An

Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. *Sci. Rep.* 6, 1–15.

<https://doi.org/10.1038/srep25518>

Igl, B.W., Bitsch, A., Bringezu, F., Chang, S., Dammann, M., Frötschl, R., Harm, V., Kellner, R., Krzykalla, V., Lott, J., Nern, M., Pfuhler, S., Queisser, N., Schulz, M., Sutter, A., Vaas, L., Vonk, R., Zellner, D., Ziemann, C., 2019. The rat bone marrow micronucleus test: Statistical considerations on historical negative control data. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 102, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.12.009>

Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R., Mota-Morales, J., Perez-Mozqueda, L., Garcia-Garcia, M., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N., 2017. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Hum. Exp. Toxicol.* 36, 931–948. <https://doi.org/10.1177/0960327116675206>

Kalmantaeva, O. V., Firstova, V. V., Potapov, V.D., Zyrina, E. V., Gerasimov, V.N., Ganina, E.A., Burmistrov, V.A., Borisov, A. V., 2014. Silver-nanoparticle exposure on immune system of mice depending on the route of administration. *Nanotechnologies Russ.* 9, 571–576. <https://doi.org/10.1134/S1995078014050061>

Kim, J.S., Sung, J.H., Ji, J.H., Song, K.S., Lee, J.H., Kang, C.S., Yu, I.J., 2011. In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure. *Saf. Health Work* 2, 34–38. <https://doi.org/10.5491/SHAW.2011.2.1.34>

- Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Yu, I.J., 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 20, 575–583. <https://doi.org/10.1080/08958370701874663>
- Kissling, G.E., Dertinger, S.D., Hayashi, M., MacGregor, J.T., 2007. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of cells scored and inter-animal variability. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 634, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.07.010>
- Koyama, H., Wada, T., Nishizawa, Y., Iwanaga, T., Aoki, Y., Terasawa, T., Kosaki, G., Yamamoto, T., Wada, A., 1977. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer* 39, 1403–1409. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197704\)39:4<1403::AID-CNCR2820390408>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197704)39:4<1403::AID-CNCR2820390408>3.0.CO;2-8)
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 155–166. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00117-2)
- Krishna, G., Petrere, J., Anderson, J., Theiss, J., 1995. Use of cyclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assays. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 335, 331–337. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)00038-0](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)00038-0)

- Kumar, R.P., Abraham, A., 2016. PVP- coated naringenin nanoparticles for biomedical applications – In vivo toxicological evaluations. *Chem. Biol. Interact.* 257, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.012>
- Kushwaha, A., Singh, V.K., Bhartariya, J., Singh, P., Yasmeen, K., 2015. Isolation and identification of *E. coli* bacteria for the synthesis of silver nanoparticles: Characterization of the particles and study of antibacterial activity. *Pelagia Res. Libr. Eur. J. Exp. Biol.* 5, 65–70.
- Latta, K., von Schnakenburg, C., Ehrich, J.H.H., 2001. A meta-analysis of cytotoxic treatment for frequently relapsing nephrotic syndrome in children. *Pediatr. Nephrol.* 16, 271–282. <https://doi.org/10.1007/s004670000523>
- Leon, L., Chung, E.J., Rinaldi, C., 2019. A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications, *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00001-1>
- Li, Y., Bhalli, J.A., Ding, W., Yan, J., Pearce, M.G., Sadiq, R., Cunningham, C.K., Jones, M.Y., Monroe, W.A., Howard, P.C., Zhou, T., Chen, T., 2014. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology* 8, 36–45. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.855827>
- Lin, S., Hao, G., Long, M., Lai, F., Li, Q., Xiong, Y., Tian, Y., Lai, D., 2017. Oyster (*Ostrea plicatula* Gmelin) polysaccharides intervention ameliorates

cyclophosphamide—Induced genotoxicity and hepatotoxicity in mice via the Nrf2—ARE pathway. Biomed. Pharmacother. 95, 1067–1071. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.058>

López Nigro, M.M., Peroni, R.N., Ayllón-Cabrera, I., Schiariti Lampropulos, V.E., Roma, M.I., Carballo, M.A., 2018. In vivo antigenotoxic activity of *Diplotaxis tenuifolia* against cyclophosphamide-induced DNA damage: Relevance of modulation of hepatic ABC efflux transporters. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 836, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.006>

Luna-Vázquez-gómez, R., Arellano-García, M.E., García-Ramos, J.C., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D.S., Casillas-Figueroa, F., Ruiz-Ruiz, B., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., 2021. Hemolysis of human erythrocytes by argovitTM agnps from healthy and diabetic donors: An in vitro study. Materials (Basel). 14. <https://doi.org/10.3390/ma14112792>

Melek, F.R., Aly, F.A., Kassem, I.A.A., Abo-Zeid, M.A.M., Farghaly, A.A., Hassan, Z.M., 2015. Three further triterpenoid saponins from *Gleditsia caspica* fruits and protective effect of the total saponin fraction on cyclophosphamide-induced genotoxicity in mice. Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci. 70, 31–37. <https://doi.org/10.1515/znc-2014-4132>

Mulvaney, P., 2015. Nanoscience vs. Nanotechnology. ACS Nano 9, 2215–2217.

Naghshvar, F., Abianeh, S.M., Ahmadashrafi, S., Hosseinimehr, S.J., 2012. Chemoprotective effects of carnosine against genotoxicity induced by

cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Cell Biochem. Funct.* 30, 569–573. <https://doi.org/10.1002/cbf.2834>

Nallanthighal, S., Chan, C., Bharali, D.J., Mousa, S.A., Vásquez, E., Reliene, R., 2017. Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model. *NanoImpact*. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.01.003>

Narciso, L., Coppola, L., Lori, G., Andreoli, C., Zjino, A., Bocca, B., Petrucci, F., Di Virgilio, A., Martinelli, A., Tinari, A., Maranghi, F., Tassinari, R., 2020. Genotoxicity, biodistribution and toxic effects of silver nanoparticles after in vivo acute oral administration. *NanoImpact* 18, 100221. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100221>

Nayek, S., De Silva, I.W., Aguilar, R., Lund, A.K., Verbeck, G.F., 2020. Toxicological alterations induced by subacute exposure of silver nanoparticles in Wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* 1–15. <https://doi.org/10.1002/jat.4086>

OCDE, 2016. OECD 474 GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Mammalian Erythrocyte Micronucleous Test.

Ochoa-Meza, A.R., Álvarez-Sánchez, A.R., Romo-Quíñonez, C.R., Barraza, A., Magallón-Barajas, F.J., Chávez-Sánchez, A., García-Ramos, J.C., Toledano-Magaña, Y., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Mejía-Ruiz, C.H., 2019. Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system. *Fish Shellfish*

Immunol. 84, 1083–1089. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.007>

Oldenburg, S., 2004. nanoComposix is now a Fortis Life Sciences Company [WWW Document].

Palo, A.K., Sahoo, D., Choudhury, R.C., 2009. Cytosine arabinoside-induced cytogenotoxicity in bone marrow and spermatogonial cells of mice and its potential transmission through the male germline. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 673, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.11.007>

Pang, C., Brunelli, A., Zhu, C., Hristozov, D., Liu, Y., Semenzin, E., Wang, W., Tao, W., Liang, J., Marcomini, A., Chen, C., Zhao, B., 2016. Demonstrating approaches to chemically modify the surface of Ag nanoparticles in order to influence their cytotoxicity and biodistribution after single dose acute intravenous administration. *Nanotoxicology* 10, 129–139. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1024295>

Park, M.V.D.Z., Neigh, A.M., Vermeulen, J.P., de la Fonteyne, L.J.J., Verharen, H.W., Briedé, J.J., van Loveren, H., de Jong, W.H., 2011. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32, 9810–9817. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>

Plácido, J., Bustamante López, S., Meissner, K.E., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2019. Multivariate analysis of biochar-derived carbonaceous nanomaterials for detection of heavy metal ions in aqueous systems. *Sci. Total Environ.* 688, 751–

761. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.342>

Platonova, T.A., Pridvorova, S.M., Zherdev, A. V., Vasilevskaya, L.S., Arianova, E.A., Gmoshinski, I. V., Khotimchenko, S.A., Dzantiev, B.B., Popov, V.O., Tutelyan, V.A., 2013. Identification of silver nanoparticles in the small intestinal mucosa, liver, and spleen of rats by transmission electron microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 155, 236–241. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2122-4>

Ponticelli, C., Escoli, R., Moroni, G., 2018. Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases? *Autoimmun. Rev.* 17, 1022–1027. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.04.007>

Rao, K.S., El-Hami, K., Kodaki, T., Matsushige, K., Makino, K., 2005. A novel method for synthesis of silica nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 289, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.02.019>

Romo-Quiñonez, C.R., Álvarez-Sánchez, A.R., Álvarez-Ruiz, P., Chávez-Sánchez, M.C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Mejia-Ruiz, C.H., 2020. Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus infection. *PeerJ* 2020, 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.8446>

Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M.E., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D.S., Toledano-Magaña, Y., Casillas-Figueroa, F., Luna Vazquez-Gomez, R., Pestryakov, A., García-Ramos, J.C., Bogdanchikova, N., 2020. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for

Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. ACS Omega.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00149>

Salamat, S., Hadavifar, M., Rezaei, H., 2019. Preparation of nanochitosan-STP from shrimp shell and its application in removing of malachite green from aqueous solutions. J. Environ. Chem. Eng. 7, 103328.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103328>

Sánchez-López, Elena, Daniela Gomes, Gerard Esteruelas, Lorena Bonilla, Ana Laura Lopez-Machado, Ruth Galindo, Amanda Cano, et al. 2020. "Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview." *Nanomaterials* 10 (2): 1–43. <https://doi.org/10.3390/nano10020292>.

Schmid, W., 1975. The micronucleus test. Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj. 31, 9–15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)

Seipelt, G., Hofman, W.K., Martin, H., Wassmann, B., Boehme, A., Ottmann, O.G., Hoelzer, D., 1998. Comparison of toxicity and outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with high-dose cytosine arabinoside consolidation after induction with a regimen containing idarubicin or daunorubicin. Ann. Hematol. 76. <https://doi.org/10.1007/s002770050379>

Semenov, F. V., Fidarova, K.M., 2012. [The treatment of the patients presenting with chronic inflammation of the trepanation cavity with a preparation containing silver nanoparticles following sanitation surgery of the open type]. Vestn. Otorinolaringol. 117–119.

- Shokrzadeh, M., Ahmadi, A., Chabra, A., 2014. The potential ameliorative effects of melatonin against cyclophosphamide-induced DNA damage in murine bone marrow cells 605–611.
- Sommer, S., Buraczewska, I., Kruszewski, M., 2020. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7–9. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- Souza, T.A.J., Franchi, L.P., Rosa, L.R., da Veiga, M.A.M.S., Takahashi, C.S., 2016. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 795, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.002>
- Stephano-Hornedo, J.L., Torres-Gutiérrez, O., Toledano-Magaña, Y., Gradilla-Martínez, I., Pestryakov, A., Sánchez-González, A., García-Ramos, J.C., Bogdanchikova, N., 2020. Argovit™ silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (: *Citrus aurantifolia* Swingle). *RSC Adv.* 10, 6146–6155. <https://doi.org/10.1039/c9ra09018e>
- Swathy, B., 2014. A Review on Metallic Silver Nanoparticles. *IOSR J. Pharm.* 4, 38–44. <https://doi.org/10.9790/3013-0407038044>
- Tan, K.B., Reza, A.K., Abdullah, A.Z., Amini Horri, B., Salamatinia, B., 2018. Development of self-assembled nanocrystalline cellulose as a promising practical adsorbent for methylene blue removal. *Carbohydr. Polym.* 199, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.006>

- Torres-Bugarín, O., Zavala-Aguirre, J.L., Gómez-Rubio, P., Buelna-Osben, H.R., Zúñiga-González, G., Gómez, M.G.-U., 2007. Potential fish species as genotoxicity biomarkers at lake “ La Alberca ”, Michoacan , Mexico. *Hidrobiológica* 17, 75–81.
- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M.G., Macriz-Romero, N., Flores-García, A., Ramos-Ibarra, M.L., 2013. Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Resid.* 8, 4–11.
- Umoren, S.A., Obot, I.B., Gasem, Z.M., 2014. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using red apple (*malus domestica*) fruit extract at room temperature. *J. Mater. Environ. Sci.* 5, 907–914.
- Üstün Alkan, F., Esen Gürsel, F.E., Ateş, A., Özyürek, M., Güçlü, K., Altun, M., 2012. Protective effects of *Salvia officinalis* extract against cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in rats. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 36, 646–654. <https://doi.org/10.3906/vet-1105-36>
- Valenzuela-Salas, L.M., Blanco-Salazar, A., Perrusquía-Hernández, J.D., Nequiz-Avendaño, M., Mier-Maldonado, P.A., Ruiz-Ruiz, B., Campos-Gallegos, V., Arellano-García, M.E., García-Ramos, J.C., Pestryakov, A., Villarreal-Gómez, L.J., Toledano-Magaña, Y., Bogdanchikova, N., 2021. New protein-coated silver nanoparticles: Characterization, antitumor and amoebicidal activity, antiproliferative selectivity, genotoxicity, and biocompatibility evaluation. *Pharmaceutics* 13, 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010065>

- Valenzuela-Salas, L.M., Blanco-Salazar, A., Perrusquía-Hernández, J.D., Nequiz-Avendaño, M., Mier-Maldonado, P.A., Ruiz-Ruiz, B., Campos-Gallegos, V., Arellano-García, M.E., García-Ramos, J.C., Pestryakov, A., Villarreal-Gómez, L.J., Toledano-Magaña, Y., Bogdanchikova, N., 2021. New protein-coated silver nanoparticles: Characterization, antitumor and amoebicidal activity, antiproliferative selectivity, genotoxicity, and biocompatibility evaluation. *Pharmaceutics* 13, 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010065>
- Valenzuela-Salas, L.M., Girón-Vázquez, N.G., García-Ramos, J.C., Torres-Bugarín, O., Gómez, C., Pestryakov, A., Villarreal-Gómez, L.J., Toledano-Magaña, Y., Bogdanchikova, N., 2020. Antiproliferative and antitumour effect of nongenotoxic silver nanoparticles on melanoma models. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4528241>
- Vazquez-Muñoz, R., Meza-Villezcás, A., Fournier, P.G.J., Soria-Castro, E., Juárez-Moreno, K., Gallego-Hernández, A.L., Bogdanchikova, N., Vazquez-Duhalt, R., Huerta-Saquero, A., 2019. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One* 14, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224904>
- Velásquez, C.A., González, M., Berrouet, M.C., Jaramillo, N., 2016. Cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia desde las bases moleculares hasta la perspectiva clínica. *Rev. Colomb. Cardiol.* 23, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2015.10.002>
- Wen, H., Dan, M., Yang, Y., Lyu, J., Shao, A., Cheng, X., Chen, L., Xu, L., 2017.

Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. PLoS One 12, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185554>

Xing, Malcolm, Liangpeng Ge, Meng Wang, Qingtao Li, Xiojian Li, and Jun Ouyang. 2014. “Nanosilver Particles in Medical Applications: Synthesis, Performance, and Toxicity.” *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 2399. <https://doi.org/10.2147/IJN.S55015>.

Xu, Liming, Xuefei Li, Taro Takemura, Nobutaka Hanagata, Gang Wu, and Laisheng L. Chou. 2012. “Genotoxicity and Molecular Response of Silver Nanoparticle (NP)-Based Hydrogel.” *Journal of Nanobiotechnology* 10: 1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-16>.

Yilmaz, N., Emmungil, H., Gucenmez, S., Ozen, G., Yildiz, F., Balkarli, A., Kimyon, G., Coskun, B.N., Dogan, I., Pamuk, O.N., Yasar, S., Cetin, G.Y., Yazici, A., Esmen, S.E., Cagatay, Y., Yilmaz, S., Cefle, A., Sayarlioglu, M., Kasifoglu, T., Karadag, O., Pehlivan, Y., Dalkilic, E., Kisacik, B., Cobankara, V., Erken, E., Direskeneli, H., Aksu, K., Yavuz, S., 2015. Incidence of cyclophosphamide-induced urotoxicity and protective effect of mesna in rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 42, 1661–1666. <https://doi.org/10.3899/jrheum.150065>

Younes, N.A., Hassan, H.S., Elkady, M.F., Hamed, A.M., Dawood, M.F.A., 2020. Impact of synthesized metal oxide nanomaterials on seedlings production of three Solanaceae crops. *Heliyon* 6, e03188.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03188>

Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., Patiño, A., 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. An. Sist. Sanit. Navar. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272005000300007>

Zúñiga-González, G., Ramírez-Muñoz, M.P., Torres-Bugarín, O., Pérez-Jiménez, J., Ramos-Mora, A., Zamora-Pérez, A., Gallegos-Arreola, M.P., Sánchez-Corona, J., 1998. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabinoside. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 413, 187–189. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00184-8)

Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ramos Ibarra, M.L., Martínez-González, S., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A., Ontiveros-Lira, D., Gallegos-Arreola, M.P., 2001. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans - Spontaneous micronuclei in 43 species. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 494, 161–167. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00180-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00180-2)

Anexo 1

Eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos totales (EPC/1000 ET) en los diferentes grupos de estudio.

		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	
Horas	n	Media (±)	Media (±)	Media (±)	Media (±)	Media (±)	
0	30	211.0	79.0	211.0	79.0	211.0	79.0
24	6	247.3	16.3	243.2	47.4	285.0	17.7
48	6	248.9	60.9	174.1	21.4	225.8	12.6
72	6	267.2	74.2	84.2	6.1	279.8	8.2
96	6	217.5	62.0	78.7	20.6	265.8	37.5
120	6	270.0	71.2	194.4	5.5	166.8	21.0
144	6	255.2	45.8	188.5	30.8	154.3	18.3
168	6	272.8	43.4	169.4	25.9	197.7	56.7

n= tamaño de la muestra, media y desviación estándar. Eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos. Grupo 1: agua (0, 24, 48 h), Grupo 2: CP (0 h), Grupo 3: AgNPs (0, 24, 48 h), Grupo 4: CP + AgNPs; CP (0 h) + AgNPs (24, 48, 72 h) y Grupo 5: CP + AgNPs; CP (0, 48, 96 h) + AgNPs (24, 72, 120 h).

Anexo 2

Eritrocitos micronucleados (EMN/10,000 ET) en los diferentes grupos de estudio.

		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5	
Horas	n	Media ($\pm$)		Media ($\pm$)		Media ($\pm$)		Media ($\pm$)		Media ($\pm$)	
0	30	10.3	8.0	10.3	8.0	10.3	8.0	10.3	8.0	10.3	8.0
24	6	19.8	6.4	9.8	2.5	39.9	5.0	3.3	1.1	21.3	4.6
48	6	12.9	8.4	22.9	6.3	42.1	6.6	12.7	3.4	13.7	2.3
72	6	18.2	5.8	3.4	0.7	22.7	4.4	6.3	1.7	20.9	5.3
96	6	16.3	6.9	14.4	7.9	21.3	2.9	2.5	1.2	23.4	2.9
120	6	9.6	6.3	14.3	3.1	45.5	7.7	10.3	4.4	67.7	1.4
144	6	7.3	4.2	22.6	3.0	38.2	4.5	20.0	2.2	21.1	4.2
168	6	15.3	4.6	14.1	2.2	27.5	3.7	1.3	1.6	21.3	2.1

n= tamaño de la muestra, media y desviación estándar. Eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos. Grupo 1: agua (0, 24, 48 h), Grupo 2: CP (0 h), Grupo 3: AgNPs (0, 24, 48 h), Grupo 4: CP + AgNPs; CP (0 h) + AgNPs (24, 48, 72 h) y Grupo 5: CP + AgNPs; CP (0, 48, 96 h) + AgNPs (24, 72, 120 h).



Article

AgNPs Argovit™ Modulates Cyclophosphamide-Induced Genotoxicity on Peripheral Blood Erythrocytes In Vivo

Idalia Yazmin Castañeda-Yslas ¹, Olivia Torres-Bugarin ², Juan Carlos García-Ramos ^{3,*}, Yanis Toledano-Magaña ³, Patricia Radilla-Chávez ³, Nina Bogdanchikova ⁴, Alexey Pestryakov ⁵, Balam Ruiz-Ruiz ⁶ and María Evarista Arellano-García ^{7,*}



Citation: Castañeda-Yslas, I.Y.; Torres-Bugarin, O.; García-Ramos, J.C.; Toledano-Magaña, Y.; Radilla-Chávez, P.; Bogdanchikova, N.; Pestryakov, A.; Ruiz-Ruiz, B.; Arellano-García, M.E. AgNPs Argovit™ Modulates Cyclophosphamide-Induced Genotoxicity on Peripheral Blood Erythrocytes In Vivo. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2096. <https://doi.org/10.3390/nano11082096>

Academic Editors: Alexandru Mihai Grumezescu and Oana Gherasim

Received: 9 July 2021
Accepted: 13 August 2021
Published: 18 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada 22860, Baja California, Mexico; idalia.castaneda@uabc.edu.mx
 - ² Departamento de Ciclo de Vida y Medicina Interna II, Decanato Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Guadalajara, Zapopan 45129, Jalisco, Mexico; oliviatrres@hotmail.com
 - ³ Escuela de Ciencias de la Salud Unidad Valle Dorado, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada 22890, Baja California, Mexico; yanis.toledano@uabc.edu.mx (Y.T.-M.); patyradilla@uabc.edu.mx (P.R.-C.)
 - ⁴ Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ensenada 22860, Baja California, Mexico; nina@cnyu.unam.mx
 - ⁵ Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University, 634050 Tomsk, Russia; pestryakov2005@yandex.ru
 - ⁶ Departamento de Ciencias de la Salud, Unidad Regional Los Mochis, Universidad Autónoma de Occidente, Los Mochis 81223, Sinaloa, Mexico; balam.ruiz@uadeo.mx
 - ⁷ Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada 22860, Baja California, Mexico
- * Correspondence: juan.carlos.garcia.ramos@uabc.edu.mx (J.C.G.-R.); evarista.arellano@uabc.edu.mx (M.E.A.-G.)

Abstract: Silver nanoparticles (AgNPs) have been studied worldwide for their potential biomedical applications. Specifically, they are proposed as a novel alternative for cancer treatment. However, the determination of their cytotoxic and genotoxic effects continues to limit their application. The commercially available silver nanoparticle Argovit™ has shown antineoplastic, antiviral, antibacterial, and tissue regenerative properties, activities triggered by its capacity to promote the overproduction of reactive oxygen species (ROS). Therefore, in this work, we evaluated the genotoxic and cytotoxic potential of the Argovit™ formulation (average size: 35 nm) on BALB/c mice using the micronucleus in a peripheral blood erythrocytes model. Besides, we evaluated the capability of AgNPs to modulate the genotoxic effect induced by cyclophosphamide (CP) after the administration of the oncologic agent. To achieve this, 5–6-week-old male mice with a mean weight of 20.11 ± 2.38 g were treated with water as negative control (Group 1), a single intraperitoneal dose of CP (50 mg/kg of body weight, Group 2), a daily oral dose of AgNPs (6 mg/kg of weight, Group 3) for three consecutive days, or a combination of these treatment schemes: one day of CP doses (50 mg/kg of body weight) followed by three doses of AgNPs (one dose per day, Group 4) and three alternate doses of CP and AgNPs (six days of exposure, Group 5). Blood samples were taken just before the first administration (0 h) and every 24 h for seven days. Our results show that Argovit™ AgNPs induced no significant cytotoxic or acute genotoxic damage. The observed cumulative genotoxic damage in this model could be caused by the accumulation of AgNPs due to administered consecutive doses. Furthermore, the administration of AgNPs after 24 h of CP seems to have a protective effect on bone marrow and reduces by up to 50% the acute genotoxic damage induced by CP. However, this protection is not enough to counteract several doses of CP. To our knowledge, this is the first time that the exceptional chemoprotective capacity produced by a non-cytotoxic silver nanoparticle formulation against CP genotoxic damage has been reported. These findings raise the possibility of using AgNPs as an adjuvant agent with current treatments, reducing adverse effects.



Micronúcleos en Reticulocitos de Ratones Balb/c Tratados de Forma Oral con Nanopartículas de Plata

Castañeda-Yslas I Y¹, Ruiz-Ruiz B¹, Arellano-García M E¹, Juárez-Moreno K²,
Torres-Bugarín O³, Bogdanchikova N², Pestryakov A⁴, Radilla-Chávez P⁵

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, KM. 106 Carr. Tijuana, 22800 idalia.castaneda@uabc.edu.mx, bruiz@uabc.edu.mx,

evarista.arellano@uabc.edu.mx

² Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

³ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara

⁴ Universidad Politécnica de Tomsk, 634050, Rusia

⁵ Escuela de Medicina Ensenada, Universidad Autónoma de Baja California

Autor de correspondencia: Idalia Yazmin Castañeda Yslas, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, KM. 106 Carr. Tijuana, Ensenada, Baja California, México. E-mail: idalia.castaneda@uabc.edu.mx.

Resumen. El estudio de la genotoxicidad en modelos murinos es útil para responder las dudas relacionadas con la seguridad por el uso de nanomateriales, sobre todo cuando se pretende el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad genotóxica de AgNPs Argovit™ a partir de la técnica de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratones, prueba ampliamente utilizada para conocer el potencial genotóxico de diferentes agentes. Las nanopartículas de plata se suministraron en dosis terapéuticas por vía oral (indicadas para perros como tratamiento para el moquillo) durante tres días a un grupo conformado por siete ratones y a otros dos grupos con igual número de ratones se administró respectivamente agua inyectable y arabinosa C. Los especímenes fueron medidos, pesados antes y después del experimento. También se tomaron diariamente muestras de sangre periférica mediante un corte en la punta de la cola para posteriormente realizar extendidos sobre portaobjetos para la prueba de micronúcleos en reticulocitos. Los frotis se fijaron en etanol al 80

% y se tiñeron con anaranjado de acridina para posteriormente leer en 1000 reticulocitos la presencia de

Palabras clave Nanopartículas de Plata; Micronúcleos; Reticulocitos; Genotoxicidad.



Abstract. - *The purpose of this work was to evaluate the genotoxic capacity of AgNPs Argovit™ with the micronucleus technique in mouse peripheral blood reticulocytes. Argovit™ is administered orally in therapeutic doses (indicated for dogs as treatment for distemper) for three days to an experimental group with seven mice. Another two groups with an equal number of mice were administered with injectable water and arabinose C, respectively. The specimens were measured and weighed before and after the experiment. Peripheral blood samples were also taken daily by a cut at the tip of the tail and then extended on slides for micronucleus test in reticulocytes. The smears were fixed in ethanol at 80 % and stained with acridine orange, after that, the presence of micronuclei was identified in 1000 reticulocytes counted by fluorescence microscopy. Preliminary results show significant differences in the number of micronuclei in reticulocytes between the three groups, so its necessary to*

1. Introducción

Las nanopartículas de plata (Ag-NPs) son muy utilizadas en aplicaciones biomédicas. El número de investigaciones sobre la toxicidad de las Ag-NPs va en aumento y poco se ha concluido sobre los factores que inciden en su toxicidad a nivel celular [1, 2], pero sigue persistiendo controversias respecto al entendimiento de las vías del daño en líneas celulares, en lo referente a las pruebas experimentales y el tamaño de las nanopartículas [3]. Desde 2004, las nanopartículas de plata Argovit™ se estudian por su actividad antiviral en contra de rinotraqueítis infecciosa y diarrea viral bovina [4]. Argovit™ usada para el tratamiento de otitis humana mostró remisión de los síntomas y reepitelización de los tejidos [5]. La administración oral en perros de Argovit™ registró una muy alta tasa de recuperación para tratar el moquillo [6]. En pruebas *in vivo* con modelos murinos se probó la eficacia de Argovit™ contra el virus de la fiebre del Rift [7] y en cuanto a su efecto inmunológico, se reveló que no hay efecto tóxico en las células inmunes y los órganos de ratones [8]. Se ha mostrado que las nanopartículas de plata Argovit™, presenta efectos citotóxicos en ocho líneas de células de cáncer e induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [9].

El presente trabajo explora la genotoxicidad de nanopartículas de plata Argovit™, y el antineoplásico arabinosa C. (Ara-C) el cual evita la reparación del ADN y causa citotoxicidad, en contraste con un control de agua. Aquí se presentan los resultados preliminares de estos experimentos que muestran en general una menor genotoxicidad de las AgNPs en comparación con Ara-C.

2. Metodología

Tres grupos de ratones balb/c se usaron para probar el efecto genotóxico mediante la prueba de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratón posterior a la administración de AgNPs de la

marca Argovit™ y el fármaco antineoplásico arabinosa-C.

indujeron menos EPCMN. En los primeros tres días después de tratar a los ratones con AgNPs, se produjeron menos daños incluso que el grupo control al que solo se le administró agua ($p < 0.05$), aunque se advierte un ligero aumento en el día 5 (Fig 1).

2.1 Diseño experimental

21 ratones balb/c de 5-6 semanas de edad, con peso de $\bar{X} = 19.94$ gramos, formaron aleatoriamente 3 grupos de 7 ratones cada uno. Al primer grupo se le administró solamente agua inyectable intraperitonealmente, el segundo se trató con 6mg/kg de Arabinosa-C intraperitoneal y al tercero Argovit™ 6 mg/kg con cánula de alimentación vía oral, estos tratamientos se repitieron por tres días consecutivos. Se prepararon frotis de sangre caudal por duplicado cada día después del segundo día posterior a la aplicación, y se practicó eutanasia al séptimo día [10].

2.2 La probes de micronúcleos

A cada uno de los organismos de cada grupo se le tomó una muestra de sangre diariamente mediante el corte de la punta de la cola a partir de las 48 horas de iniciados los experimentos. Se realizaron dos frotis con la sangre de cada animal y se analizaron para determinar el daño acumulado con el número de reticulocitos con micronúcleo (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC). Para observar el efecto del tratamiento después de 24 a 48 horas post-tratamiento, se toma en cuenta que la presencia de EPCMN demostrarían que existe genotoxicidad reciente (en las últimas 24 horas). Los conteos de diferentes tratamientos se codificaron y se analizaron estadísticamente mediante la prueba H de Kruskal- Wallis.

3. Resultados

Las AgNPs Argovit™ produjeron menos genotoxicidad que el antineoplásico Ara-C ya que

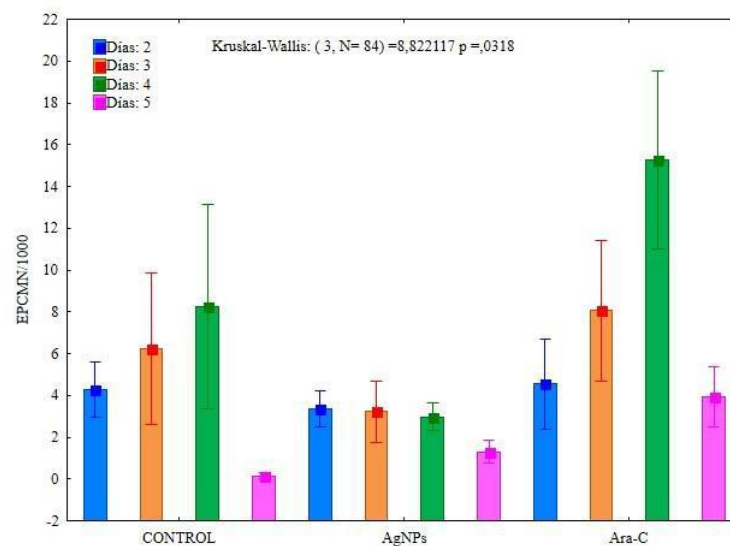


Figura 1. Eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos.

El efecto de la genotoxicidad acumulada se muestra en la figura 2 y conforme a la prueba H de Karuskal-Wallis, las AgNPs Argovit™ no incrementaron significativamente el número de

micronúcleos en 10000 eritrocitos, en comparación con el grupo control. En cambio, el antineoplásico Ara-C, si muestra efectos genotóxicos acumulativos al sexto día de aplicación ($p < 0.05$).

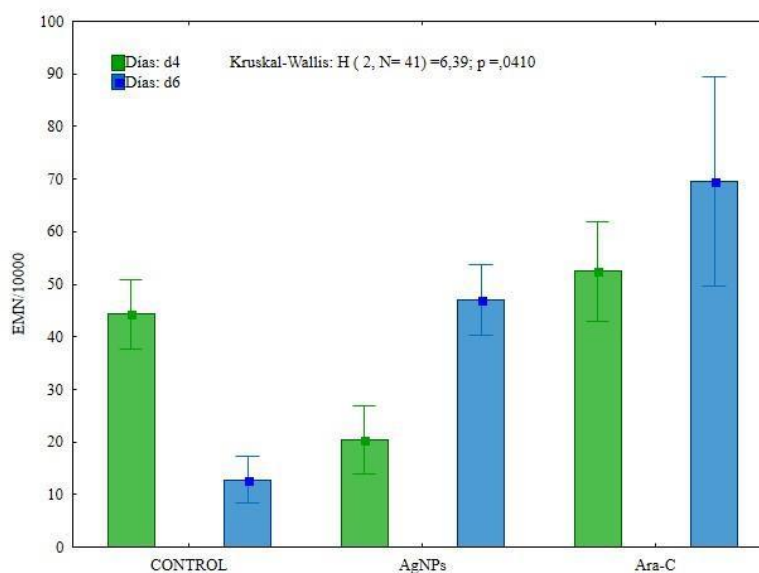


Figura 2. Eritrocitos micronucleados en 10 000 eritrocitos totales.

4. Conclusiones

La administración de Arabinosa-C produce mayor genotoxicidad, ya que causa daños morfológicos en el núcleo y fragmentación en el ADN, que pueden atribuirse a la formación de especies reactivas de oxígeno.

De acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis los resultados indican que el fármaco Ara-C induce mayor genotoxicidad que las AgNPs después de 24 horas de administrarlas, al igual que el efecto acumulativo después de 5 días de aplicación. Aunque

Referencias

- [1] B. Nowack, H. F. Krug, y M. Height, “120 years of nanosilver history: Implications for policy makers”, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, núm. 4, pp. 1177–1183, 2011.
- [2] L. Ge, Q. Li, M. Wang, J. Ouyang, X. Li, y M. M. Q. Xing, “Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity”, *International Journal of Nanomedicine*, vol. 9, núm. 1, pp. 2399–2407, 2014.
- [3] Y. Li *et al.*, “Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay”, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 745, núm. 1–2, pp. 4–10, 2012.
- [4] A. G. Glotov, T. I. Glotova, A. A. Sergeev, T. V. Belkina, y A. N. Sergeev, “[Antiviral activity of different drugs in vitro against viruses of bovine infectious rhinotracheitis and bovine diarrhea]”, *Vopr. Virusol.*, vol. 49, núm. 5, pp. 43–46, 2004.
- [5] F. V. Semenov y K. M. Fidarova, “[The treatment of the patients presenting with chronic inflammation of the trepanation cavity with a preparation containing silver nanoparticles following sanitation surgery of the open type]”, *Vestn. Otorinolaringol.*, núm. 6, pp. 117–119, 2012.
- [6] N. Bogdanchikova *et al.*, “Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs”, *Int. J. Nanotechnol.*, vol. 13, núm. 1/2/3, p. 227, 2016.
- [7] B. Borrego *et al.*, “Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo”, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol.*

estos resultados son preliminares se advierte, como se esperaba, que las AgNPs Argovit™ en las concentraciones probadas son potencialmente no genotóxicas para este modelo de ratón. Lo que ofrece las primeras evidencias de la seguridad toxicológica de las AgNPs Argovit™.

Agradecimientos: a todas las instituciones involucradas, así como a los proyectos PAPIIT-UNAM IT200114, Proyecto CONACYT 270242, Proyecto del CONACYT de Redes No. 293417. En especial Vector-Vita Ltd., por proporcionar las nanopartículas de plata.

- Med.*, vol. 12, núm. 5, pp. 1185–1192, 2016.
- [8] O. V. Kalmantaeva *et al.*, “Silver-nanoparticle exposure on immune system of mice depending on the route of administration”, *Nanotechnologies Russ.*, vol. 9, núm. 9–10, pp. 571–576, 2014.
 - [9] K. Juárez-Moreno *et al.*, “Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines.”, *Hum. Exp. Toxicol.*, p. 960327116675206, 2016.
 - [10] Committee, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. 2011.

Anexo 4

Abreviaturas

CP: Ciclofosfamida.

Ara-C: Citosina arabinosa.

EPC: Eritrocitos policromáticos o reticulocitos.

EMN: Eritrocitos micronucleados.

EPCMN: Eritrocitos policromáticos micronucleados.

EN: Eritrocitos normocromáticos.

MN: Micronúcleos.

MNESP: Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica.

ET: Eritrocitos totales.

AgNPs: Nanopartículas de plata.

PVP: Polivinilpirrolidona.

nm: Nanometros.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SEM: Microscopia por escaneo de electron.

XRD: Difracción de rayos X.

TEM: Microscopia electrónica de transmisión.

EDX: Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva.

i.p.: Inyección intraperitoneal.

h: Horas.

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

CDKI: Proteína inhibidora de la quinasa dependiente de ciclina.

CDK2: Cinasa dependiente de ciclina 2.