

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE ODONTOLÓGIA TIJUANA

COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Oficio No. 52/2014-2

H. COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PRESENTE:

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo de tesis: "**Evaluación de los efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de Plata Argovit[®], en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos**", que para aspirar al Grado de Maestro en Ciencias de la Salud.

Fue propuesto por la **C. NAYELI GUADALUPE GIRÓN VÁZQUEZ**

Después de ser revisado y habiendo cumplido con todos los requisitos establecidos, se decide aprobarlo para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

Tijuana Baja California, a 2 de Septiembre de 2014

"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

ATENTAMENTE



DRA. MARÍA EVARISTA ARELLANO GARCÍA

Director de tesis

Presidente del Comité

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Oficio No. 52/2014-2

H. COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PRESENTE:

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo de tesis: **"Evaluación de los efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de Plata Argovit[®], en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos"**, que para aspirar al Grado de Maestro en Ciencias de la Salud.

Fue propuesto por la **C. NAYELI GUADALUPE GIRÓN VÁZQUEZ**

Después de ser revisado y habiendo cumplido con todos los requisitos establecidos, se decide aprobarlo para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

Tijuana Baja California, a 2 de Septiembre de 2014
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"
ATENTAMENTE



DRA. NINA BOGDANCHIKOVA
Co-Director de tesis
Sinodal de Tesis
Miembro del Comité

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Oficio No. 52/2014-2

H. COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PRESENTE:

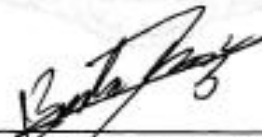
Por medio del presente, me permito informar que el trabajo de tesis: "**Evaluación de los efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de Plata Argovit®, en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos**", que para aspirar al Grado de Maestro en Ciencias de la Salud.

Fue propuesto por la **C. NAYELI GUADALUPE GIRÓN VÁZQUEZ**

Después de ser revisado y habiendo cumplido con todos los requisitos establecidos, se decide aprobarlo para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

Tijuana Baja California, a 2 de Septiembre de 2014
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"
ATENTAMENTE



M.C. BÁLAM RUÍZ RUÍZ
Sinodal de Tesis
Miembro del Comité



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



“EVALUACIÓN DE EFECTOS CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS DE LAS
NANOPARTÍCULAS DE PLATA ARGOVIT® EN CULTIVOS *IN VITRO* DE
LINFOCITOS HUMANOS”

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta

NAYELI GUADALUPE GIRÓN VÁZQUEZ

Aprobado por

DRA. MARÍA EVARISTA ARELLANO GARCÍA
Director de tesis
Presidente del Comité

DRA. NINA BOGDANCHIKOVA
Co-Director de Tesis
Sinodal
Miembro del Comité

M.C. BALAM RUIZ RUIZ
Sinodal
Miembro del Comité

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA. SEPTIEMBRE DE 2014.

DEDICATORIA

A TÍ, por permitirme vivir y ser parte de tu plan infinito...

Al Padre Robert Conroy...

A mis padres...

A mis hermanas preciosas...

A la Dra. Evarista Arellano...

Al Sr. Juan y la Sra. Leticia...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de la beca durante estos dos años. Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por su apoyo en el Proyecto de Innovación Tecnológica de PAPIIT-UNAM IT200311-3 “Desarrollo, aplicación y transferencia tecnológica de materiales en base de nanopartículas de Au y Ag activos en catálisis, medicina, veterinaria y agricultura”.

Agradezco también a la Dra. Nina Bogdanchikova por proporcionarme las nanopartículas de Plata Argovit®, por apoyarme con los materiales para la realización de este trabajo y por sus importantes observaciones en el desarrollo de este trabajo. Al M.C. Balam Ruíz Ruíz por sus sabios consejos y por su ayuda en la metodología de la técnica. A la Dra. Oksana Martynyuk, por su ayuda en la preparación de las nanopartículas y por sus indicaciones sobre el cuidado y manejo de las nanopartículas de Plata Argovit®. Y, también quiero agradecer especialmente a la Dra. Evarista Arellano por acogerme como su alumno y tesista, por sus sabios consejos tanto en el aspecto profesional como en lo personal, por enseñarme pacientemente y por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta tesis.

A la Red de Nanoplata Argovit, por transmitirme su interés en la aplicación de la ciencia y en desarrollo tecnológico.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California por prestar las instalaciones para el desarrollo del proyecto.

A todo el cuerpo técnico del Almacén de la Facultad de Ciencias Marinas.

También quiero agradecer a mis padres por apoyarme siempre y, a mis hermanas Cecilia Girón y Alejandra Girón, por acompañarme “online” mientras estaba en el laboratorio trabajando.

Quiero agradecer a mi sobrinito Javier Girón Aponte por sus sabias preguntas y por su ayuda para traducir la tesis al idioma “Hormiga”.

A mis súper amigos y colegas, Rosario Andrade, por su amistad, por su tolerancia y su imperturbable paciencia conmigo y por acompañarme en nuestras escapadas del trabajo. A Roberto Vázquez, por su amistad, sus consejos metodológicos, nuestras pláticas científico-café y a Ana Marina Jiménez, por su amistad, su entusiasmo, sus visitas, las reuniones de café y nuestras pláticas tan profundas e interesantes.

A mis amigos generacionales, Erika Vildosola, Iván Rentarí y Elías Torres por sus interesantes pláticas, enseñanzas y por nuestras incansables reuniones de estudio.

A Patricia García por sus gratas visitas al laboratorio y al Ing. Roberto Luna, por su interés en el desarrollo de este proyecto.

A todos mis maestros y compañeros de generación, por sus enseñanzas y por el aporte cultural de sus investigaciones.

A mi Eureka preciosa, mi perrosaurio hermosa, por hacerme compañía en esas noches largas de trabajo.

Y, a todos aquellos que contribuyeron al desarrollo y finalización de esta tesis.

RESUMEN

La Plata es conocida desde la antigüedad por su efecto antibacteriano, antifúngico y antiviral, en la actualidad, se utiliza nanoplata en la fabricación de insumos para el área médica, la industria alimenticia, textil, electrónica, entre otros, debido a sus propiedades antisépticas, sin embargo, la información acerca de la seguridad toxicológica en seres humanos no es concluyente.

La citotoxicidad y la genotoxicidad determina el impacto que los distintos agentes físicos, químicos o biológicos pueden tener sobre el material genético y las funciones de las células, lo cual es potencialmente derivable en mutaciones que podrían tener efectos adversos a nivel celular, de individuo y/o su descendencia. En el caso de las nanopartículas de Plata, la toxicidad en los seres humanos es un aspecto trascendente, y es necesario determinar las rutas de exposición, así como los mecanismos de acción de las nanopartículas de plata y los factores relacionados que puedan provocar efectos adversos en la salud.

En los últimos años, diversas investigaciones han demostrado la toxicidad de las nanopartículas de plata de manera parcial, no obstante, persiste el vacío respecto al entendimiento del mecanismo de toxicidad en líneas celulares y cultivos primarios, su relación con las propiedades físico-químicas de las nanopartículas de plata, así como las pruebas experimentales utilizadas.

Los resultados del presente estudio indican que no existen cambios significativos en la proliferación celular y la frecuencia de micronúcleos en linfocitos binucleados de individuos saludables, en contraste con otros estudios de toxicidad publicados.

ABSTRACT

Silver has been known since ancient times for its antibacterial, antifungal and antiviral effect, actually, nanosilver is used on manufacturing of products for medical supplies, food industry, textile, electronics, among others, due to its antiseptic properties, however, the information about toxicological safety in humans is unclear.

The cytotoxicity and genotoxicity determines the impact of physical, chemical or biological agents may have influence on genetic material and specialize functions of cells, which is potentially derivable in mutations that may have effects at the cellular level, of individual and / or their offspring. For silver nanoparticles, toxicity in humans is a transcendent aspect, and it is necessary to determine exposure pathways and mechanisms of action of silver nanoparticles and related factors that may cause adverse effects in health.

In recent years, several studies have demonstrated the toxicity of silver nanoparticles in part, however, the gap persists regarding the understanding of the mechanism of toxicity in cell lines and primary cultures, their relationship to the physicochemical properties of silver nanoparticles and the experimental tests used.

The results of this study show no significant changes in cell proliferation and frequency of micronuclei in binucleated lymphocytes of healthy individuals, in contrast to other published toxicity studies.

INDICE

	Página
DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
DISCUSIÓN GENERAL	60
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS	66
ANEXOS: Dictamen de aprobación del protocolo por el Comité de Bioética	73
ANEXOS: Carta de Consentimiento Informado.	75
ANEXOS: Cuestionario de estilos de vida y frecuencia diaria de alimentos.....	76
ANEXOS: Escenarios de cultivos, valor de Kruskal-Wallis (H), P, concentración y media del Índice de proliferación celular por cada 500 células contadas.	81
ANEXOS: Escenarios de cultivos, valor de Kruskal-Wallis (H), P, concentración y media de de la Frecuencia del Número de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas.	82
ANEXOS: Fotografías de daños genotóxicos en linfocitos binucleados.	83

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Concentraciones de Arsenito de Sodio, Selenito de Sodio, Nanopartículas de Plata Argovit®, Selenito de Sodio/Nanopartículas de Plata Argovit® y Arsenito de Sodio/Nanopartículas de plata Argovit®.	31
Tabla 2. Escenarios de los cultivos, con el respectivo valor de Kruskal-Wallis (H), valor de P, concentración y la media del Índice de proliferación celular por cada 1000 células binucleadas.	81
Tabla 3. Escenarios de los cultivos, con el respectivo valor de Kruskal-Wallis (H), valor de P, concentración y la media de la Frecuencia del Número de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas.	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Índice de proliferación celular por cada 500 células viables contadas en los tratamientos Nanopartículas de Plata Argovit®, en orden de concentración.	43
Fig. 2. Índice de proliferación celular por cada 500 células viables contadas de los tratamientos de Selenito de sodio, en orden de concentración.	45
Fig.3. Índice de Proliferación celular por cada 500 células viables contadas de los diferentes tratamientos de arsenito de sodio, en orden de concentración.	46
Fig. 4. Índice de Proliferación celular por cada 500 células viables contadas de los diferentes tratamientos de Nanopartículas de plata y Selenito de Sodio, en orden de concentración.	48
Fig. 5. Proliferación celular por cada 500 células viables contadas de los diferentes tratamientos de Nanopartículas de plata y Arsenito de sodio, en orden de concentración.	50
Fig. 6. Frecuencia de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Nanopartículas de plata Argovit, en orden de concentración.	52
Fig. 7. Frecuencia de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Selenito de sodio, en orden de concentración.	54
Fig. 8. Frecuencia de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Arsenito de sodio, por orden de concentración.	55
Fig. 9. Frecuencia de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Selenito de sodio y Nanopartículas de plata, por orden de concentración..	57
Fig. 10. Frecuencia de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Arsenito de sodio y Nanopartículas de plata, por orden de concentración.	59
Fig. 11. Linfocito binucleado. 100X	83
Fig.12. Linfocito binucleado. 100X	83
Fig. 13. Linfocito mononucleado. 100X	83
Fig. 14. Linfocito tetranucleado. 100X	83
Fig. 15. Linfocitos en cultivo. 10X	84
Fig. 16. Linfocitos en cultivo. 10X	84
Fig. 17. Linfocito binucleado con micronúcleo. 100X	84
Fig. 18. Linfocito mononucleado con yema nuclear (bud). 100X.	84

Fig. 19. Linfocito binucleado con puente de cromatina. 100X.	84
Fig. 20. Linfocito binucleado con yema nuclear (bud). 100X.	84
Fig. 21. Linfocito binucleado con yema nuclear (bud). 100X	84
Fig.22. Linfocito binucleado con yema nuclear (bud). 100X	84
Fig. 23. Linfocito mononucleado con yema nuclear. 100X.	84
Fig. 24. Linfocito binucleado (izq. arriba), mononucleado con yema nuclear (bud) (der. arriba), mononucleado (der. abajo).	84
Fig.25. Linfocito binucleado con yemas nucleares (buds).	84
Fig.26. Linfocito en apoptosis. 100X	84

INTRODUCCIÓN

La investigación y el desarrollo de productos basados en nanopartículas se incrementa año con año. Debido a los distintos usos y aplicaciones de las nanopartículas (Chaloupka *et al.* 2010), existe preocupación acerca de los efectos que los nanomateriales pudieran tener tanto en el medio ambiente como en la salud, especialmente en el caso de las nanopartículas de Plata (NPsAg), dada su difundida capacidad antimicrobiana (de Lima *et al.* 2012).

Existen estudios que han tratado de demostrar los efectos tóxicos de las nanopartículas de Plata (NpsAg), sin embargo, hasta el momento no se han encontrado investigaciones que prueben dichos efectos de manera concluyente (Stensberg *et al.* 2011). Actualmente el conocimiento de cómo interactúan las nanopartículas de plata y cómo producen toxicidad en líneas celulares de mamíferos es muy limitado.

Algunos autores proponen que el tamaño y el ligando de las nanopartículas, así como las líneas celulares utilizadas tienen influencia en la toxicidad de las nanopartículas de Plata. Las investigaciones recientes sugieren que el mecanismo de toxicidad de las nanopartículas de Plata involucran principalmente, una disrupción en la cadena respiratoria en la mitocondria provocando especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) e impidiendo la síntesis de ATP, lo cual produce daño al DNA (Kim *et al.* 2010).

En el presente trabajo se demuestra la baja capacidad de citotoxicidad y genotoxicidad de las nanopartículas de Plata Argovit®, además de los efectos producidos por sales de Arsénico y Selenio en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

ANTECEDENTES

Desde la antigüedad, la Plata se ha conocido por ser un potente agente antibacteriano, antifúngico y antiviral. Según el reporte en 2010 de la Environmental Protection Agency (EPA, por sus siglas en inglés) a lo largo de la historia, la Plata y sus compuestos se han utilizado ampliamente para muchas aplicaciones, como resultado de sus propiedades útiles. La evidencia arqueológica sugiere que las civilizaciones han utilizado la Plata por lo menos 3000 años antes de Cristo.

Los antiguos egipcios y persas usaban recipientes de Plata para mantener el agua limpia y segura. Romanos y griegos conocían su potente efecto bactericida y lo utilizaron para curar heridas. Por otra parte, durante la Primera Guerra Mundial, los compuestos de Plata se usaban para prevenir la infección de las heridas antes de la aparición de los antibióticos. En el viejo oeste americano, los pioneros de viaje a lo largo de senderos de Oregon colocaban monedas de plata en sus barriles de almacenamiento de agua para mantener el agua fresca.

Durante el siglo XIX, más allá de los remedios caseros, la plata se aplicó en la práctica médica, para el tratamiento de enfermedades oculares y el tratamiento de úlceras de la piel.

En los Estados Unidos de América, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó las soluciones de Plata en la década de 1920 para ser utilizados como agentes antibacterianos.

Actualmente, la Plata se utiliza en la fabricación de prótesis óseas, implantes cardíacos, las válvulas de reemplazo, en agujas utilizadas en la cirugía ocular, catéteres peritoneales, sutura de heridas, cicatrización de quemaduras y como ingrediente antiséptico debido a su amplio espectro de toxicidad para las bacterias, así como a su limitada toxicidad para los seres humanos.

Por otra parte, la nanoplata se usa en productos para el envasado de alimentos, suplementos alimenticios, textiles, electrónica, electrodomésticos, cosméticos, dispositivos médicos, desinfectantes de agua, y los aerosoles de las

habitaciones, se usan en tazas, tazones y tablas de cortar, productos de cuidado personal, productos sanitarios, pulverizadores de habitación, los juguetes de los niños, productos infantiles y de salud (Fauss, 2008). Sin embargo, según el reporte de la EPA en 2010, el seguimiento de los productos que contienen nanoplasta puede llegar a ser difícil porque los productos son casi siempre empacados bajo marcas numerosas, y la normativa vigente sobre el etiquetado no requiere que el nanomaterial aparezca como un ingrediente, por lo que existe preocupación a nivel mundial sobre la toxicidad y los posibles efectos a la salud y al ambiente por el uso de estos nanomateriales.

Los principios básicos sobre la toxicología establecen que la toxicidad es la capacidad de que agentes físicos, químicos o biológicos tengan efectos adversos en un individuo o a nivel celular. La toxicología engloba dos grandes grupos de estudio que incluyen la genotoxicidad, que es el daño genético (mutaciones, daño cromosomal o errores de recombinación) provocados por algún agente físico, químico o biológico que tenga contacto con el material genético de las células (FDA, 2012; IARC, 2012); y la citotoxicidad, que es la capacidad de agentes físicos, químicos o biológicos de alterar las funciones basales y/o funciones especializadas de las células (Ekwall *et al.*, 1990).

En tanto al uso de los nanomateriales esto genera un campo emergente que trabaja estableciendo el peligro de las nanopartículas y su riesgo potencial, la toxicología de las nanopartículas o la nanotoxicología (Love *et al.* 2012), la cual se dedica al estudio del potencial impacto tóxico de las nanopartículas en sistemas biológicos en función de las propiedades físico químicas que presentan estos nanomateriales.

En lo que respecta a los nanomateriales, estos consisten en uno o más de sus componentes que se presentan en varias de sus formas y poseen al menos una estructura dimensional de un diámetro entre 1 a 100 nanómetros (Albanese *et al.* 2012). Los nanomateriales, incluyendo las nanopartículas y nanofibras, son categorizados dentro de cuatro clases, las cuales incluyen a los materiales basados en carbón, materiales basados en metales (puntos cuánticos, nanoplasta y nano-oro),

dendrimeros (polímeros nano) y otros compuestos. Entre algunas de sus características figuran la durabilidad, alta conductibilidad y reactividad (Chen-Ten Ng *et al.* 2010) y son usados en muchos productos comerciales y en prácticas industriales.

De entre los nanomateriales, las nanopartículas de Plata (NPsAg) y las nanopartículas de Oro (NPsAu) son algunas de las nanopartículas más comercializadas y ampliamente usadas en productos de consumo. Sus aplicaciones se han extendido dentro del campo biomédico y de salud, particularmente en los sistemas de imagen médica y diagnosis, farmacéutica, entrega de droga y terapias. Donde las NPsAg destacan por sus cualidades antimicrobianas (Cheng-Ten Ng, 2010; Xu *et al.*, 2012).

Respecto a las nanopartículas de Plata, según Rosarin & Mirunalini (2011), éstas se clasifican en diferentes tipos: los coloides de Plata, Nanoxact, PlataBiopura, Plata de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE, por sus siglas en inglés), Plata personalizada y nanopartículas de Plata. De los cuales el Nanoxact son formulaciones esféricas de Plata, que son no agregados de nanopartículas esféricas suspendidas en agua; la Plata biopura que es una formulación de alta concentración que ha sido ampliamente purificada para eliminar los reactivos residuales; la Plata de la OCDE, la cual es recomendada ya que su formulación ha sido seleccionada con estándares de nanotoxicología utilizando como ligando de las nanopartículas la PoliVinil Pirrolidona (PVP) y superficies de citrato que son inocuas para el ser humano; la Plata personalizada, que puede ser producida con concentraciones personalizadas, carga y cubiertas biofuncionalizadas y, finalmente, las nanopartículas de Plata, que tienen altas eficiencias ópticas y pueden ajustarse para interactuar con la longitud de onda que van desde 550 nm a 950 nm. Estos tipos de nanopartículas pueden ser sintetizados por la reducción química, la síntesis solvotermal, sol técnica de gel, ablación con láser y biosíntesis, y son caracterizadas con espectrofotómetro de luz ultra violeta visible, microscopía por escaneo de electrón (SEM), difracción de rayos X (XRD) para establecer los criterios que deben de cumplir los nanomateriales.

Toxicidad de las nanopartículas de plata

Respecto a la toxicidad de las nanopartículas de Plata, diversas investigaciones han demostrado que son tóxicas en animales acuáticos, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), aberraciones cromosómicas, formación de micronúcleos, sobreexpresión de p53, necrosis, apoptosis, entre otros daños. No obstante, sigue persistiendo un vacío y controversia respecto al entendimiento de las vías del daño en líneas celulares, en lo referente a las pruebas experimentales y el tamaño de las nanopartículas.

Estudios *in vitro* revelan que las NPsAg podrían causar fuerte toxicidad en un amplio espectro de células, como en células madre germinales, células madre mesenquimales, células BRL 3A de hígado de rata, células NIH3T3, células humanas de hepatoma HepG2, células humanas normales de fibroblasto de pulmón, células humanas de glioblastoma U251, células humanas normales de epitelio bronquial BEAS-2B y células HeLa. Además, de tener el potencial de inducir genes asociados con la progresión del ciclo celular, daño al DNA y apoptosis en células humanas a dosis no citotóxicas (Xu *et al.*, 2012; Ahamed *et al.*, 2010).

Xu y colaboradores (2012) probaron la genotoxicidad de NPsAg en hidrogel usando el Ensayo de Micronúcleos por Bloqueo de Citocinesis (CBMN, por sus siglas en inglés), y analizando rutas GO, encontrando que se expresaron y se apagaron miles de genes en células HeLa a las 48 horas de exposición, mientras que los análisis de rutas GO sugirieron 14 rutas teóricas activas de señalización para genes sobre-expresados y 3 para genes no expresados, además de inducir micronúcleos a nivel celular. Los autores sugirieron que las rutas de señalización de los balances entre la respuesta anti-ROS y el daño al DNA, la inestabilidad cromosomal y la inhibición de mitosis podría jugar un importante rol en la toxicidad de NPsAg.

Por otra parte, AshaRani y colaboradores (2009) descubrieron actividad anti proliferativa en células humanas normales de fibroblasto (IMR-90) y células humanas de glioblastoma (U251) al exponerlas a NpsAg, presentando inestabilidad

cromosomal y arresto mitótico. Sugieren que las NPsAg pueden estar actuando a través del calcio transitorio en la célula o provocando aberraciones cromosomales, interviniendo directamente o a través de la activación de enzimas catabólicas, además de proponer que la cascada de señalización juega un rol importante en las deformaciones del citoesqueleto y por lo tanto inhibe la proliferación celular.

Igualmente, en 2012 Ghosh *et al.*, demostraron la genotoxicidad *in vitro* en linfocitos humanos aplicando distintas concentraciones de NPsAg, en donde revelan que a una concentración de 25 µg/mL pueden causar genotoxicidad.

Respecto a la especies reactivas de oxígeno (ROS) y las NPsAg, Foldbjerg *et al.* (2009) demostraron que monocitos humanos THP-1 tratados con iones de Ag y NPsAg cubiertos con PoliVinilPirrolidona (PVP) presentan inducción de apoptosis y necrosis dosis y tiempo dependiente.

Posteriormente, en 2011, Greulich *et al.* estudiaron las respuestas celulares específicas en células mononucleares de sangre periférica de humanos con NPsAg (monocitos CD14+ y células T CD3+), proporcionando la primera evidencia de una respuesta celular específica provocada por la absorción de NPsAg en células mononucleares de sangre periférica, afirmando que las respuestas celulares después de la exposición dependen del subtipo de células, ya que, en contraste a los linfocitos, los monocitos son capaces de acumular NPsAg, por lo tanto, la cantidad de plata intracelular claramente desencadena la activación de los monocitos a través de la liberación de iones de Ag y la subsecuente generación de ROS.

Otros estudios realizados por Li *et al.* (2012) en donde evaluaron la genotoxicidad de NPsAg usando el Ames Test y el Ensayo de Micronúcleos en Salmonella y células de linfoblastoide humano TK6, demostraron que en Salmonella no se incrementó la frecuencia de mutantes, sin embargo, en las células TK6 la frecuencia de micronúcleos aumentó en dosis dependiente, hasta 3.17 veces más, con un incremento de 1.60% de frecuencia de micronúcleos, sugiriendo que el ensayo *in vitro* de micronúcleos puede ser más apropiado que el Ames Test para evaluar la genotoxicidad de NPsAg, ya que el ensayo detecta pequeños fragmentos de DNA unidos a la membrana nuclear (micronúcleos), en el citoplasma de células en

interfase, ya que de esta manera miden la clastogenicidad (rompimiento de cromosomas) y la aneugenicidad (cambios en el número de cromosomas) para químicos en células que han estado bajo división celular durante o después de una exposición.

Los autores indican que existen diferentes experimentos *in vitro* para genotoxicidad de NpsAg, sin embargo, señalan que los resultados entran en conflicto con otros métodos usados, los materiales de las pruebas, y otras condiciones, como la limitación de los agentes y de la aglomeración/agregación de las partículas.

Por lo que Singh *et al.* (2009) plantean que hay diferentes estudios que han demostrado la citotoxicidad de NPsAg, pero los reportes de su habilidad para promover el estrés oxidativo se encuentran en conflicto y hay carencia de información de su potencial genotóxico.

A pesar de ello, cada vez se suman las investigaciones que demuestran que las NPsAg podrían inducir toxicidad *in vivo* bajo una variedad de condiciones de exposición incluyendo inhalación, absorción oral, y por vía hipodérmica de inyección.

Por su parte, Cheng-Ten y colaboradores en 2010, citan experimentos realizados en ratones en donde encontraron que la administración a altas dosis de NPsAg administrada por 28 días producía daño al hígado pero no presentaba genotoxicidad de manera significativa en eritrocitos y médula ósea, no obstante, estudios realizados en plantas demostraron el daño en el DNA debido a errores en la división celular.

Los estudios realizados por Li *et al* (2010), mostraron que en ratas que inhalaban NPsAu dichas partículas se acumulaban significativamente en los pulmones y podían ser detectadas en otros órganos semanas después. Y, aplicándolas vía intravenosa, se acumulan en el hígado y riñones, proponiendo que el modo de acción genotóxico de las NPs es la habilidad de funcionalizar los péptidos que a su vez tienen la capacidad de entrar al núcleo a través de los poros nucleares, como es el caso de los nanotubos de carbón.

Sin embargo, estudios realizados por Kim *et al.* (2011) para demostrar la genotoxicidad de NPsAg después de 90 días de exposición por inhalación en ratas, señalaron que no hubo diferencias estadísticas significativas en el número de micronúcleos en eritrocitos policromáticos o en el radio de eritrocitos policromáticos entre el total de eritrocitos después de la exposición (que son pruebas para medir la citotoxicidad y genotoxicidad de sustancias), sugiriendo que la inhalación de NpsAg por 90 días no induce genotoxicidad en medula ósea *in vivo*. No obstante, mencionan que existe una dosis dependiente respecto a la depositación de NPsAg y que estos nanomateriales fueron encontrados en sangre, estomago, cerebro, hígado, riñones, pulmones y testículos, indicando que las NPsAg fueron distribuidas en los tejidos.

Singh y colaboradores (2009), expresan que para estudios de citotoxicidad y genotoxicidad solo una de las pruebas es usada, lo cual es problemático porque los tests miden distintos aspectos, así que la respuesta positiva será dependiente del test y las sustancias que se utilicen. También refieren al peso ponderado respecto al ensayo cometa, ya que aunque dicha prueba mide altos niveles de daño porque detecta puntos de rompimiento de DNA que son reparables, la prueba de micronúcleos posee un mayor peso en alusión a la genotoxicidad, porque el daño medido permanece después de la división celular y esto proporciona más información acerca de los errores que permanecen sin reparar.

De igual manera, en 2011 Li y colaboradores, indican que existe conflicto con los estudios en los que la dosis es tolerada de manera distinta y que la diferencia pudiera ser en el tamaño de NPsAg usadas y, en ocasiones, por los diferentes tipos de líneas celulares, ya que tienen respuestas genotóxicas distintas. Ellos demostraron que la dosis- respuesta incrementa el número de micronúcleos a 25µg/mL.

Apoyando este tipo de hipótesis, Foldbjerg *et al.* (2009), señalan que la medida y la composición química de las NPsAg son propiedades de gran importancia cuando se evalúa la nanotoxicidad y que esto ha sido reportado en otros estudios comparativos.

Además, existen conflictos acerca de las líneas celulares utilizadas, ya que estudios realizados por Arora *et al.* (2009) con interacciones de NPsAg, fibroblastos primarios y células de hígado de ratón aisladas de los tejidos diana, son deseables para las pruebas de citotoxicidad, simulando la situación *in vivo* más de cerca, ya que la morfología de los fibroblastos primarios y las células de hígado no presentaron alteraciones por arriba de 25 µg/mL y 100 µg/mL de NpsAg., en comparación con las líneas celulares secundarias. Los autores señalan que las líneas celulares establecidas son fáciles de mantener y son preferidas para la mayoría de estudios toxicológicos por su mejor reproducibilidad de los datos. Sin embargo, es cuestionable que tan adecuado es utilizar líneas celulares establecidas como células blanco con respecto a la relevancia clínica de los datos derivados de estudios *in vitro*.

Nymark *et al.* en 2012, publicaron que la genotoxicidad de NPsAg cubiertas de PoliVinilPirrolidona en células BEAS 2B (células humanas de epitelio bronquial), produce dosis dependencia después de 4 hrs de exposición con NPsAg, sin embargo, no hubo inducción de micronúcleos en ninguna de las dosis o tiempos asignados. Los autores sugieren que la falta de inducción del daño a cromosomas por las NPsAg cubiertas con PVP es debido a la cubierta, la cual pudiera proteger a las células de una interacción directa con las NPsAg, ya sea por la reducción de lixiviación de iones de las partículas o por una gran acumulación de NPs, con una posible reducción de la absorción celular.

Además, indican junto con otras investigaciones, que la toxicidad de las NPsAg puede ser explicada por una combinación de los efectos de la talla, la cubierta, la solubilidad, y las tasas de absorción por la aglomeración en tamaño micro en el medio de exposición. Con sus NPsAg probaron que estaban neutralizadas por los constituyentes del medio de exposición, ya que la mayoría de las NPsAg solo tenía ligera carga negativa. Esto pudiera afectar su absorción por las células BEAS 2B. Sin embargo, aunque las NPsAg cubiertas con PVP, como las que estudiaron, no fueran capaces de inducir daño cromosomal permanente en células bronquiales humanas, hay muchas evidencias de pruebas de clastogenicidad y aneugenicidad de NPsAg en otros tipos de líneas celulares.

Desde el punto de vista ambiental, el conocimiento de los métodos de síntesis de nanomateriales de plata es importante, ya que las características y morfologías de las nanopartículas de Plata proporcionan información para la evaluación de su destino ambiental del transporte, y la toxicidad.

Una vez liberadas en el ambiente, la movilidad, la biodisponibilidad y la toxicidad de las nanopartículas de plata en cualquier ecosistema está en gran parte determinada por la estabilidad coloidal que posean. La estabilidad coloidal está determinada por muchos factores, incluyendo el tipo de agente de protección terminal, las características del medio circundante, tales como el pH, la fuerza iónica, la presencia / ausencia de ácidos húmicos y otros ligandos, y la composición de electrolito de fondo (EPA, 2010). Y, aunque numerosos estudios han investigado el efecto de las propiedades de la superficie sobre la estabilidad coloidal de nanopartículas en diversas condiciones ambientales, hay poca información disponible en lo que respecta a las nanopartículas de plata.

En el caso de los seres humanos, la toxicidad de las nanopartículas de Plata es un aspecto trascendente, ya que primero se deben de determinar las rutas de exposición (por inhalación, exposición oral, tópico o por contacto con productos que contengan estos materiales), así como la forma de acción de las nanopartículas de plata y los factores relacionados que puedan provocar efectos adversos en la salud.

Uno de los riesgos potenciales al usar productos con Plata o nanoplata, es que estos compuestos sean absorbidos por el sistema circulatorio, depositándose en los tejidos, produciendo Argiria, que es una enfermedad que se caracteriza por la pigmentación grisácea de la piel y las mucosas. Además, de que las nanopartículas de Plata podrían depositarse en órganos como el hígado y los riñones.

A pesar de las diversas investigaciones sobre la toxicidad de las nanopartículas de Plata, las respuestas celulares son variadas, por lo que los resultados son ambiguos. Además, los efectos en la salud provocados por el contacto o consumo de este tipo de nanomateriales, no se conocen aún, por lo que es necesario la evaluación de los efectos nocivos en los seres humanos, los efectos en el ambiente, las rutas de exposición, los mecanismos de acción y la forma en que los

individuos, células o el ambiente contrarresten los efectos que se puedan generar debido al uso o contacto con nanopartículas de plata.

En el caso del Arsénico, se conoce que tiene propiedades químicas y físicas intermedias entre un metal y un no metal, y es frecuentemente catalogado como un metaloide o semi-metal. Puede existir en cuatro estados de oxidación, dentro de los cuales se incluye el Arsenito de Sodio (IARC, 2012). Desde la perspectiva biológica y toxicológica, hay tres grandes grupos de los compuestos de arsénico: los compuestos inorgánicos de Arsénico, compuestos orgánicos de Arsénico y gas Arsina. Los compuestos inorgánicos de Arsénico; el Trióxido de Arsénico (TOA), Arsenito de sodio y Tricloro Arsénico, son las formas trivalente más comunes.

El Arsénico y los compuestos de Arsénico han sido producidos y usados en productos farmacéuticos, preservativos de madera, químicos para la agricultura y para aplicaciones en la minera, metalurgia, fabricación de vidrio y las industrias de semiconductores. Además, el Arsénico fue usado con fines medicinales en la década de 1970, se usaban tratamientos de compuestos inorgánicos de Arsénico en el tratamiento de leucemia, psoriasis, asma bronquial crónico, y los compuestos orgánicos de arsénico fueron utilizados como antibióticos para el tratamiento de enfermedades producidas por espiroquetas y protozoos.

No obstante, múltiples estudios alrededor del mundo han demostrado la asociación de la exposición de arsénico con diferentes tipos de cáncer (IARC, 2012), sin embargo, el uso del Arsénico y sus compuestos sigue en práctica en algunos sectores de la industria, así como el uso de compuestos de Arsénico combinados con sustancias que actúan como coadyuvantes para el tratamiento de diferentes tipos de neoplasias.

Por otra parte, la literatura relacionada con el Selenito de Sodio, según la base de datos PubMed del National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés) consultada en Julio de 2014, existen alrededor de 3000 artículos relacionados con el Selenito de Sodio, aproximadamente 700 artículos sobre toxicidad de Selenito de Sodio, 100 artículos que hacen referencia a la citotoxicidad

y genotoxicidad del compuesto, mientras que alrededor de 30 artículos hacen mención sobre toxicidad en linfocitos.

La literatura es escasa en relación con la toxicidad del Selenito de Sodio, sin embargo, el informe de la International Agency of Research on Cancer (IARC, por sus siglas en inglés) en 1975, referencia que el Selenio y sus compuestos (Dióxido de Selenio, Selenito de Sodio, Selenato de Sodio, Acido Selénico, Oxidocloruro de Selenio, SulfoSelenido de Cadmio y Dietilditiocarbamato de Selenio) han sido usados en la manufactura de vidrio para fijar el color rojo y los tintes de bronce, y para neutralizar colores verdes producidos por las impurezas de hierro. También se han usado en la pintura, plásticos, cerámica, y para producir colores entre el amarillo y el marrón, en la industria electrónica se han usado como un aditivo para aumentar la maquinabilidad y reducir la porosidad de los aceros, además de ser usados como ingredientes activos en distintos productos farmacéuticos y cosméticos, incluyendo drogas de prescripción para el tratamiento de la caspa y para tratar micosis cutáneas, así como para la catálisis y agentes oxidantes de la síntesis de cortisona y niacina.

Por otra parte, la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) aprobó en la década de los 70's el uso de Selenito o Selenato de Sodio en dosis de 0.1 – 0.2 mg/kg de peso en la dieta de cerdos, pavos y pollos de engorda con el propósito de prevenir enfermedades y muerte en este tipo de animales.

No obstante, la IARC (1975) reportó que la administración de Selenito o Selenato de Sodio, en ratas y ratones, produjo distintos tipos de neoplasias cuando se administraron en la dieta dosis de 0.5 – 2 mg/kg de peso.

Sin embargo, las concentraciones en las que se puede presentar toxicidad por el uso del Selenito o Selenato de Sodio están en función del objetivo del experimento, la respuesta celular y los mecanismos de reparación celular involucrados, ya que por la naturaleza ambivalente del Selenio y sus compuestos, pueden ser usados como sustancias tóxicas o protectoras.

En el caso de los seres humanos, el Selenio se encuentra a niveles de traza, 0.05-0.12 mg/L en las mujeres y 0.15-0.31 mg/L en los hombres, sin embargo, estas

cantidades pueden variar dependiendo de la zona geográfica donde vivan las personas.

En los seres humanos, el Selenio se encuentra normalmente como constituyente de las selenoproteínas, principalmente en forma de selenocisteína, cuya función principal en el organismo es como antioxidante, porque se encuentra en los centros catalíticos de la enzima glutatión peroxidasa, que se encarga de proteger a las células de los radicales oxigenados, catalizando la reducción del peróxido de Hidrógeno y los peróxidos lipídicos.

A pesar de esto, no se encuentra suficiente información disponible que esté actualizada sobre la toxicidad o el efecto protector del Selenio, Selenito o Selenato de Sodio. Recientemente se han retomado los estudios sobre las propiedades del Selenio y las sales de Selenio, especialmente sobre los efectos tóxicos del Selenito y Selenato de Sodio en líneas celulares cancerosas (Spyrou *et al*, 1996; Cemeli *et. al*, 2006; Shi *et. al*, 2013). En este caso, el uso de sales de Selenio (Selenito y Selenato de Sodio) combinado con coadyuvantes podrían conferir una ventaja terapéutica en el tratamiento de algunos tipos de cáncer y algunas otras enfermedades.

Con base en lo expuesto anteriormente, y dadas las condiciones fisicoquímicas que presentan las nanopartículas de plata Argovit®, las propiedades tóxicas del Arsenito de Sodio y la ambivalencia del Selenito de Sodio, se plantean lo siguiente:

JUSTIFICACIÓN

En la literatura se reportan pocas investigaciones realizadas en linfocitos humanos de manera *in vitro*, para probar los efectos genotóxicos y citotóxicos de las nanopartículas de plata (NPsAg), por lo tanto se considera importante investigar si las nanopartículas de Plata Argovit® exhiben el mismo comportamiento citotóxico en células sanguíneas de humanos (linfocitos binucleados), como sucede con el resto de las nanopartículas y las líneas celulares que han sido reportadas en la literatura. Es de gran interés conocer la citotoxicidad y la genotoxicidad de nano materiales como las nanopartículas de Plata, ya que estos nanomateriales tienen diversas aplicaciones en el ámbito médico y de consumo general, sin embargo, se desconocen los posibles efectos en la salud, los riesgos asociados con el uso de estos nanomateriales y el impacto en el ambiente.

Por otra parte, también es de gran interés investigar el comportamiento que exhibe el Selenito de Sodio en linfocitos binucleados humanos, ya que posee capacidad protectora y tóxica, mientras que su combinación con las nanopartículas de Plata Argovit® permitiría estudiar los efectos que produce en linfocitos binucleados y si fuera posible su uso como tratamiento en determinadas enfermedades.

El uso del Arsenito de Sodio como sustancia altamente tóxica permite contrastar las propiedades de las nanopartículas de plata Argovit® y el Selenito de Sodio, y determinar sus efectos tóxicos en linfocitos binucleados de seres humanos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Provocan efectos citotóxicos y genotóxicos las nanopartículas de Plata Argovit® en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos?

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata Argovit®, en concentraciones 0.0341 y 0.00341 µg/mL poseen la capacidad de disminuir la proliferación celular y alterar la estructura del DNA de linfocitos humanos en cultivos *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos la capacidad cito y genotóxica de las nanopartículas de Plata (NPsAg) Argovit®, mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar las concentraciones a las cuales las NPsAg Argovit® exhibirán citotoxicidad y genotoxicidad en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.
- 2) Comparar en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, el efecto genotóxico del Arsenito de Sodio con las NPsAg Argovit®.
- 3) Comparar en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, el efecto antigenotóxico del Selenito de Sodio con las NPsAg Argovit®.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Método de Micronúcleos por Bloqueo de la Citocinesis (Cytokinesis Block Micronucleus Assay, CBMN, por sus siglas en inglés) consiste en detener la división del citoplasma o citocinesis con Citocalasina B en sangre entera venosa, sin inhibir la división nuclear para que las células tengan una apariencia binucleada. La relativa sencillez del estudio ha conducido a que se adopte en estudios *in vivo* e *in vitro* para pruebas de genotoxicidad en poblaciones humanas (Fenech, 2000).

El método provee una medida para el rompimiento y pérdida de cromosomas, además, se ha demostrado que es un indicador sensitivo para el daño cromosomal, en donde la formación de micronúcleos se origina por fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que no son incluidos dentro del núcleo principal después de la división celular.

La ventaja de este método es que el daño genotóxico y citotóxico es relativamente fácil de visualizar y registrar durante la observación en microscopio, para su posterior análisis estadístico, a través del conteo de miles de células que son usadas típicamente en análisis de metafase.

Definición de Variables

Se consideraron como variables dependientes en este proyecto, a los principales biomarcadores que la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis establece, los cuales son: el Índice Mitótico o Índice de Proliferación celular en 500 células contadas (IM), el Número de Micronúcleos (NM), por cada 1000 células binucleadas contadas, a partir de cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

Las variables independientes que se contemplaron, correspondieron a las diferentes concentraciones (0.0341 y 0.00341 $\mu\text{g/mL}$.) de NPsAg Argovit® que se utilizaron en los cultivos *in vitro* así como diferentes concentraciones de las sustancias que fueron utilizadas como testigos que corresponden al Selenito y Arsenito de Sodio.

Criterios de inclusión y exclusión para la selección de sujetos

Para la preparación de los escenarios de cultivo, se utilizaron muestras de sangre entera venosa de 3 sujetos saludables, previa firma de consentimiento informado para la extracción de sangre entera venosa.

Los criterios para la selección de sujetos fueron:

- Hombres de entre 18 y 35 años.
- Que aceptaran participar en el estudio y firmaran el consentimiento informado.
- Cuestionario de estilos de vida y frecuencia diaria de alimentos.
- No expuestos a agentes cito/genotóxicos previamente.
- Que no consumieran alcohol ni tabaco
- Que presentan valores normales de una química sanguínea completa.

Los sujetos que no cumplieron con los requisitos anteriores fueron descartados, ya que se ha demostrado que el género, la edad y la alteración de los niveles de homocisteína, folatos y vitamina B12, así como factores asociados a adicciones, aumentan la frecuencia de micronúcleos (Fenech *et al.*, 1999).

Diseño experimental

El experimento consistió en 90 cultivos, que correspondieron a 90 laminillas (una laminilla por cultivo). Las cuales consistieron en dos replicas de las siguientes combinaciones, incluyendo los controles, para cada sujeto:

Tabla 1. Concentraciones de Arsenito de Sodio, Selenito de Sodio, Nanopartículas de plata Argovit®, Selenito de Sodio/Nanopartículas de Plata Argovit® y Arsenito de Sodio/Nanopartículas de plata Argovit®.

S U J E T O	S U J E T O	S U J E T O	Sustancia
			1
			Se (0.00049µg/mL)
			Se (0.000049µg/mL)
			NPsAg (0.03418 µg/mL)
			NPsAg (0.003418 µg/mL)
			As (0.037 µg/mL)
			As (0.0037µg/mL)
			Se y NPsAg (0.00049µg/mL.), (0.03418 µg/mL)
			Se y NPsAg (0.00049µg/mL.), (0.003418 µg/mL)
			Se y NPsAg 0.000049 µg/mL.), (0.03418 µg/mL)
			Se y NPsAg 0.000049 µg/mL.), (0.003418 µg/mL)
			As y NPsAg (0.037µg/mL), (0.03418 µg/mL)
			As y NPsAg (0.037µg/mL), (0.003418 µg/mL)
			As y NPsAg (0.0037 µg/mL,) (0.03418 µg/mL)
			As y NPsAg (0.0037 µg/mL), (0.003418 µg/mL)

Se realizaron diluciones seriadas de nanopartículas de Plata Argovit®, Selenito de Sodio y Arsenito de Sodio, a partir de las cuales se utilizaron las diluciones correspondientes a 1:1000 y 1:10,000, para cada una de las sustancias de prueba.

Las nanopartículas de Plata Argovit® fueron proporcionadas por el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en colaboración con la empresa Vector-Vita Ltd (Rusia). Las nanopartículas de Plata son esferoides de 3 a 10 nm de diámetro, suspendidas en agua destilada y desionizada, funcionalizadas con PoliVinilPirrolidona al 18.8% como estabilizador.

La concentración original de las nanopartículas de plata Argovit® a partir de la cual se realizaron las diluciones fué de 12 000 µg/mL (1.2% de Ag metálica).

Se adquirió Selenito de Sodio en polvo de la casa comercial Sigma-Aldrich® con una pureza del 98%, se preparó un solución stock a partir de la cuál de realizaron las diluciones 1:1000 y 1:10 000.

El Arsenito de Sodio en polvo fue proporcionado por el Almacén de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Ensenada. Se preparó una solución stock a partir de la cual se realizaron las diluciones 1:1000 y 1:10 000.

Para el cálculo de las concentraciones finales de nanopartículas de plata Argovit®, Selenito de Sodio y Arsenito de Sodio se utilizó la siguiente fórmula

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Despejando la ecuación tenemos

$$C2 = \frac{C1 * V1}{V2}$$

Donde

C1= es la concentración inicial de la sustancia de prueba

V2= 20 µL de la sustancia de prueba

C2= concentración final de la sustancia de prueba

V2= 7.02 mL de volumen final de cultivo celular.

El procedimiento para el cultivo primario de linfocitos humanos se realizó mediante el método de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (Fenech, 2000) y consistió en lo siguiente:

Toma de muestra

Se extrajeron 15.5 mililitros (mL) de sangre venosa completa de cada uno de los participantes seleccionados, previa aceptación y firma de consentimiento informado y selección de parámetros de inclusión y exclusión.

La extracción sanguínea se realizó con vacutainer Becton Dickinson® y tubos heparinizados Becton Dickinson® vacutainer Sodium Heparin (NH) 86 USP Units de 6.0 mL * 13 * 100 mm.

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo se preparó con las siguientes proporciones por cada tubo de cultivo, en tubos de polipropileno de fondo cónico Falcon de Becton Dickinson® 17 * 120 mm de 15 mL estériles, a 37 °C.

- 6.3 mL. de medio suplementado RPMI-1640 HEPES modificado Sigma Aldrich®.
- 0.2 mL. de Fitohemaglutinina M (PHA-M) Sigma-Aldrich®
- 0.5 mL. de sangre entera venosa fresca
- 20 µL de la sustancia a probar (Nanopartículas de Plata Argovit® de Vector-Vita-Cientific-Comercial, Novosibirsk, Rusia; Selenito de Sodio (Na₂SeO₃) approx. 98% S5261 de Sigma-Aldrich; Arsenito de Sodio (proporcionado por el almacén de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC).

- 1% de aminoácidos no esenciales MEM 100X solution Sigma-Aldrich® para suplementar el medio de cultivo.
- 1% de L-glutamina γ irradiado, Bioxtra de Sigma-Aldrich® para suplementar el medio de cultivo.

El medio se preparó en una campana Clase II Tipo A1 o A2 de Fisher Hamilton® modelo 54L970.

Una vez que cada tubo tenía el medio necesario se aplicó vortex (VWR vortex Cat. 58816-121) a cada tubo por unos segundos y se regresó a la gradilla en posición semihorizontal.

Posteriormente se colocaron los tubos en incubación en una incubadora VWR Modelo 1500EM a 37 °C por 48 horas.

Bloqueo de la proliferación

Al término de las 48 horas se retiraron los tubos de la incubadora y se colocaron en la campana de extracción Clase II en un ambiente estéril. Se aplicó vortex a cada tubo por unos segundos y para bloquear la proliferación de las células, se agregaron 21 μ L de Citocalasina B Sigma-Aldrich® a cada tubo de cultivo y posteriormente se volvió a incubar por 24 horas.

Cosecha, fijación y lavado de células

Al término de las 24 horas, se retiraron los tubos de la incubadora y se les aplicó vortex por unos segundos.

Posteriormente el contenido de cada tubo se vertió en tubos de vidrio para centrífuga y se les agregó 1 mL de fijador frío (solución 3:1 de Metanol Jalmek® grado reactivo al 70% y Acido Acético Glacial Jalmek® reactivo A.C.S.), se cubrieron con parafilm, se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos en un centrífuga Fisher Scientific® modelo 225. Una vez centrifugado, se retiró el sobrenadante mediante succión por vacío.

La solución fijadora se colocó en una cama de hielo durante el proceso de fijación y lavado para evitar que aumentara de temperatura.

Después de la primera centrifugación aplicada a los tubos, se agregaron 5 mililitros más de fijador a cada tubo, resuspendiendo el botón suavemente. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 1200 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante.

Se centrifugaron y se lavaron los linfocitos con la solución fijadora, hasta que el botón resuspendido se tornó claro, cuidando de no llevarse el botón, ya que ahí se encuentran los linfocitos.

Una vez que el botón de células se tornó de un color blanco, se dejó el botón con un poco de sobrenadante para montar las laminillas.

Montaje de laminillas

El montaje de las laminillas se llevó a cabo en portaobjetos Labchoice® para microscopio de doble esmerilado 75 mm x 25mm de 1mm de grosor. Los portaobjetos fueron lavados y desinfectados y se colocaron en agua destilada fría para su posterior montaje.

Se resuspendió suavemente el botón con una pipeta Pasteur y posteriormente, se colocó el botón en el portaobjetos (previamente enfriado y rotulado), en forma de “zigzag”.

Las laminillas se cubrieron (para evitar la adhesión de polvo) y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tinción de laminillas

Una vez fijadas las laminillas, se tiñeron con Eosin B Solution Sigma-Aldrich®; Methylene Blue Solution Sigma-Aldrich®.

Cada laminilla se tiñó con Eosina durante 5 minutos, se removió el excedente de colorante y posteriormente se colocó el Azul de Metileno por 2-3 minutos. Se retiró el excedente con agua destilada fría.

Consecutivamente, se dejaron cubiertas las laminillas y se dejaron secar a temperatura ambiente para su posterior observación al microscopio óptico.

La observación de las laminillas se realizó a 100X con un microscopio óptico Carl Zeiss Serie 3119001175 Primo Star 415500-0010. Para obtener los biomarcadores de daño correspondientes al Índice de Proliferación Celular y la Frecuencia del Número de Micronúcleos, realizó el recuento de células con un Blood Counter MFD208.

Las fotografías se tomaron con una cámara Canon® Power Shot A640 No. 4726209640 de 10.0 megapíxeles con 4X de zoom óptico, a una distancia focal de 2.3X (zoom digital). Se utilizó lente adaptador Pa5M37/52X0.75 415500-1812-000 con Soligor Adaptor tube for Canon A610/A620 52 mm tele Soligor Adaptor Tube para Canon A610/A620 52 mm wide.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa StatSoft, Inc. (2007) STATISTICA (data analysis software system), versión 8.0.

Se realizaron Análisis No Paramétricos de Varianza (ANOVA) de 1 vía, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de varianza por categorías.

Parámetros para la Identificación de la Proliferación Celular y Genotoxicidad

La observación de laminillas y la evaluación de la frecuencia de micronúcleos (MNi) se basaron en los criterios para la selección de células binucleadas (Fenech, 2000).

1. Las células deben ser binucleadas (BN).
2. Los dos núcleos en las células BN deben tener intactas las membranas nucleares y deben estar situadas dentro de la misma frontera citoplasmática.
3. Los dos núcleos de células BN deben ser aproximadamente de igual talla, patrón de tinción y de la misma intensidad de la tinción.
4. Los dos núcleos de las células BN pueden estar unidos por un fino puente nucleoplasmático el cual no debe ser más ancho que $\frac{1}{4}$ del diámetro del núcleo.
5. Los dos núcleos pueden tocarse pero idealmente no deben superponerse. Una célula en la que se traslapen los núcleos podrá contarse si cada núcleo es distinguible.
6. La línea de la membrana citoplasmática de las células BN debe estar intacta y claramente distinguible del resto de las células BN.
7. No contar en las mononucleadas, polinucleadas y células en apoptosis o necrosis.

El cálculo para la obtención del Índice de Proliferación Celular o Índice Mitótico fue el siguiente:

Índice de Proliferación Celular =

$$\frac{(\# \text{ de células mononucleadas} * 1) + (\# \text{ de células binucleadas} * 2) + (\# \text{ de células polinucleadas} * 3)}{500 \text{ células contadas}}$$

500 células contadas

Criterios para el Conteo de Micronúcleos

1. El diámetro de los micronúcleos en linfocitos humanos usualmente varía entre $1/16$ y $1/3$ parte de la media del diámetro del núcleo principal el cual corresponde a $1/256$ y $1/9$ parte del área de un núcleo principal en una célula BN, respectivamente.
2. Los micronúcleos no son refractiles y ellos pueden, por lo tanto, distinguirse rápidamente de artefactos o partículas de tinción.
3. No están unidos o conectados al núcleo principal.
4. Los micronúcleos pueden tocarse pero no sobreponerse con el núcleo principal y la línea divisoria de los micronúcleos deben distinguirse de la línea del núcleo principal.
5. Los micronúcleos tienen la misma intensidad de la tinción como sucede en el núcleo principal, aunque ocasionalmente pueden teñirse más intensamente.

Las células que no cumplieron con la morfología citada anteriormente no se incluyeron en el conteo, de igual manera para el conteo de micronúcleos.

Aspectos Éticos

Los participantes que aceptaron el estudio se les realizó un SMAC 33 de manera gratuita, y se les instó a que desde el inicio al término del proyecto tendrían acceso a los resultados del estudio. Por otra parte, los resultados obtenidos del SMAC 33 se compararon entre los sujetos para comprobar el estado general de salud de los participantes.

El riesgo de participar en el estudio fue mínimo, debido a que solo fue necesario extraer sangre de la persona que aceptó el consentimiento informado, sin provocarle mayor daño que el de la punción con el vacutainer. El procedimiento fue el mismo que se utiliza cuando se solicitan análisis de laboratorio en sangre, por lo que es necesario que la persona haya aceptado participar y que se presentara sin desayunar. Al participante se le entregó el resultado de los estudios de química sanguínea después de que estos se realizaron.

El equipo de trabajo conservó una copia, como evidencia de los resultados. La información generada de los participantes fue manejada con discreción y estricta confidencialidad, quedando estipulado en el consentimiento informado que los resultados solo se manejarían entre el investigador y el participante y que sólo los resultados serían publicados.

Quedando establecido que este protocolo de investigación se encontraba bajo los lineamientos de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud, según el artículo 20, 21 y 22 de los Estados Unidos Mexicanos. Como también lo establecido por Declaración de Helsinki de los principios básicos para las investigaciones médicas en seres humanos, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, en Junio de 1964.

Destino de las Muestras

Al término del experimento y habiendo obtenido los resultados de los conteos de las laminillas, éstas serán utilizadas solo para fines didácticos.

Los residuos que se generaron fueron dispuestos según lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, de Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este apartado presenta tres segmentos. El primero describe los resultados de la citotoxicidad con base en la proliferación celular correspondiente a los diferentes escenarios experimentales utilizados en la presente investigación; en el segundo se presentan los resultados de la genotoxicidad expresada como el número de micronúcleos por cada mil células binucleadas contadas y en el tercero se discute el significado de la citotoxicidad y genotoxicidad de cada escenario en contraste con los hallazgos de otras investigaciones.

Citotoxicidad en los Escenarios Experimentales

La proliferación celular en el experimento control tuvo un promedio de 1.65 ± 0.064 ; y dado que lo reportado en la literatura la proliferación para personas saludables va de 1.0 a 2.0 con una media de 1.5 (Fenech, 2007), los sujetos participantes presentaron proliferación en general baja, no obstante, dentro de los límites para personas sanas. En las dos concentraciones probadas cuando se agregó la nanoplata Argovit® en las concentraciones 0.00341 y 0.0341 $\mu\text{g/mL}$. (Fig. 1) la proliferación celular se mantuvo de manera significativa con base en el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis ($p=0.3392$).

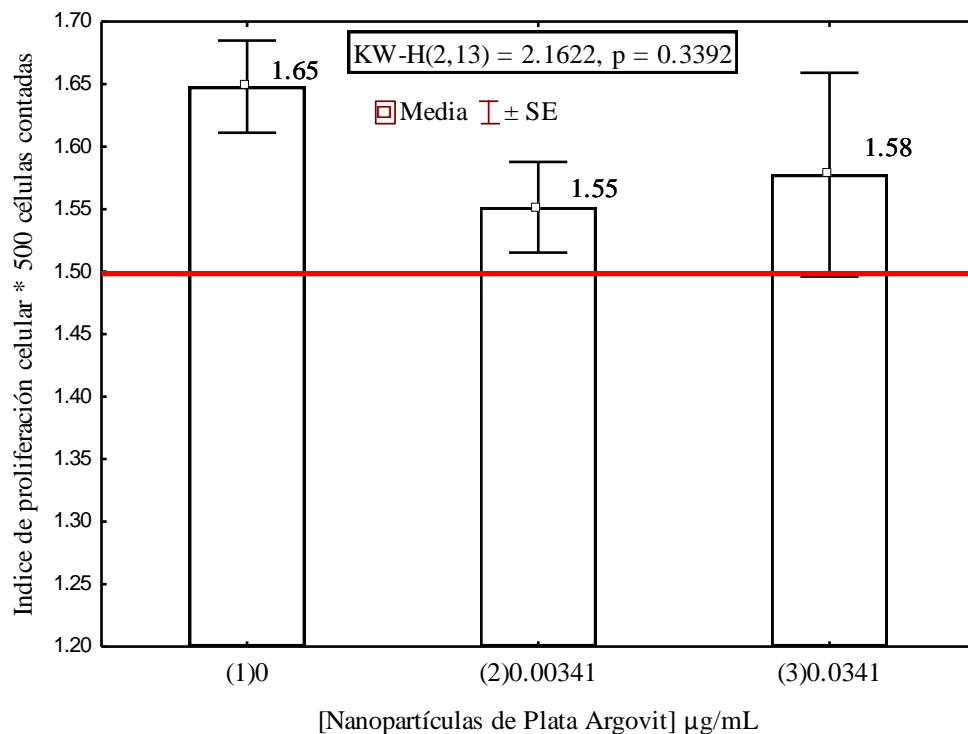


Fig. 1. Índice de proliferación celular por cada 500 células viables contadas en los tratamientos Nanopartículas de Plata Argovit®, en orden de concentración. ¹

¹ La línea roja representa el promedio de los valores normales de proliferación celular por cada 500 células contadas de individuos saludables.

Lo anterior es consistente con la exposición a sustancias que no presentan acción citotóxica, las cuales no generan una disminución significativa $p > 0.05$ de la proliferación celular. Este resultado es consistente con lo reportado por Archana *et al.* (2013) quienes demostraron que nanopartículas de TiO_2 montadas en Quitosan-Pectina poseen una buena capacidad como antibacteriano y buena biocompatibilidad en el tratamiento de heridas y cicatrización, lo cual es evidencia de una buena proliferación. En contraste con este resultado, otros autores han reportado evidencias de que las nanopartículas de Plata así como otros tipos de nanomateriales provocan baja viabilidad celular, apoptosis, daño al DNA, especies reactivas de oxígeno, entre otros efectos citotóxicos (Ahamed *et al.* 2010; Kim *et al.* 2011; Ghosh *et al.* 2012); y aunque los mecanismos de acción no son del todo claros, se ha establecido que el tipo de daño celular tiene relación con el tamaño, forma, funcionalización, recubrimiento de los nanomateriales empleados, pruebas de toxicidad usadas y la dosis-dependencia (Arora *et al.* 2012; Park *et al.* 2011).

Los resultados del presente estudio de proliferación celular que se realizaron con los tratamientos de nanopartículas de plata Argovit® (Fig. 1) muestran que no existe disminución significativa de la proliferación celular entre los tratamientos con 0.00341 y 0.0341 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas de Plata Argovit® respecto al control. Esto podría explicarse por las propiedades físico-químicas que poseen este tipo de nanopartículas de plata, sin embargo, es necesario realizar estudios con mayor profundidad para dilucidar las interacciones moleculares de estas nanopartículas con las células y los efectos que pudieran presentarse en relación con la proliferación celular y viabilidad celular.

La proliferación celular en el experimento al que se le agregó Selenito de Sodio (Fig. 2) mostró una disminución significativa de la proliferación celular en los tratamientos con 0.000049 y 0.00049 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Selenito de Sodio con 1.36 ± 0.090 y 1.40 ± 0.073 respecto al control y en comparación con lo reportado en la literatura

como valores normales de proliferación celular 1.0 a 2.0 $P < 0.0709$, con una media de 1.5.²

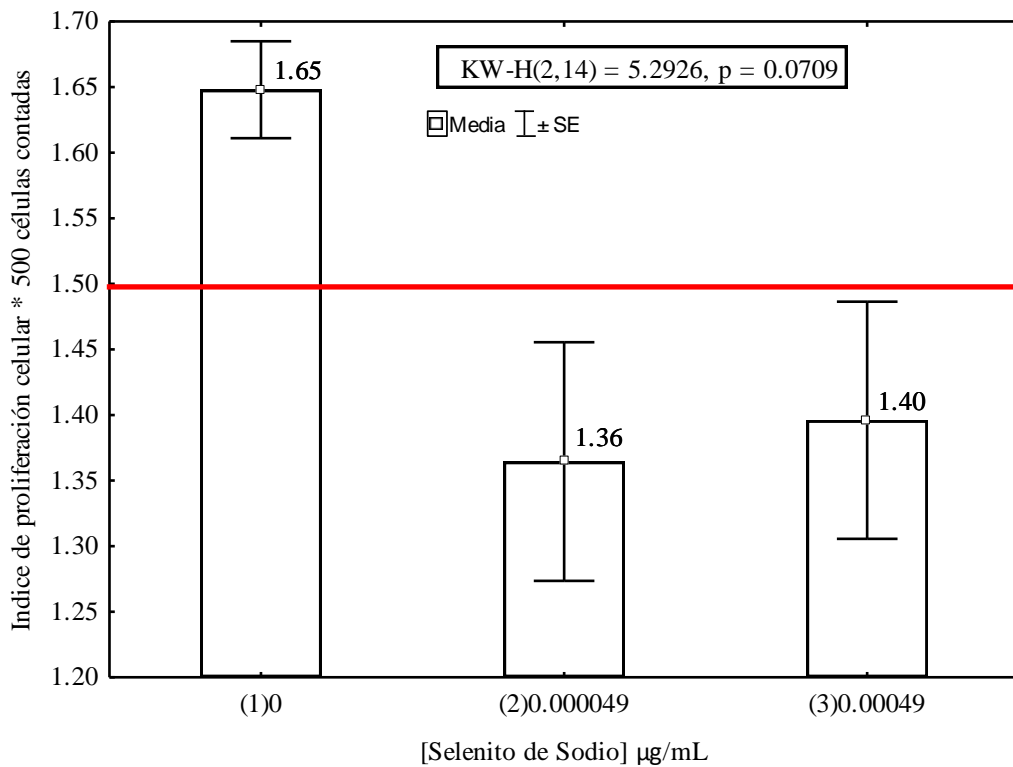


Fig. 2. Índice de proliferación celular por cada 500 células viables contadas de los tratamientos de Selenito de Sodio, en orden de concentración.

En los resultados anteriores se observa que existe disminución de la proliferación celular cuando los cultivos primarios de linfocitos humanos son expuestos a dos concentraciones diferentes de Selenito de Sodio. Esto se corrobora con lo reportado por Spyrou *et al.*, (1996) quienes indican que el Selenito y Selenato de Sodio disminuyen la proliferación celular en células 3B6 y BL41 y que dicha inhibición se lleva a cabo durante la fase S de la división celular. En otro estudio realizado por Abul-Hasan *et al.* (2004) mostraron que el Selenito de Sodio provocó citotoxicidad en linfocitos primarios humanos, sin embargo, no hubo un incremento

² La línea roja representa el promedio de los valores normales de proliferación celular en 500 células contadas de individuos saludables.

significativo de deleciones de cromosomas o rompimiento de cromátides o del índice mitótico tratados con Selenio y con Selenio irradiado. Cemeli *et al.*, (2006) sugieren que las propiedades genotóxicas y antigenotóxicas de los compuestos de Selenio son altamente dependientes en las condiciones bajo las cuales se realizan los ensayos.

En los tratamientos con 0.0037 y 0.037 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Arsenito de Sodio, la proliferación celular en general fue significativamente baja con 1.37 ± 0.062 y 1.51 ± 0.062 , en contraste con el control (Fig. 3). Por otra parte, se observó que el tratamiento con 0.037 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tuvo un índice de proliferación similar a los valores normales para la proliferación celular en individuos sanos que va de 1.0 a 2.0, reportados en la literatura, sin embargo, ambos tratamientos tuvieron índices de proliferación bajos en comparación con el experimento control. $P = 0.0483$.³

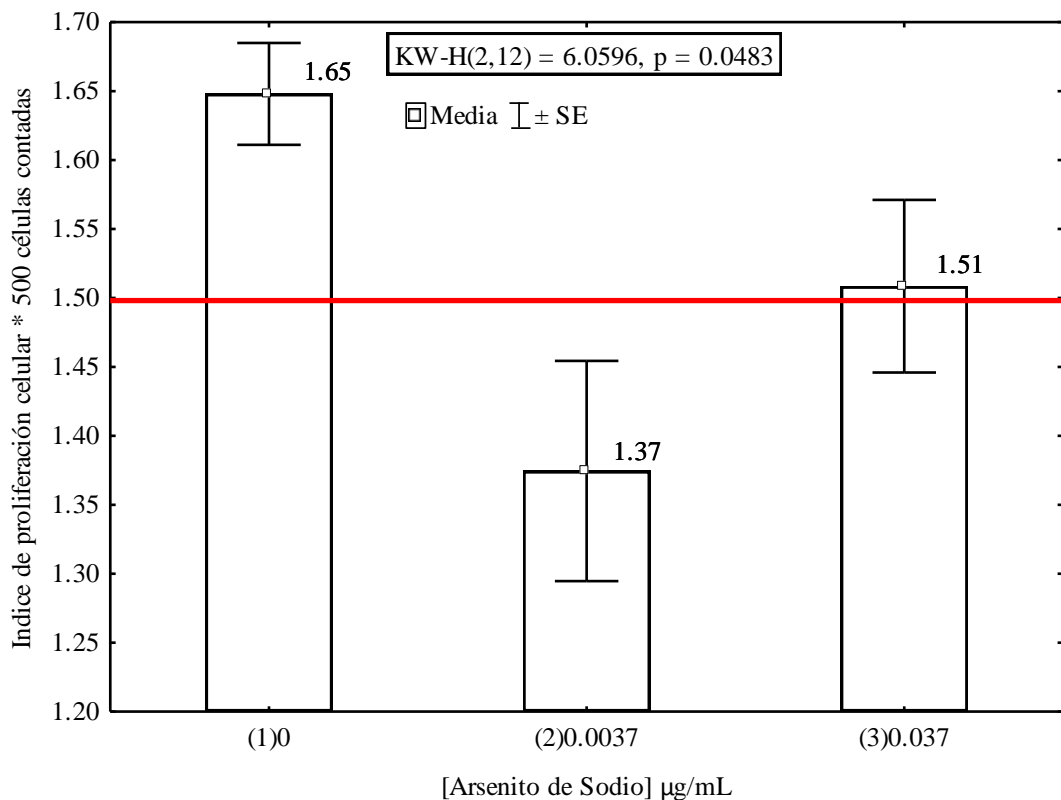


Fig.3. Índice de Proliferación celular por cada 500 células viables contadas de los diferentes tratamientos de arsenito de sodio, en orden de concentración.

³ La línea roja representa el promedio de los valores normales de proliferación celular en 500 células contadas de individuos saludables.

En los resultados de los tratamientos con Arsenito de Sodio (Fig. 3) se puede apreciar que hubo disminución de la proliferación celular en los dos tratamientos utilizados respecto al control. Cabe señalar que el tratamiento con mayor concentración de Arsenito de Sodio logró alcanzar el límite de referencia, sin embargo, la proliferación continuó siendo baja. De igual manera, Bourdonnay *et al.*, (2009) determinaron que la exposición de macrófagos derivados de monocitos de sangre humana con Trióxido de Arsénico (A_2O_3) sobre expresaron y reprimieron genes involucrados con la diferenciación de los macrófagos humanos. Por otra parte, Jiang *et al.*, (2013) sugieren que el A_2O_3 y el Arsenito de Sodio (NaA_2O_3) inducen estrés oxidativo con daño al DNA y rompimiento cromosomal en células A549. Los resultados aquí presentados confirman los efectos citotóxicos del Arsénico y sus derivados en múltiples experimentos que se han reportado en la literatura (IARC, 2012).

Cuando se cultivaron los linfocitos en presencia de nanopartículas de Plata Argovit® y Selenito de Sodio en el mismo tubo, no se observaron diferencias significativas en la proliferación celular (Fig. 4) similar a lo que se pudo observar cuando se cultivaron con únicamente nanopartículas de Plata, lo cual es indicio de que las nanopartículas de Plata tienden a modular la citotoxicidad del Selenito de Sodio $P = 0.1276$. Los resultados obtenidos de la proliferación celular con los tratamientos conjugados de nanopartículas de Plata y Selenito de Sodio, se observa la disminución de la proliferación celular, sin embargo, se aprecia que en el tratamiento con mayor concentración de nanopartículas de Plata Argovit® y Selenito de Sodio presenta una proliferación por arriba de los límites normales para individuos sanos (Fig. 4). Además se puede apreciar, comparativamente, que la proliferación celular, en general, es más alta en este tipo de tratamientos que en los resultados obtenidos de la proliferación celular de los cultivos que tenían

exclusivamente nanopartículas de Plata Argovit® y el Selenito de Sodio (Fig.1; Fig. 2).⁴

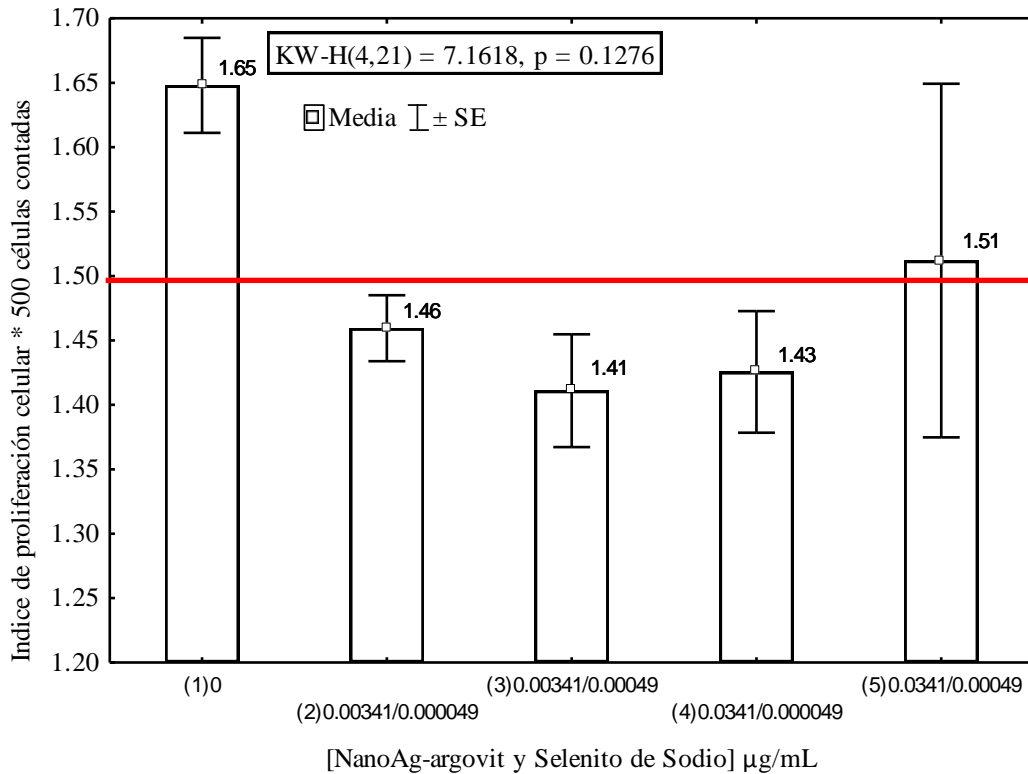


Fig. 4. Índice de Proliferación celular por cada 500 células viables contadas de los diferentes tratamientos de Nanopartículas de plata y Selenito de sodio, en orden de concentración.

Lo anterior concuerda con el trabajo realizado por Glaser *et al.*, (2013) quienes indican que Difenil Diselenido (PhSe)₂ fue capaz de contrarrestar el efecto inhibitorio del metilmercurio en las mitocondrias de ratas, así como disminuir el estrés oxidativo y los niveles de TBA-RS, 8-OHdG y, la reducción de BDNF. En otro estudio realizado por Said *et al.*, (2014) sugieren que la aplicación a largo plazo de selenito de sodio reduce el daño tisular en ovarios de ratas que fueron expuestas a radiación, incrementando la proliferación de las células granulosas, E2 y la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y que probablemente pudiera utilizarse para limitar el daño en ovarios humanos debido a la radioterapia.

⁴ La línea roja representa el promedio de los valores normales de proliferación celular en 500 células contadas de individuos saludables.

Wang *et al.*, (2013) también sugieren que la administración de Selenito de Sodio a una concentración de 0.804mg/kg administrados en la dieta diaria puede prevenir la inmunosupresión provocada por la Aflatoxina B1 (AFB1) mediante la inhibición de estrés oxidativo. En cambio, Shi *et al.*,(2013) demostraron que el selenito inhibió el crecimiento de células HL60 e indujo apoptosis, además de alterar el ensamblaje de microtúbulos en la fase G2/M y conducir a una baja regulación de la proteína anti-apoptótica Mcl-1. En este mismo sentido, Li *et al.*, (2013) demuestran que el Selenio induce el arresto del ciclo celular en la fase G2/M y de las rutas de apoptosis en las mitocondrias de células colorectales cancerosas; debido a esto, los resultados aquí presentados sugieren que las NPsAg contribuyen a modular la acción de los compuestos con selenito en relación a la proliferación celular.

Los resultados del presente estudio determinaron diferencias significativas en la proliferación celular en contraste con el control (Fig. 5). En los escenarios en los que se cultivaron los linfocitos con nanopartículas de Plata Argovit® y Arsenito de Sodio. Es importante resaltar que el cultivo que contenía las concentraciones más altas de nanopartículas de Plata y Arsenito de Sodio (Fig. 4 y 5), tuvieron un aumento de la proliferación celular, sin embargo, ésta continuó siendo baja en comparación con el tratamiento control y los límites de proliferación celular en individuos sanos (línea roja). $P= 0.0141$.

Los tratamientos con nanopartículas de Plata Argovit® y Arsenito de Sodio muestran una proliferación celular baja de forma general. Se puede observar que el tratamiento 4) presenta una mayor proliferación que el resto de los tratamientos (Fig. 5), sin embargo, no superó el límite de referencia (línea roja) y por tanto, la proliferación celular continuó siendo baja. Además, al comparar los resultados de los índices de proliferación celular de cada uno de los tratamientos por separado (Fig. 1 y Fig. 3) con los tratamientos combinados de nanopartículas de Plata Argovit® y Arsenito de Sodio, se observa una considerable disminución de proliferación celular en estos últimos (Fig. 5).⁵

⁵ La línea roja representa el promedio de los valores normales de proliferación celular en 500 células contadas de individuos saludables.

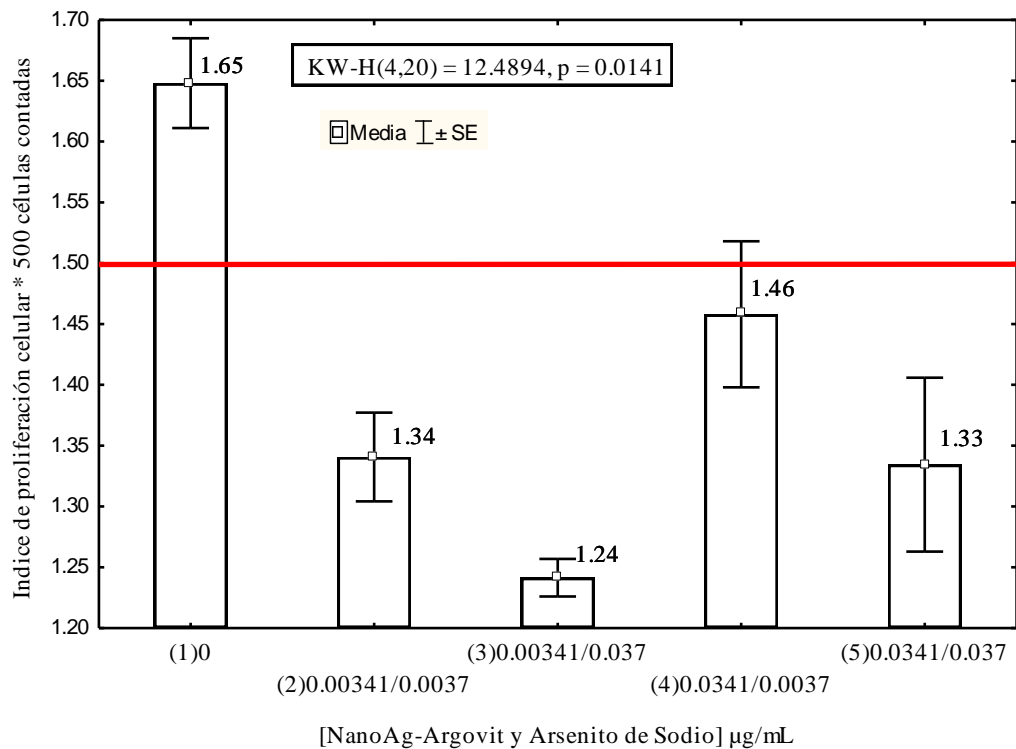


Fig. 5. Proliferación celular por cada 500 células viables contadas de los diferentes tratamientos de Nanopartículas de plata y Arsenito de sodio, en orden de concentración.

Como se mencionó anteriormente, los efectos de toxicidad que resultaron en este trabajo están respaldados por los múltiples experimentos en que se ha reportado los efectos adversos del Arsénico y sus derivados (IARC, 2012), y para las nanopartículas de Plata (Ahamed *et al.*, 2010; Kim *et al.* 2011).

Por otra parte, Rogers *et al.*, (2014) sugieren que al combinar vitamina D3 con Trióxido de Arsénico en células HL-60 la toxicidad es dosis-dependiente, conduce a la fragmentación del DNA nucleosomal y que potencialmente podría usarse en el tratamiento de leucemia promielocítica aguda (LPA).

En el caso de los resultados aquí presentados, se podría relacionar de la misma manera, ya que se realizaron combinaciones de nanopartículas de Plata

Argovit® y Arsenito de Sodio y es posible que se solo se puedan apreciar los efectos del Arsenito de Sodio, ya que este compuesto es el más tóxico de los pertenecientes a los derivados del Arsénico, no obstante, se deben de realizar mayor número de pruebas y otros estudios de cito/geno toxicidad y también en otros tipos celulares para probar estas hipótesis.

Genotoxicidad en los Escenarios Experimentales

La frecuencia de micronúcleos en el experimento control tuvo un promedio de 3.3 ± 0.73 ; en las dos concentraciones probadas (0.00341 y $0.0341 \mu\text{g/mL}$) se observó una frecuencia de micronúcleos ligeramente mayor al control (Fig.6), no obstante, el número de micronúcleos se encuentra dentro de los límites para personas sanas que son 8.8 ± 5.6 micronúcleos por cada 1000 células binucleadas contadas (Fenech & Morley, 1985), ($p=0.0409$).⁶

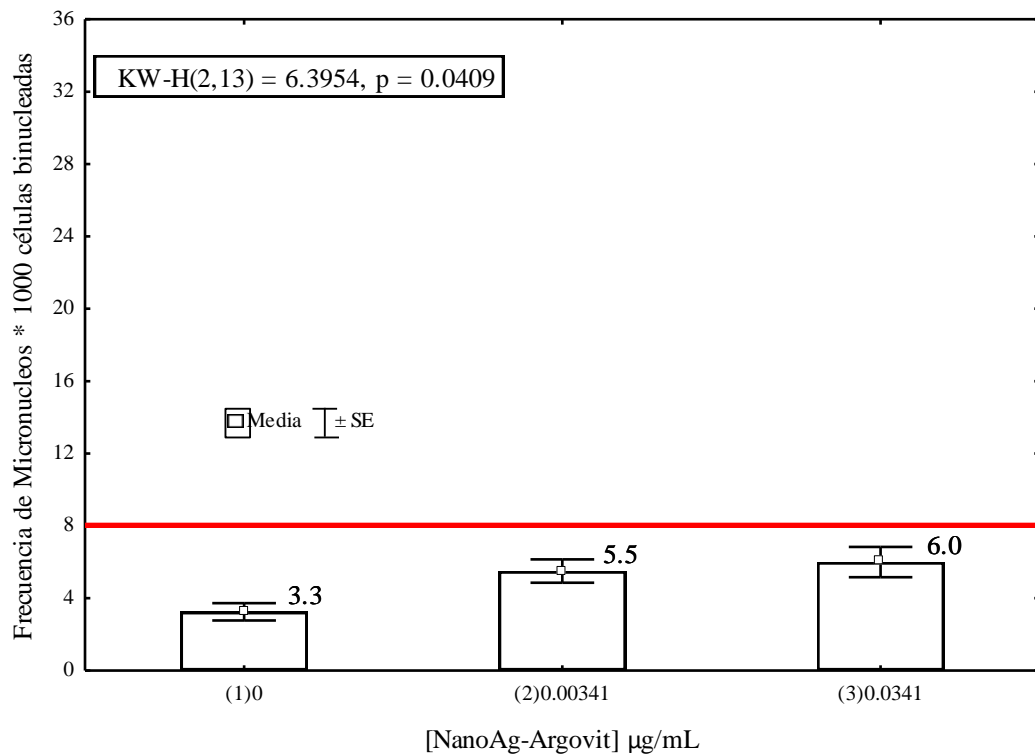


Fig. 6. Frecuencia de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Nanopartículas de Plata Argovit®, en orden de concentración.

⁶ La línea roja representa el promedio de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas contadas de individuos saludables.

Estos resultados primariamente indican que en estas concentraciones de nanopartículas de Plata Argovit® no aumenta la frecuencia de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas. Sin embargo, Lamb *et al.* (2010), sugieren que el uso de nanoplatata altera la función celular y su relación con el metabolismo y eliminación de fármacos y otros xenobióticos. Por lo que dependiendo de la cantidad ingerida y la cantidad que llega al hígado, podría ser una fuente de interacciones farmacológicas *in vivo* y que la ingestión regular debe ser con cautela.

Por otra parte, Li *et al.*, (2012), sugieren que la frecuencia de micronúcleos y la citotoxicidad es dosis-dependiente en células TK6 de linfoblastoma humano. También, sugieren que la genotoxicidad y la citotoxicidad se encuentran en función de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas así como de las líneas celulares que son usadas y que la variación en los resultados reportados en la literatura podría tener ese origen.

La frecuencia de micronúcleos en el experimento con Selenito de Sodio (Fig. 7) mostró un aumento significativo en el número de micronúcleos en los tratamientos con 0.000049 y 0.00049 $\mu\text{g/mL}$ de Selenito de Sodio, con 10 ± 1.87 y 10 ± 2.29 , respectivamente, en contraste con el control y lo reportado en la literatura como valores normales de proliferación celular de 8 ± 2 micronúcleos por 1000 células binucleadas $P=0.0618$.

En los resultados de la frecuencia de micronúcleos con los dos tratamientos de selenito de sodio (Fig. 7), el número de micronúcleos se mantuvo levemente dentro de los límites de referencia en individuos sanos, sin encontrarse diferencias significativas respecto al número de micronúcleos que se reportaron en el experimento control.⁷

⁷ La línea roja representa el promedio de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas contadas de individuos saludables.

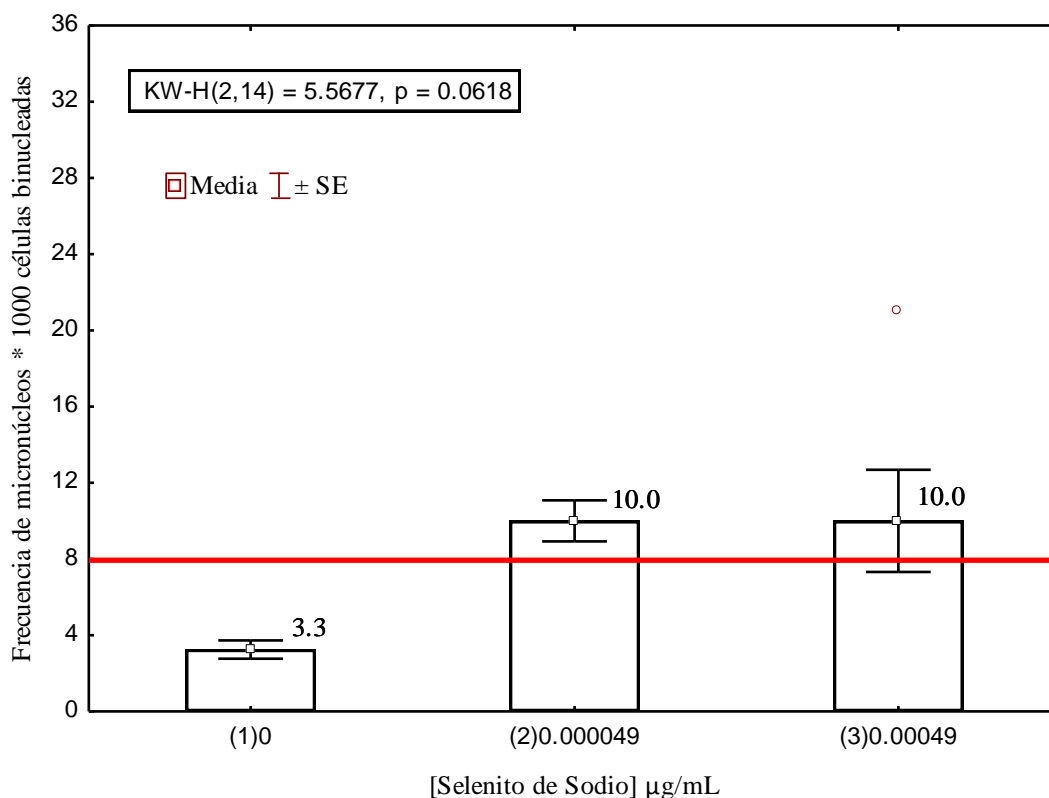


Fig. 7. Frecuencia de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Selenito de sodio, en orden de concentración.

El resultado del presente trabajo coincide con lo reportado por Li *et al.*, (2013) quienes afirman que el selenito de sodio provoca apoptosis en células cancerosas del colon, lo cual contribuye a detener la genotoxicidad, con los mecanismos de muerte celular programada. No obstante, Hart *et al.*, (2013) sugieren que el daño oxidativo al DNA provocado por metales, disminuye cuando el Dióxido de Selenio (SeO_2) y el Selenito de Sodio (Na_2SeO_3) están presentes, evitando daño al material genético provocado por especies reactivas de oxígeno (ROS). De igual forma, Cemeli *et al.*, (2006) sugieren que la frecuencia de micronúcleos incrementó mayormente en células TK6 y que los resultados son altamente dependiente de las condiciones en las que se realicen los experimentos.

En los tratamientos con 0.0037 y 0.037 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Arsenito de Sodio (Fig. 8), la frecuencia de micronúcleos fue en general más alta en contraste con el control, encontrándose diferencias significativas. Se observó que en el tratamiento 2 el número de micronúcleos fue de 7.3 ± 1.51 manteniéndose dentro de los límites para individuos sanos (8 ± 2 micronúcleos por cada 1000 células binucleadas), no así, para el tratamiento 3, en donde se aumento considerablemente el número de micronúcleos con 14.5 ± 1.51 . $P=0.0179$.⁸

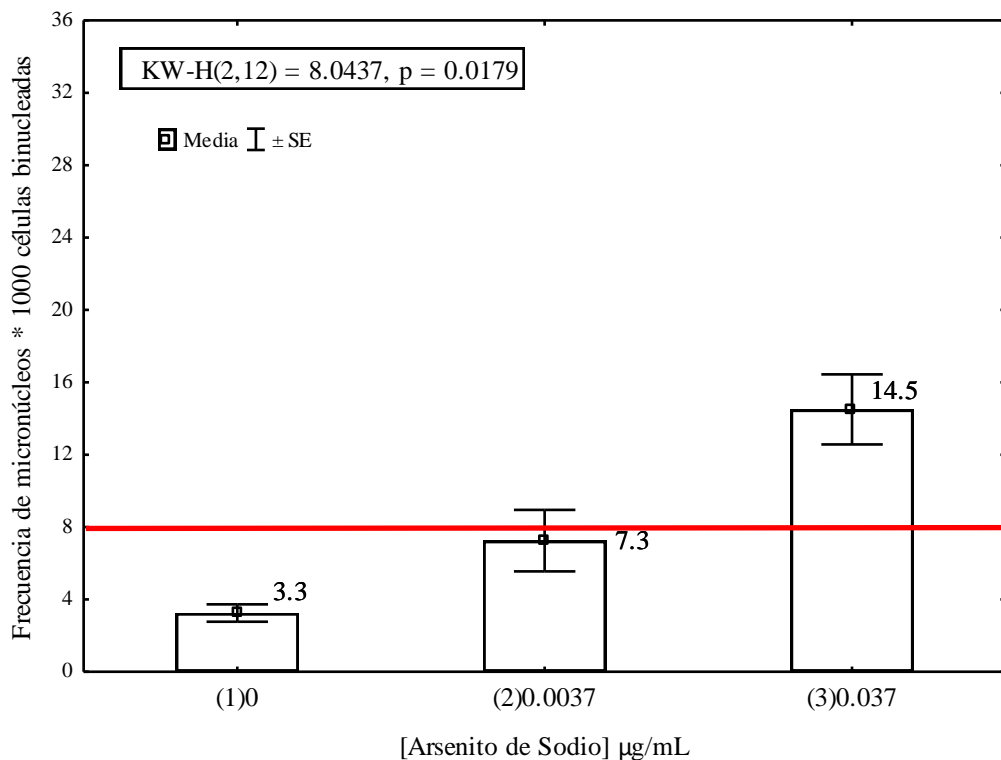


Fig. 8. Frecuencia de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Arsenito de Sodio, por orden de concentración.

⁸ La línea roja representa el promedio de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas contadas de individuos saludables.

Según los resultados de los tratamientos con Arsenito de Sodio (Fig. 8) el número de micronúcleos incrementó en el tratamiento con 0.037 $\mu\text{g/mL}$., sobrepasando, según la literatura, el límite de referencia (línea roja). Esto concuerda con lo reportado por la IARC en 1980 sobre los efectos adversos del Arsénico y sus derivados. De igual manera, Abnosi & Jafari (2012) demostraron que concentraciones bajas de Arsenito de Sodio alteran la viabilidad celular, la morfología del núcleo, la contracción del citoplasma y provocan rupturas en el DNA de células madre mesenquimales de médula ósea de rata. Al igual que lo reportado por Bourdonnay *et al.*, (2009), que sostienen fuertemente la idea de que el Arsenito de Sodio suprime comúnmente la diferenciación y funciones programadas de los macrófagos humanos mediante la sobre-expresión y la supresión de genes relacionados con estas funciones.

Cuando se cultivaron los linfocitos en presencia de Nanopartículas de Plata Argovit® y Selenito de Sodio en el mismo tubo, se observaron diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos de los tratamientos respecto al control (Fig. 9). Además los tratamientos 4 y 5 presentaron un menor número de micronúcleos en comparación con el resto de los tratamientos y el control. No obstante, el número de micronúcleos continuó siendo alto respecto al promedio de número de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas en individuos sanos que es 8 ± 2 micronúcleos (línea roja). $P=0.66$.⁹

⁹ La línea roja representa el promedio de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas contadas de individuos saludables.

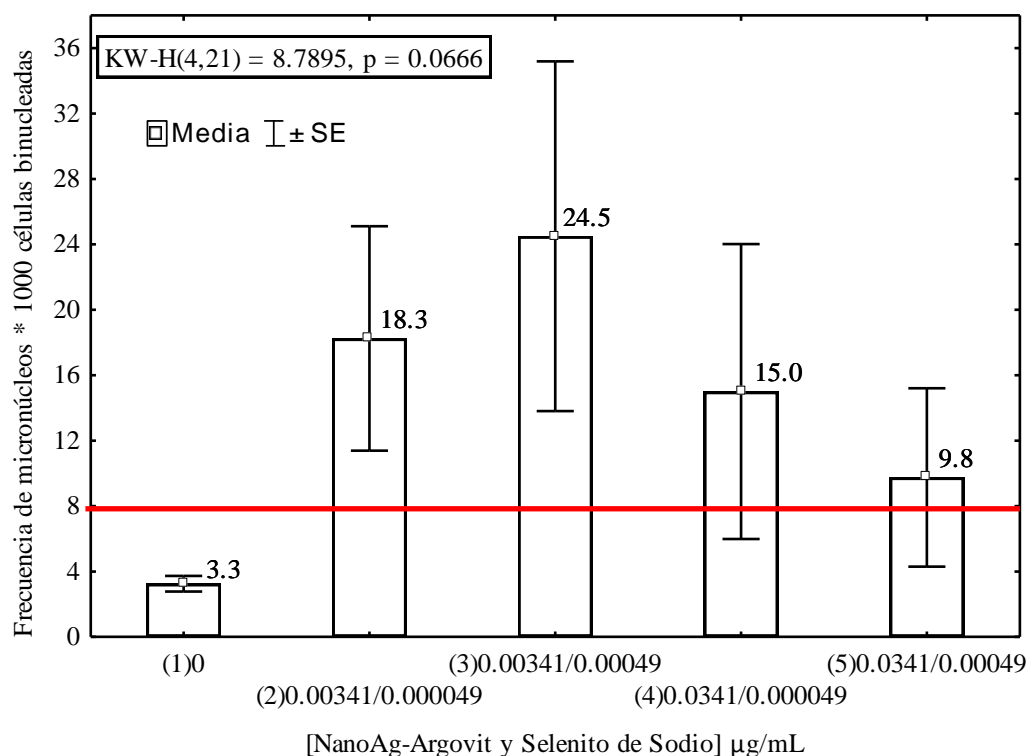


Fig. 9. Frecuencia de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Selenito de Sodio y Nanopartículas de Plata Argovit®, por orden de concentración.

La frecuencia de micronúcleos en los tratamientos con nanoplata Argovit® y Selenito de Sodio muestran un gran incremento (Fig. 9) respecto al control y los límites normales (línea roja). No así para cada uno de los tratamientos por separado (Fig. 6 y 7). Estos resultados podrían tener origen en la naturaleza dual del Selenito de sodio frente a las nanopartículas de Plata Argovit®. Como lo reportado por Cemeli *et al.*, (2006), que sugieren que el incremento de la frecuencia de micronúcleos son altamente dependiente de las condiciones en las que se realicen los experimentos. De igual forma para la nanoplata Argovit®, ya que Kim *et al.*, (2011) reportaron que el rompimiento del DNA y la formación de micronúcleos es dosis-dependiente en células BEAS-2B. Sin embargo, Hebeish *et al.*, (2014) demostraron que las nanopartículas de Plata son eficaces antimicrobianos y tienen gran potencia de cicatrización como el Dermazin. Por otra parte, Munger *et al.*, (2014) reportaron

que la administración oral a individuos sanos de nanoplata no mostró cambios importantes en el metabolismo, hematología, análisis urinarios y tampoco se presentaron cambios morfológicos en pulmones, corazón u órganos abdominales.

En los resultados anteriores, es necesario realizar estudios con mayor profundidad debido a que podría presentarse genotoxicidad potenciada por la conjugación de nanopartículas de Plata con Selenito de Sodio.

En los escenarios en los que se cultivaron los linfocitos con nanopartículas de Plata Argovit® y Arsenito de Sodio se observaron diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos en contraste con el control (Fig. 10). Además, en las concentraciones más altas de nanopartículas de Plata y Arsenito de Sodio (4 y 5) mostraron una disminución del número de micronúcleos sin embargo, estos continuaron siendo altos en comparación con el tratamiento control y los límites de frecuencia de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas en individuos sanos (línea roja). $P= 0.1628$.

En los tratamientos con nanoplata Argovit® y Arsenito de Sodio se observó que el número de micronúcleos aumentó considerablemente respecto al control y a lo reportado como valores normales en la literatura (línea roja, Fig. 10). Este resultado sugiere que la genotoxicidad aumenta en la mezcla de nanoplata Argovit® y Arsenito de Sodio, lo cual coincide con lo reportado por la IARC (1980) sobre los efectos genotóxicos y citotóxicos de los compuestos de arsénico y sus derivados.¹⁰

¹⁰ La línea roja representa el promedio de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas contadas de individuos saludables.

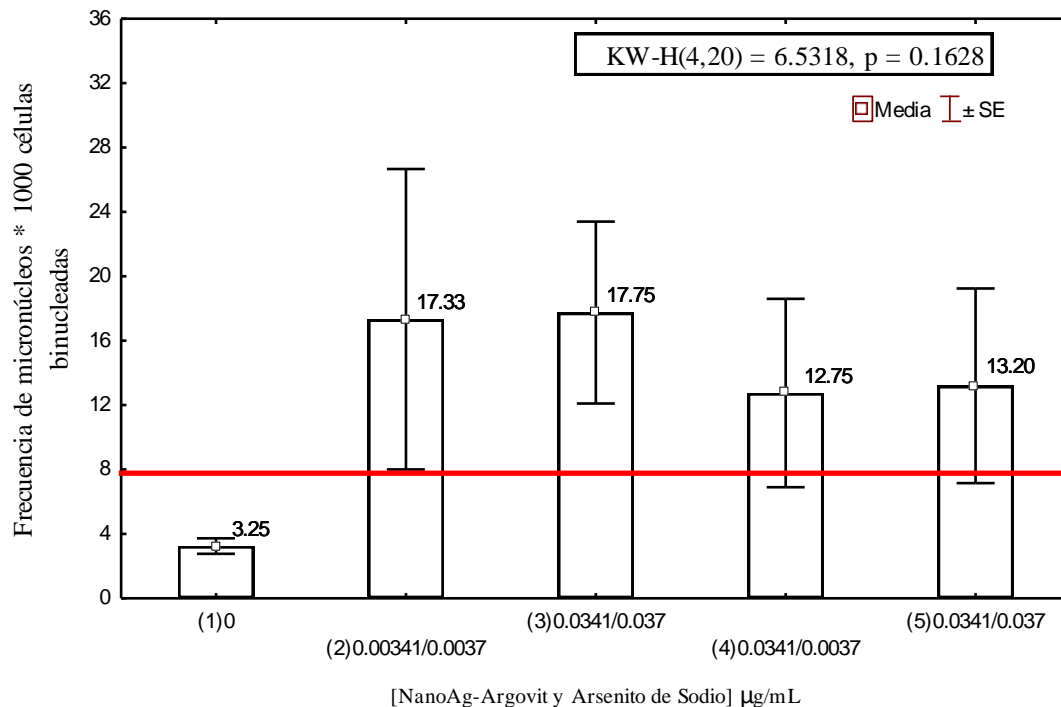


Fig. 10. Frecuencia de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas de los tratamientos de Arsenito de Sodio y Nanopartículas de Plata Argovit®, por orden de concentración.

Al igual que lo reportado por Mordazec *et al.* (2012), quienes demostraron que a concentraciones bajas de arsenito de sodio se redujo la proliferación de celular y se alteró el patrón de citoquinas secretadas por las células T humanas activadas. Por otra parte, Rogers *et al.*, (2014) reportaron que la conjugación de vitamina D3 potencia efectos anti-tumorígenos del Trióxido de Arsénico (TOA), ya que al combinarlos aumenta ligeramente la toxicidad del TOA en células HL-60 y que podría ser usado para tratar la leucemia promielocítica aguda (LPA).

Los resultados presentados de nanoplata Argovit® y Arsenito de Sodio podrían presentar el mismo comportamiento que la vitamina D3 y el TOA, sin embargo, es necesario realizar más estudios para evaluar dicha hipótesis.

DISCUSIÓN GENERAL

Los hallazgos de esta investigación indican que existe evidencia significativa a favor de que las nanopartículas de Plata Argovit® en concentraciones de 0.00341 y 0.0341 µg/mL carecen de la capacidad para producir citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos.

Los bajos niveles de cito/geno toxicidad que se presentaron en los experimentos pueden estar relacionados con las características físicas y químicas de este tipo de nanopartículas de Plata así como el tipo de células cultivadas.

Las nanopartículas de Plata Argovit® que se utilizaron en los experimentos de este trabajo, tienen un diámetro de 0-5 nm y están recubiertas de PoliVinil Pirrolidona (PVP) como agente estabilizador, lo que pudiera mediar el efecto tóxico en los linfocitos, al evitar la interacción directa de la nanoplatina con las células. En contraste, otras investigaciones han demostrado que las NpsAg recubiertas con PVP a dosis de 250µg administradas en ratas producen citotoxicidad y respuesta inflamatoria en los pulmones, así como alteraciones en el sistema inmunológico (Haberl *et al.*, 2013; De Jong *et al.*, 2013). Por otra parte, Nymark *et al.* (2013) no encontraron inducción de aberraciones cromosomales después de las 24 a 48 h de exposición y tampoco causaron formación de micronúcleos después de 48 h, no obstante, detectaron daño al DNA después de las 24-48 h de exposición y la inducción fue dosis dependiente por arriba de los 91.1 µg/mL., proponen que la falta de inducción del daño a cromosomas por las NPsAg cubiertas con PVP es debido a la cubierta la cual pudiera proteger a las células de una interacción directa con las NPsAg, ya sea por la reducción de lixiviación de iones de las partículas o por una gran acumulación de NPs, con una posible reducción de la absorción celular. Otros estudios también sugieren que la talla, la cubierta, la carga en la superficie y las líneas celulares usadas tiene relevancia en el captación de NpsAg y los efectos adversos que se presentan en los ensayos de toxicidad (Ahamed *et al.* 2010; Foldbjerb *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2009).

Estudios recientes indican que existen respuestas celulares distintas respecto a la toxicidad de NpsAg en distintas líneas celulares (HepG2, HT29 y A549), de

igual forma para el rompimiento del DNA y la formación de micronúcleos, sugiriendo que este tipo de respuesta corresponde a factores intrínsecos que definen una “preparación” para el estrés oxidativo y que puede afectar a la respuesta frente a xenobióticos (Kruszweski *et al.*, 2013).

En el caso de las nanopartículas Plata Argovit®, el principal hallazgo es que no se produce citotoxicidad y genotoxicidad significativa en linfocitos humanos con la metodología utilizada en este trabajo. Este fenómeno podría incluir la respuesta celular de cada individuo frente a las nanopartículas de Plata Argovit® como las propiedades físicas y químicas de este tipo de nanoplata, es por esto que, es necesario realizar estudios a mayor profundidad para elucidar las interacciones-respuestas celulares y los mecanismos de acción de este tipo de nanopartículas, especialmente si se quiere utilizar la nanoplata Argovit® para el tratamiento de distintas enfermedades.

Pauksch *et al.*, (2014), afirman que las células procariotas son significativamente más pequeñas que las células eucariotas, por lo tanto ofrecen un blanco más pequeño para las nanopartículas y para la liberación de iones de Plata, por lo que efectos antibacteriales de las nanopartículas de Plata suceden a concentraciones significativamente bajas mientras que la citotoxicidad en células de mamíferos se presenta dosis-dependiente y a concentraciones muy altas. Esto pudiera tener aplicaciones de las nanopartículas de plata en la práctica clínica, sin embargo, es necesario conocer los mecanismos de inducción de estrés y citotoxicidad que sean capaces de predecir riesgos a la salud. Ellos demostraron que a altas concentraciones (30µg/g) de nanoplata se presenta toxicidad.

Por otro lado, se conoce que el Selenio es esencial para la nutrición y tiene un amplio rango de funciones biológicas, y el hecho de que el Selenio es ubicuo en el ambiente aumenta la preocupación acerca de sus propiedades. En los seres humanos, las concentraciones de Selenio en el plasma y la sangre entera provee de indicadores útiles sobre la absorción y el estatus en el organismo. La toxicidad del Selenio depende de la naturaleza del compuesto, particularmente de su solubilidad (Cemeli *et al.*, 2006). Sin embargo, existe evidencia de que el Selenito de Sodio en pequeñas

concentraciones puede conferir protección altamente significativa contra el daño oxidativo, aparentemente por el incremento de la expresión de selenoproteínas mas que un efecto protector del Selenito de Sodio (Miller *et al.*, 2001).

Los ensayos de toxicidad del Selenito de Sodio revelaron su capacidad citotóxica y genotóxica, ya que disminuyó la proliferación celular (Fig. 2) y aumentó la frecuencia de micronúcleos (Fig. 7). Los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad de este estudio concuerdan con lo reportado por Cemeli *et al.* (2006), donde los compuestos de Selenio (Selenato, Selenito y Acido Selenoso) incrementaron la frecuencia de micronúcleos en células TK6 y, además, a altas concentraciones de los mismos compuestos disminuyó significativamente el índice de proliferación celular, mientras que a dosis más bajas tuvo efectos variables, así mismo, las células TK6 fueron más sensitivas que los linfocitos de sangre entera. Los autores afirman que los efectos genotóxicos y antigenotóxicos son altamente dependientes de las condiciones bajo las cuales se realizan los ensayos. En los ensayos realizados por Brown *et al.* (2000), administraron 50 µg de selenito de Sodio, 50 µg Selenometionina y placebo a individuos sanos por 28 días, demostraron que aumento de 60-65% el nivel de Selenio en los eritrocitos de los individuos que lo tomaron, no obstante, el incremento de Selenio en eritrocitos y plasma fue variable y no podía atribuirse a las variaciones en las concentraciones de referencia del Selenio, ya que hubo diferencias en respuesta celular entre los individuos. Estos autores sostienen que la mayor parte del Selenio en la dieta se produce de forma orgánica, ya que como selenocisteína o selenometionina, hace hincapié en que la conversión *in vivo* en un precursor orgánico puede potencialmente ser un importante regulador de la disponibilidad de Selenio. Este control regulador puede conferir protección contra la incorporación excesiva de Selenio en las selenoproteínas durante su síntesis y puede ser de especial importancia en la prevención de la toxicidad de una ingesta excesiva de Selenio.

La naturaleza ambivalente del Selenio en ocasiones es favorable, ya que Said *et al.* (2014), demostraron que al administrar Selenito de Sodio a ratas expuestas a radiación, disminuyó significativamente la apoptosis en los folículos pre-antrales y

antrales, y los niveles de hormona folículo estimulante (FSH) que fueron inducidos por la radiación y promover la folículogénesis, sugiriendo que podría ser útil la administración de Selenito de Sodio para limitar el daño en los ovarios provocado por la radiación en humanos.

Los tratamientos combinados de NpsAg y Selenito de Sodio, reflejaron disminución de la proliferación celular y aumento en el número de micronúcleos (Fig. 4 y 9). Este fenómeno podría relacionarse con lo reportado por Shi *et al.*, (2013) quienes demostraron que el Selenito induce la despolimerización de los microtúbulos en células HL60 *in vivo*, arresto del ciclo celular y producir fragmentación nuclear. Sin embargo, estudios realizados por Abul-Hasan *et al.*, (2004) indican que a concentraciones bajas no se detectó un incremento de aberraciones en la cromátides o rompimiento de cromátides en linfocitos humanos, no así para la concentración de 10 μ M que fue citotóxica en linfocitos primarios.

Podría sugerirse que el efecto citotóxico y genotóxico de la combinación de NpsAg y Selenito de Sodio sea principalmente por la acción del Selenito de Sodio, ya que en los tratamientos por separado, se presentó el mismo efecto cuando el compuesto del Selenito se encontraba solo y no así para el caso de las NpsAg. Probablemente el efecto de la concentración del Selenito de Sodio esté interfiriendo, ya que habría mayor disponibilidad del Selenito (en comparación de las NpsAg) y esto en consecuencia evitaría la formación del huso mitótico y aumento en la frecuencia de micronúcleos. Pese a ello, es necesario realizar estudios con mayor profundidad para dilucidar el verdadero efecto conjugado que se presenta y poder establecer los riesgos-beneficios de tales combinaciones.

En los resultados de este estudio se puede observar la disminución de la proliferación celular (Fig.3) y el aumento en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos (Fig.8), concordando con los múltiples estudios reportados por la IARC-OMS (2012) sobre la toxicidad del Arsénico y sus compuestos. Por otra parte, también se puede observar la disminución de la proliferación celular cuando se hace un tratamiento doble con NpsAg y Arsenito de Sodio (Fig.5) y un aumento en la frecuencia de micronúcleos (Fig. 10) con el mismo tratamiento. Según la IARC

(2012) existe evidencia de que la combinación del Arsénico o alguno de sus compuestos (como el Arsenito de Sodio) con otra sustancia aumenta y/o promueve la formación de tumores.

En el caso de la toxicidad presentada en los cultivos con la combinación de nanopartículas de Plata Argovit® y Arsenito de Sodio, los efectos citotóxicos y genotóxicos observados tendrían su origen en la acción del Arsenito de Sodio sobre los linfocitos ya que la nanoplata Argovit® tiene recubierta e impediría que hubiese interacción directa con los linfocitos en el cultivo, por otra parte, también podría deberse a la interacción de las dos sustancias en las células lo que en consecuencia generaría mayor la caída de la proliferación celular y el aumento en la frecuencia de micronúcleos. A pesar de ello, según el compendio de la IARC (2012) el Arsénico y sus compuestos no reaccionan directamente con el DNA, pero las células con bajas concentraciones de arsenicales exhiben daño oxidativo al DNA, a concentraciones tóxicas hay deleciones y mutaciones a través de especies reactivas de oxígeno, algunos compuestos de Arsénico actúa como aneugenos y clastogenos interfiriendo con la formación del huso mitótico y formado micronúcleos con centrómeros y sin centrómeros, generando también aneuploidía.

A partir de las descripciones expuestas en esta sección y con base en los hallazgos anteriormente expuesto, se puntualizan las siguientes conclusiones:

CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación revelan que en los cultivos con nanopartículas de Plata Argovit® se mantuvo el índice de proliferación celular en los linfocitos a niveles saludables y no se detectó incremento en la frecuencia de micronúcleos por efecto de las nanopartículas de Plata Argovit®.

El Selenito de Sodio produjo una disminución del índice de proliferación celular en los cultivos de linfocitos y se observó el incremento de la frecuencia de micronúcleos en todos los escenarios con Selenito de Sodio.

El Arsenito de Sodio produjo la disminución de la proliferación celular en los cultivos de linfocitos y se observó que aumentó la frecuencia del número de micronúcleos en todos los escenarios con Arsenito de Sodio.

En los escenarios combinados con nanopartículas de Plata Argovit® y Selenito de Sodio se presentó disminución del índice de proliferación célula y aumento de la frecuencia del numero de micronúcleos.

Por otra parte, en los tratamientos combinados de nanopartículas de Plata Argovit® y Arsenito de Sodio se produjo disminución del índice de proliferación celular y se observó que aumento la frecuencia del número de micronúcleos.

Se corroboró la naturaleza bivalente del Selenito y los efectos adversos provocados por la exposición a arsenicales.

Se sugiere, para corroborar la información aquí presentada, ampliar la gama de ensayos de toxicidad con otras concentraciones y otros tipos celulares para tratar de determinar los mecanismos de acción de este tipo de nanoplata, especialmente si se desea utilizar este tipo de nanopartículas para tratar determinadas enfermedades en los seres humanos.

REFERENCIAS

- ABNOSI, M.H. & YAZDI, Z. J. (2012). Low dose and long term toxicity of sodium arsenite caused caspase dependent apoptosis based on morphology and biochemical character. *Cell Journal*. Vol. 14. No. 3.
- ABUL-HASSAN, K., LEHNERT, B.E., GUANT, L., WALMSLEY, R. (2004). Abnormal DNA repair in selenium-treated human cells. *Mutation Research*, Vol. 565, pp. 45-51.
- AHAMED, M., KARNS, M., GOODSON, M., ROWE, J., HUSSAIN, S.M., SCHLAGER, J.J., HONG, Y. (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 233, pp. 404–410.
- AHAMED, M., ALSALHI, M, SIDDIQUI, M.K.J. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 411, pp. 1841-1848.
- ALBANESE, A., TANG, P. .S., CHAN, W.C.W. (2012). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol. 14, pp. 1–16.
- ARCHANA, D., DUTTA, J., DUTTA, P.K. (2013). Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and vivo studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 57, pp. 193-203.
- ARORA, S., JAIN, J., RAJWADE, J.M., PAKNIKAR, K.M. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 236, pp. 310–318.
- ARORA, S., RAJWADE, J.M., PAKNIKAR, K.M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and applied Pharmacology*, Vol. 258, pp. 151-165.
- ASHARANI, PV., PRAKASH HANDE, M., VALIYAVEETIL, S. (2009). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, Vol. 10, No. 65.
- BOURDANNAY, E., MORDAZEC, C., SPARFEL, L., GALIBERT, M.D., JOUNEAU, S., MARTIN-CHOULY, C., FARDEL, O., VERNHET, L. (2009). Global effects of inorganic arsenic on gene expression profile in human macrophages. *Molecular Immunology*, Vol. 46, pp. 649-656.

- BROWN, K.M., PICKARD, K., NICOL, F., BECKETT, G.J., DUTHIE, G.G. (2000). Effects of inorganic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clinical Science*, Vol. 98, pp. 593-599.
- CEMELI, E., MARCOS, R., ANDERSON, D. (2006). Genotoxic and antigenotoxic properties of selenium compounds in the in vitro micronucleus assay with human whole blood lymphocytes and TK6 lymphoblastoid cells. *The Scientific World Journal*, 6, pp. 1202-1210.
- CHALOUPKA, K., MALAM, Y., SEIFALIAN, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, Vol. 28, No. 11, pp. 580-588.
- CHENG-TENG, NG., LI, J.J., BAY, B.H., LANRY YUNG, L.Y. (2010). Current Studies into the Genotoxic Effects of Nanomaterials. *Journal of Nucleic Acids*, Vol. 2010, 12 pages, DOI 10.4061/2010/947859.
- DE JONG, W.H., VAN DER VEN, L. T.M., SLEIJFFERS, A., PARK, M.V.D.Z., JANSEN, E.H.J.M., VAN LOVEREN, H., VANDEBRIEL, R.J. (2013). Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study rats. *Biomaterials*, Vol. 34, pp. 8833-8343.
- DE LIMA, R., SEABRA, A. B., DURÁN, N. (2012). Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles." *Journal of Applied Toxicology*, Vol. 32, No.11 pp. 867- 879.
- FAUSS, E. (2008) The Silver Nanotechnology Commercial Inventory. (Graduate thesis work at the University of Virginia). Recuperado de http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/6718/fauss_final.pdf.
- FENECH, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2. No. 5. Pp. 1084-1104.
- FENECH, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, Vol. 455, pp. 81-95.
- FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S. (1999). The Human micronucleus project –An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, Vol. 428, pp. 271-283.
- FENECH, M. & MORLEY, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*. 147(1-2):29-36.

- FOLDBJERG, R., OLESEN, P., HOUGAARD, M., DANGA, D.A., HOFFMANN, H. J., AUTRUP, H. (2009). PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*, Vol. 190, pp. 156–162.
- GHOSH, M., MANIVANNAN, J., SINHA, S., CHAKRABORTY, A., MALLICK, S. K., BANDYOPADHYAY, M., MUKHERJEE, A. (2012). In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research*, Dec 12;749 (1-2): 60-9.
- GLASER, V., MORITZ, B., SCHMITZ, A., DAFRÉ, A.L., NAZARI, E.M., MÜLLER, Y.M.R., FEKSA, L., STRALIOTTO, M.R., FABRO DE BEM, A., FARINA, M., TEXEIRA DA ROCHA, J.B., LATINI, A. (2013). Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 206, pp. 18-26.
- GREULICH, C., DIENDORF, J., GERMANN, J., SIMON, T., HABIBAN, T., EGGELER, G., SCHILDHAUER, T.A., EPPLE, M., KÖLLER, M. (2011). Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, Vol. 7, pp. 3505–3514.
- HABERL, N., HIRN, S., WENK, A., DIENDORF, J., EPPLE, M., JOHNSTON, B.D., KROMBACH, F., KREYLING, W.G., SCHLECH, C. (2013). Cytotoxic and proinflammatory effects of PVP-coated silver nanoparticles after intratracheal instillation in rats. *Belstein Journal of Nanotechnology*, Vol. 4, pp. 933-940.
- HART, W.E., MARCZEK, S.P., KNELLER, A.R., FRENCH, R.A., MORRIS, D.L. (2013). The abilities of selenium dioxide and selenite ion to coordinate DNA-bound metal ions and decrease oxidative DNA damage. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 125, pp. 1-8.
- HEBEISH, A., EL-RAFIE, M.H., EL-SHEIKH, M.A., SELEEM, A.A., EL-NAGGAR, M.E. (2014). Antimicrobial Wound Dressing and Anti-inflammatory Efficacy of Silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 65, pp. 509–515.
- JIANG, X., CHEN, C., ZHAO, W., ZHANG, Z. (2013). Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in A549 cells: An implication for the paradoxical mechanism. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 36, pp. 891-902.
- JIA'AN LI, J., MURALIKRISHNAN, S., CHENG-TENG, NG., LANRY, L. Y., BAY, B. H. (2010). Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 235, pp. 1025-1033.

- KIM, J. S., SUNG, JAE, H., JI, J. H., SONG, K. S., LEE, J. H., KANG, C. S., YU, J. (2011). In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure. *Safety and Health at Work*, 2:34-8.
- KIM, Y. J., YANG, S. I., RYU, J. C. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines. *Molecular & Cell Toxicology*, Vol. 6, pp. 119-125.
- KRUSZWESKI, M., GRĄDZKA, I., BARTŁOMIEJCZYK, T., CHWASTOWSKA, J., SOMMER, S., GRZELAK, A., ZUBEREK, M., LANKOFF, A., DUSINSKA, M., WOJEWODZKA, M. (2013). Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles. *Toxicology Letters*, Vol. 219, pp. 151-159.
- LAMB, J. G., HATHAWAY, L. B., MUNGER, M.A., RAUCY, J.L., FRANKLIN, M. R. (2010). Nanosilver particle effects on Drug metabolism in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 38, Num. 12, pp. 2246-2251.
- LI, Z., MENG, J., XU, T.J., QIN, X.Y., ZHOU, X.D. (2013). Sodium Selenite induces apoptosis in colon cancer cells via Bax-dependent mitochondrial pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, Vol. 17, pp. 2166-2171.
- LI, Y., CHENB, D. H., YANA, J., CHENA, Y., MITTELSTAEDTA, R. A., ZHANGC, Y., BIRIS, A.S., HEFLICHA, R. H., CHEN, T. (2012). Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutation Research*, Vol. 745, pp. 4-10.
- LOVE, S.A., MAURER-JONES, M. A., THOMPSON, J. W., LIN, Y.S., HAYNES, C. L. (2012). Assessing Nanoparticle Toxicity. *Annual Review of Analytical Chemistry*, Vol. 5, pp. 181-205.
- MILLER, S., WALKER, S.W., ARTHUR, J.R., NICOL, F., PICKARD, K., LEWIN, M. H., HOWIE, A. F., BECKETT, G.J. (2001). Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase. *Clinical Science*, Vol. 100, pp. 543-550.
- MORDAZEC, C., BOUEZZEDINE, F., MACOCH, M., FARDEL, O., VERNHET, L. (2012). Inorganic arsenic impairs proliferation and cytokine expression in human primaty T lymphocytes. *Toxicology*, Vol. 300, pp. 46-56.
- MUNGER, M.A., RADWANSKI, P., HADLOCK, G.C., STODDARD, G., SHAABAN, A., FALCONER, J., GRAINGER, D.W., DEERING-RICE, C.E. (2014). In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Vol. 10, pp. 1-9.

- MÜHLING, M., BRADFORD, A., READMAN, J.W., SOMERFIELD, P.J., HANDY, R.D. (2009). An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Marine Environmental Research*, Vol. 68(5), pp. 278-283.
- NYMARK, P., CATALANA, J., SUHONENA, S., JÄRVENTAU, H., BIRKEDAL, R., CLAUSEN, P. A., JENSEN, K. A., VIPPOLA, M., SAVOLAINEN, K., NORPPA, H. (2013). Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, Vol. 313, pp. 38-48.
- PAUKSCH, L., HARTMANN, S., ROHNKE, M., SZALAY, G., ALT, V., SCHNETTLER, R., LIPS, K.S. (2014). Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomaterialia*, Vol. 10, pp. 439-449.
- 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*, Vol. 32, pp. 9810-9817.
- ROGERS, C.S., YEDJOU, C.G., SUTTON, D.J., TCHOUNWOU, P.B. (2014). Vitamin D3 potentiates the antitumorigenic effects of arsenic trioxide in human leukemia (HL-60) cells. *Experimental Hematology and Oncology*, Vol. 3, pp. 9
- ROSARIN, S. F. & MIRUNALINI, S. (2011). Nobel Metallic Nanoparticles with Novel Biomedical Properties. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, Vol. 3:4.
- SHI, K., JIANG, Q., LI, Z., SHAN, L., LI, F., AN, J.J., YANG, Y., XU, C. (2013). Sodium selenite alters microtubule assembly and induces apoptosis in vitro and in vivo. *Journal of Hematology & Oncology*, Vol. 6:7.
- SAID, R.S., BADR, A. M., NADA, A. S., EL-DEMERDASH, E. (2014). Sodium Selenite treatment restores long-lasting ovarian damage induced by irradiation in rats: Impact on oxidative stress and apoptosis. *Reproductive Toxicology*, Vol. 43, pp. 85-93.
- SINGH, N., MANSHIAN, B. , JENKINS, G.J.S., GRIFFITHS, S. M., WILLIAMS, P. M., MAFFEIS, T. G.C., WRIGHT, C. J., DOAK, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 3891-3914.

SPYROU, G., BJÖRNSTEDT, M., SKOG, S. (1996). Selenite and Selenate inhibit human lymphocyte growth via different mechanisms. *Cancer Research*, Vol. 56, pp. 4407-4412.

STENSBERG, M. C., WEI, Q., MCLAMORE, E.S., PORTERFIELD, D.M., WEI, A., SEPÚLVEDA, M.S. (2011). Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine* (Lond), Vol. 6(5), pp. 879-898.

WANG, F., SHU, G., PENG, X., FANG, J., CHEN, K., CUI, H., CHEN, Z., ZUO, Z., DENG, J., GENG, Y., LAI, W. (2013). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 10, pp. 2834-2844.

XU, L., LI, X., TAKEMURA, T., HANAGATA, N., WU, G., CHOU, L. L. (2012). Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. *Journal of Nanobiotechnology*, Vol. 10:16.

EKWALL, B., SILANO, V., PAGANUZZI-STAMMATI, A., ZUCCO, F. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. En: Bourdeau, P.; Sommers, E.; Mark Richardson, G.; Hickman, J.R. Short-term toxicity test for non-genotoxic effects. John Wiley and Sons Ltd. 1990.

LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA INVESTIGACIÓN PARA LA SALUD. (2012). Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de Enero 1987. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Reforma DOF 02-04-2014.

NORMA OFICIAL MEXICANA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL-SALUD AMBIENTAL-RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS-CLASIFICACIÓN Y ESPECIFICACIONES DE MANEJO. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Publicada el 17 de Febrero de 2003. Diario Oficial de la Federación.

DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, Junio 1964.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to man. Some aziridines, N-, S- & O- mustards and selenium. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Volume 9 (1975), pp. 245-260. Recuperado de <http://www.iarc.fr/en/publications/list/monographs/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. A review of Human Carcinogens. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. 1979, 1987, 2002 (IARC, 1980, 1987, 2004). Volume 100 C. (2012). Recuperado de <http://www.iarc.fr/en/publications/list/monographs/>

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support Final Report. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More. EPA/600/R-10/084. (2010). Varner, K.; Sanford, J. El-Badawy, A.; Feldhake, D.; Venkatapathy, R. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development Washington, DC 20460.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Varner, K. E., El-Badawy, A., Feldhake, D., Venkatapathy, R. State-Of-The-Science Review: Everything NanoSilver and More. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-10/084, 2010. Recuperado de http://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=226785&fed_org_id=770&SIType=PR&TIMSType=Published+Report&showCriteria=0&address=nerl/pubs.html&view=citation&sortBy=pubDateYear&count=100&dateBeginPublishedPresented=01/01/2010.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Guidance for Industry S2 (R1) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. (2012). Recuperado de www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm074931.pdf

ANEXOS: Dictamen de aprobación del protocolo por el Comité de Bioética

Dictamen de aprobación del protocolo de investigación por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Tijuana.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

Tijuana, Baja California, 08 de enero del 2014
Oficio No. 05/2014-1

DRA. MARÍA EVARISTA ARELLANO GARCÍA
Presente.-

Por medio de este conducto, me permito informarle que se sometió a revisión a la Comisión de Bioética de esta Facultad, la revisión del proyecto de investigación titulado "EVALUACIÓN DE EFECTOS CITO/GENO TÓXICO DE NANOPARTICULAS DE PLATA ARGOVIT EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO.", el cual tuvo como resultado un dictamen APROBATORIO (se anexa).

Sin más por el momento, me despido de usted enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

DR. ALFREDO RENÁN GONZÁLEZ RAMÍREZ
DIRECTOR

Cajón Dra. Adriana C. Vargas Ojeda - Coordinadora de Investigación P&I
Cajón Dirección
Inca

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
CAMPUS TIJUANA

RECIBIDO
JAN 08 2014
RECIBIDO
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
CAMPUS TIJUANA

ANEXOS: Dictamen de aprobación del protocolo por el Comité de Bioética.

Dictamen de aprobación del protocolo de investigación por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Tijuana.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
Comité de Bioética**

Tijuana, Baja California a 8 de Enero del 2014.

**DR. ALFREDO RENÁN GONZÁLEZ RAMÍREZ
DIRECTOR FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
PRESENTE.**

Por medio del presente y aprovechando para extenderle un cordial saludo se le notifica que, después de revisar la solicitud de revisión del proyecto de investigación con título:

"Evaluación de efectos cito/geno tóxicos de nanopartículas de plata Argovit en cultivos de linfocitos humanos in vitro ."

I.P.: Dra. María Evarista Arellano García

en comisión específica integrada por la Lic. Psic. Guillermina Medina y por el Dr. Miguel Ángel Fraga Vallejo, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología, ha decidido el siguiente dictamen:

APROBADO

Los fundamentos para dicha decisión se basan en que es un proyecto clasificado "Categoría II. Con riesgo mínimo" de acuerdo al Artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud por haber cumplido con las características para dicho nivel, además de cubrir los requisitos de privacidad y respeto a los sujetos en investigación durante todo el proceso y manejo de la información obtenida. El proceso de intervención a través de extracción de sangre se encuentra dentro del rango para esta categoría. El consentimiento informado cubre con todos los requisitos necesarios marcados por la LGS.

La presente aprobación es para su aplicación en un periodo no mayor a **DOS AÑOS** a partir de la fecha del dictamen; cualquier cambio al protocolo requiere de notificación a este Comité en un periodo no mayor a 15 días para mantener la vigencia del mismo.

Sin más por el momento, quedo de Usted como su S.S.

Atentamente
"Por la Realización Plena del Hombre"

**Dr. Miguel Ángel Fraga Vallejo
Comité de Bioética FMyP**

C.c.p. Archivo Comité de Bioética / D94



ANEXOS: Carta de Consentimiento Informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ leí y comprendí la información anterior. Mis preguntas se respondieron de manera satisfactoria. Además, se me informo y entendi que los resultados que se obtengan en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

SI	NO
----	----

Acepto participar en el estudio y

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

No autorizo que se tome la muestra.

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros

Firma del participante, padre o tutor

Lugar y Fecha

Nombre y firma del testigo

Lugar y Fecha

Nombre y firma del testigo

Lugar y Fecha

Esta parte será llenada por el investigador o su representante.

Le explique al Sr (a) : _____ el propósito del proyecto, los riesgos y beneficios que implica su participación.

Se contestaron sus preguntas en la medida posible y pregunte si existía alguna duda para aclararla.

Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre y firma del investigador

Lugar y fecha

ANEXOS: Cuestionario de estilos de vida y frecuencia diaria de alimentos.

Instrucciones:

En el siguiente cuestionario deberá marcar solo una de las respuestas e indicar de la manera más precisa la información que se le solicita.

Si tiene alguna pregunta o algo no es claro para usted, no dude en pedir ayuda.

HISTORIAL DE CANCER, ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS,
NEURO-DEGENERATIVAS Y OTRO TIPO DE ENFERMEDADES.

Pregunta	Si	No	No se
¿Usted ha padecido o tiene algún tipo de cáncer?			
¿Usted ha padecido o tiene alguna enfermedad crónico-degenerativa, como diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebro vasculares, otras?			
¿A usted le han diagnosticado o tiene alguna enfermedad neuro-degenerativa como Parkinson, Alzheimer, otras?			
¿Ha sufrido o tiene alguna enfermedad que le impida realizar sus actividades cotidianas? ¿Cuál? _____			
¿Usted sabe si es alérgico? Especifique el tipo de alergia _____			
¿Ha recibido o se encuentra en tratamiento para controlar su alergia?			

ANEXOS: Cuestionario de estilos de vida y frecuencia diaria de alimentos.

CONSUMO DE TABACO, ALCOHOL Y OTRAS SUSTANCIAS

Pregunta	Si	No	No se
¿Usted fuma tabaco? Con qué frecuencia consume dicho producto? Cuantos? _____ Cada cuanto? _____			
¿Usted ha padecido o tiene alguna enfermedad relacionada con el consumo de tabaco? ¿Cuál? _____			
En su casa, ¿convive con alguien que fuma?			
En el lugar donde usted estudia o trabaja convive con fumadores.			
¿Usted ingiere bebidas alcohólicas?			
¿Usted ha consumido o consume sustancias psicotrópicas (drogas)?			

EXPOSICIÓN A SUSTANCIAS TÓXICAS

Pregunta	Si	No	No se
¿Usted estuvo o está expuesto a sustancias tóxicas? ¿Con qué frecuencia está usted expuesto a estas sustancias tóxicas? Siempre _____ Ocasionalmente _____ Nunca _____			
¿Usted ha padecido o tiene alguna enfermedad relacionada por estar expuesto a sustancias tóxicas? Indique cual.			

ACTIVIDAD FISICA Y ALIMENTACION

Pregunta	Si	No	No se
¿Usted realiza actividad física? ¿Qué tipo de actividad física y con qué frecuencia la realiza? _____ Frecuencia: _____			

ANEXOS: Cuestionario de estilos de vida y frecuencia diaria de alimentos.

¿Cuántas veces come durante el día? _____

¿Usted toma agua? Si ___ No ___ ¿Cuánta agua consume al día? _____

¿Cuántas horas duerme diariamente? _____

Medición Antropométrica: Estatura: _____ Peso: _____ IMC: _____

ANEXOS: Cuestionario de estilos de vida y frecuencia diaria de alimentos.

Alimentos o grupos de alimentos	Veces por semana
Carnes procesadas: Jamón, salchichas, tocino, etc.	
Carnes rojas: Carne de res, puerco, cordero, carne de hamburguesa.	
Pescado y mariscos: Atún enlatado, pescados de carne oscura, camarón, langosta, almejas, ostiones, otros pescados.	
Aves: Pollo o pavo sin o con piel.	
Huevos	
Mantequilla	
Margarina	
Productos bajos en grasa: Leche baja en grasa, helados de leche, yogurt	
Productos altos en grasa: Leche entera, crema, crema acida, helados, queso crema, quesos.	
Licores: Vino, Vino rojo, vino blanco, Cerveza	
Te	
Café	
Fruta: Pasas o uvas, aguacate, plátanos, melón, sandía, manzanas frescas, peras, naranjas, toronja, fresas, moras azules, duraznos, nectarina, ciruelas.	
Jugos de frutas: Jugo de manzana o cidra, jugo de naranja, jugo de toronja, otros jugos de frutas.	
Vegetales crucíferos: Brócoli, ensalada de col y col cruda, repollo cocido, coliflor, coles de Brúcela, col rizada, mostaza y acelga.	
Vegetales amarillo oscuros: Zanahoria, calabacín amarillo, camote.	
Tomates: Tomates, jugo de tomate, salsa de tomate.	
Vegetales de hoja verde: Espinaca, lechuga orejona, lechuga romana.	
Leguminosas: Ejotes, chicharos, frijoles, lentejas, tofu o soya, alfalfa.	
Otros vegetales: Apio, hongos, chiles verdes, maíz, vegetales mixtos, berenjena, calabaza.	
Ajo.	
Papas a la francesa	
Papas	
Granos enteros: Avena, otros cereales para el desayuno, pan de trigo, arroz de trigo, otros granos, germen de trigo.	
Cereales fríos	
Granos refinados: Pan blanco, panquesitos, panecillos, bisquets, arroz blanco, pasta, pan dulce, waffles.	
Pizza.	
Snacks: Papas fritas, maíz frito, palomitas de maíz, galletas	
Nueces: Cacahuete, otras nueces, mantequilla de cacahuete.	
Bebidas con alta energía: Soda con azúcar, bebidas carbonatadas con azúcar, bebidas de frutas.	
Bebidas con baja energía: Soda dietética, otras bebidas carbonatadas con baja energía.	
Aderezos de aceite y vinagre para ensaladas.	
Mayonesa y otros aderezos cremosos.	
Sopas de pasta o cremas de sopa	

ANEXOS: Cuestionario de estilos de vida y frecuencia diaria de alimentos.

Otras sopas: Sopa hecha en casa, sopas preparadas.	
Dulces y postres: Chocolates, barras de dulce, brownies, donas, pasteles, pie, pan dulce.	
Condimentos: Salsa de chile (seca o preparada), mostaza, chile, salsa de soya, mermelada, jarabe de maíz, miel.	

ANEXOS: Escenarios de cultivos, valor de Kruskal-Wallis (H), P, concentración y media del Índice de proliferación celular por cada 500 células contadas.

Tabla 2. Escenarios de los cultivos, con el respectivo valor de Kruskal-Wallis (H), P, concentración y la media del Índice de Proliferación Celular por cada 500 células contadas

Escenario	K-W(H)	p	Concentración (µg/mL.)			
			Media del Índice de proliferación			
Control	N/O		0			
			1.65			
Selenito de Sodio	2.698	0.4405	0.000049 µg/mL	0.00049 µg/mL		
			1.396	1.364		
Arsenito de Sodio	11.548	0.0091	0.037 µg/mL	0.0037 µg/mL		
			1.539	1.374		
Nanoplata	1.388	0.7081	0.0341 µg/mL	0.00341 µg/mL		
			1.574	1.551		
Selenito de Sodio/Nanoplata	10.92	0.28	0.0341/0.00049 µg/mL	0.0341/0.000049 µg/mL	0.00341/0.00049 µg/mL	0.00341/0.000049 µg/mL
			1.548	1.389	1.411	1.470
Arsenito de Sodio/Nanoplata	19.69	0.0199	0.0341/0.037 µg/mL	0.0341/0.0037 µg/mL	0.0034/0.037 µg/mL	0.00341/0.0037 µg/mL
			1.327	1.458	1.241	1.382

ANEXOS: Escenarios de cultivos, valor de Kruskal-Wallis (H), P, concentración y media de de la Frecuencia del Número de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas.

Tabla 3. Escenarios de los cultivos, con el respectivo valor de Kruskal-Wallis (H), P, concentración y la media de la Frecuencia del Número de Micronúcleos por cada 1000 células binucleadas.

Escenario	K-W(H)	p	Concentración (µg/mL.)			
			Media del Numero de Micronúcleos			
Control	N/O		0			
			3.25			
Selenito de Sodio	5.99	0.112	0.000049 µg/mL	0.00049 µg/mL		
			2.0	1.75		
Arsenito de Sodio	10.14	0.017	0.037 µg/mL	0.0037 µg/mL		
			5	1.50		
Nanoplata	3.30	0.35	0.0341 µg/mL	0.00341 µg/mL		
			1.50	2.75		
Selenito de Sodio/Nanoplata	14.59	0.10	0.0341/0.00049 µg/mL	0.0341/0.000049 µg/mL	0.00341/0.00049 µg/mL	0.00341/0.000049 µg/mL
			3.0	3.75	2.0	5.0
Arsenito de Sodio/Nanoplata	24.23	0.004	0.0341/0.037 µg/mL	0.0341/0.0037 µg/mL	0.0034/0.037 µg/mL	0.00341/0.0037 µg/mL
			1.0	1.75	2.75	2.50

ANEXOS: Fotografías de daños genotóxicos en linfocitos binucleados.

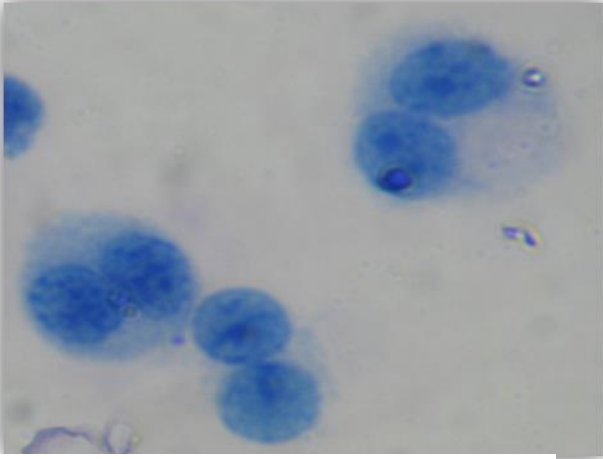


Fig. 11. Linfocito binucleado. 100X

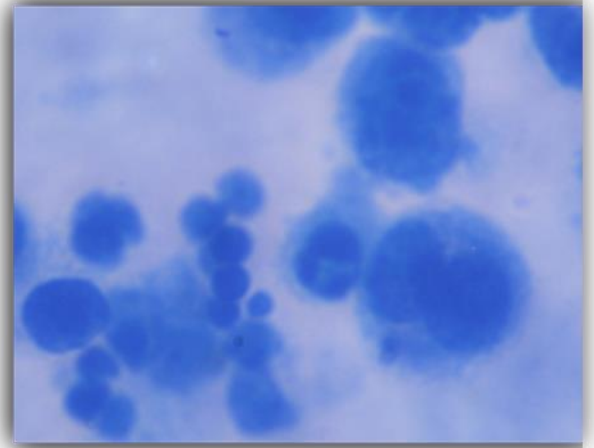


Fig.12. Linfocito binucleado. 100X

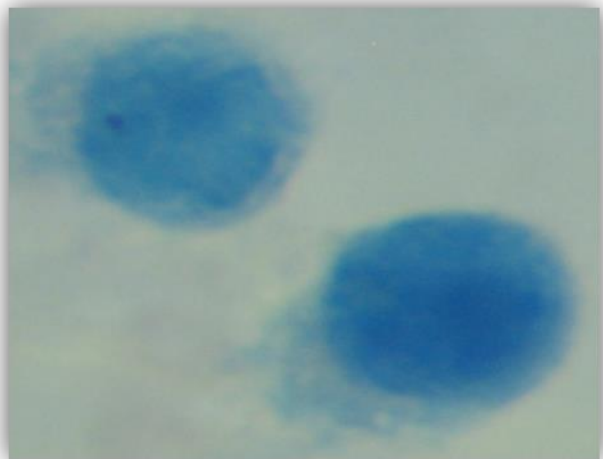


Fig. 13. Linfocito mononucleado. 100X

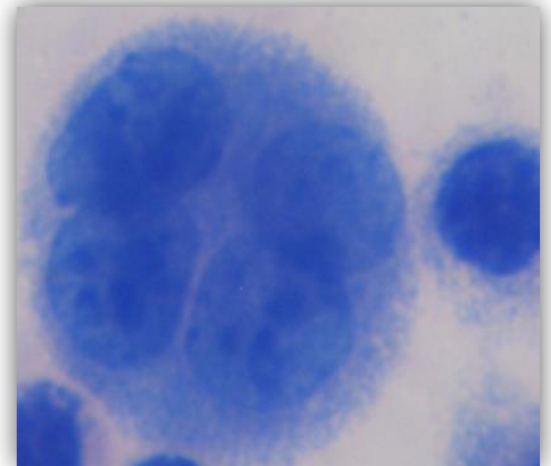


Fig. 14. Linfocito tetranucleado. 100X

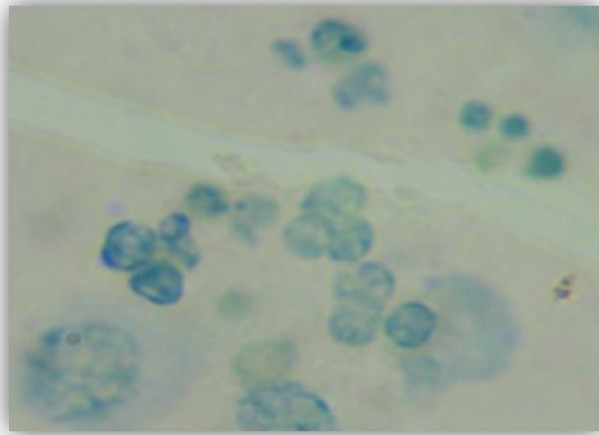


Fig. 15. Linfocitos en cultivo. 10X

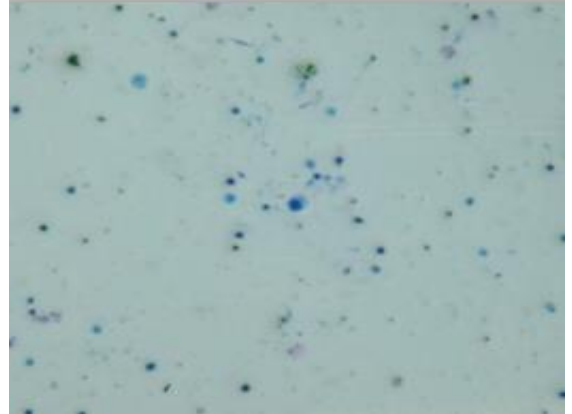
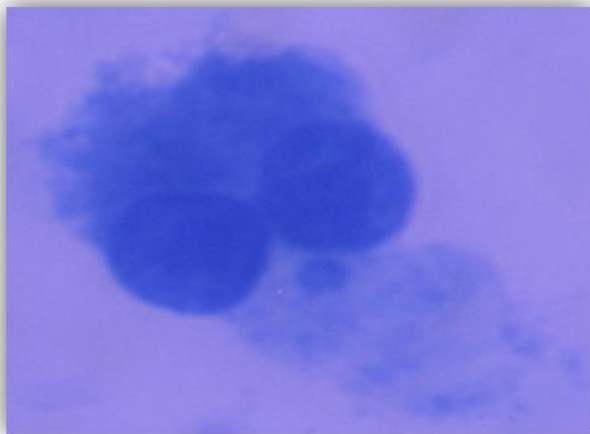
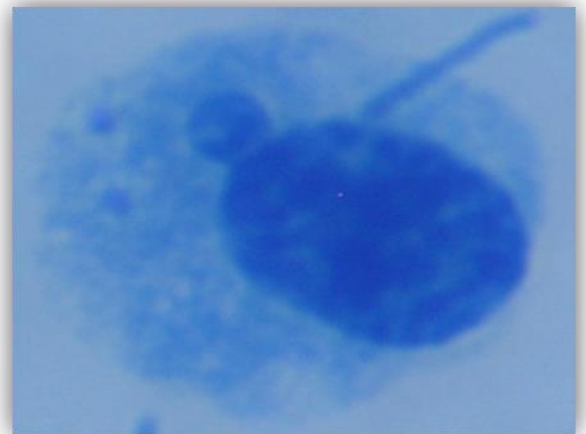


Fig. 16. Linfocitos en cultivo. 10X



**Fig. 17. Linfocito binucleado con micronúcleo.
100X**



**Fig. 18. Linfocito mononucleado con
yema nuclear (bud). 100X.**

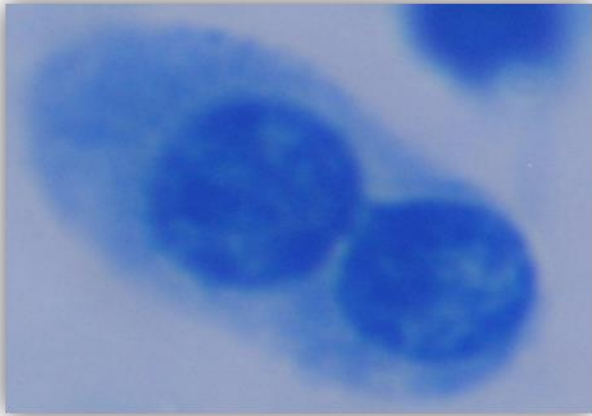


Fig. 19. Linfocito binucleado con puente de cromatina. 100X.

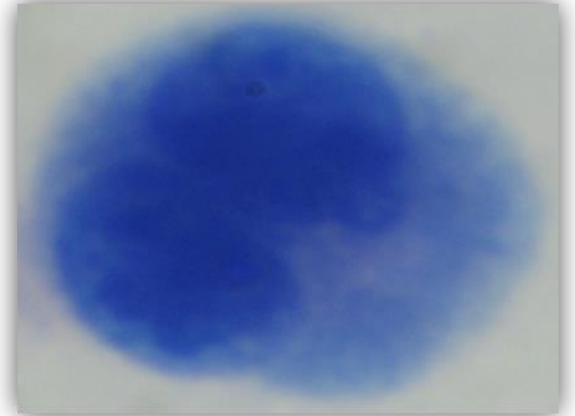


Fig. 20. Linfocito binucleado con yema nuclear (bud). 100X.

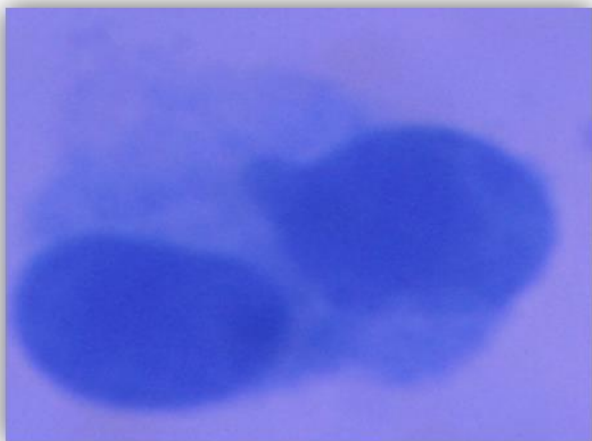


Fig. 21. Linfocito binucleado con yema nuclear (bud). 100X

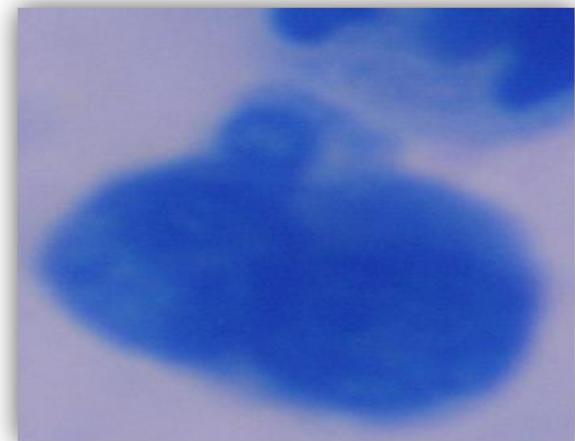


Fig.22. Linfocito binucleado con yema nuclear (bud). 100X

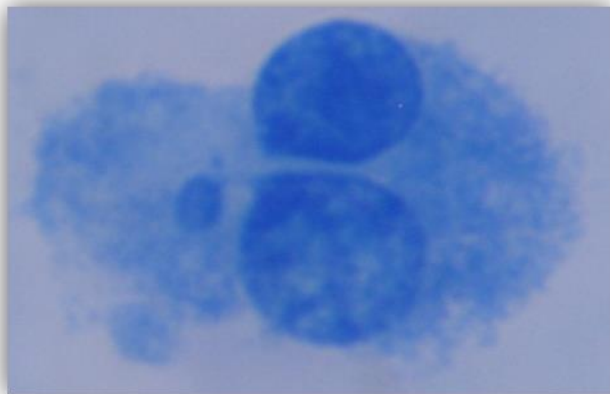


Fig. 23. Linfocito binucleado con yema nuclear (bud) 100X.

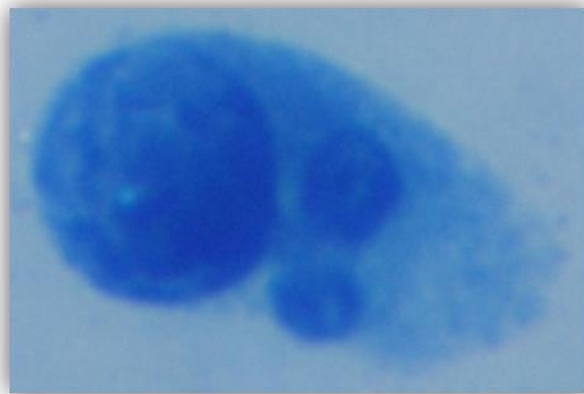


Fig. 23. Linfocito mononucleado con yema nuclear. 100X.

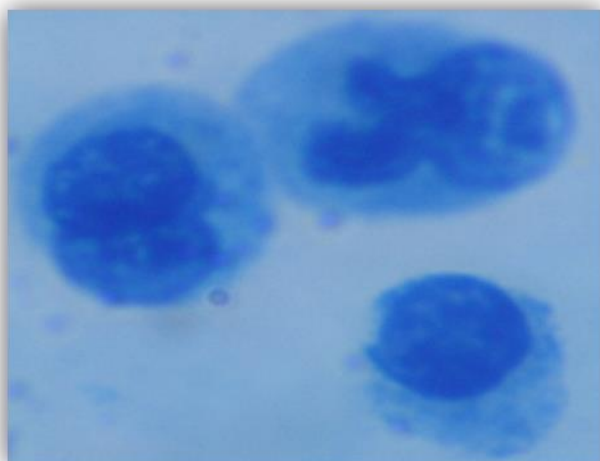


Fig. 24. Linfocito binucleado (izq. arriba), mononucleado con yema nuclear (bud) (der. arriba), mononucleado (der. abajo).

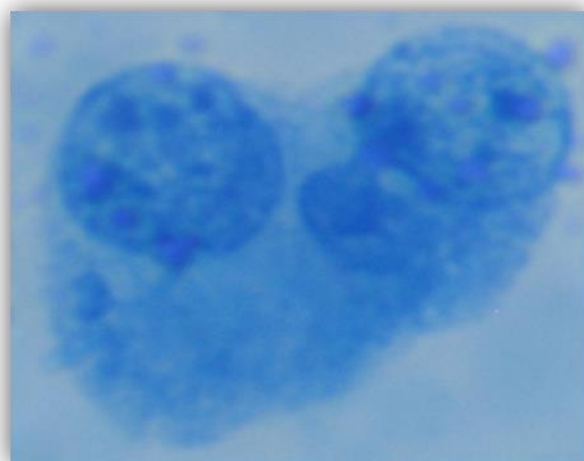


Fig.25. Linfocito binucleado con yemas nucleares (buds).

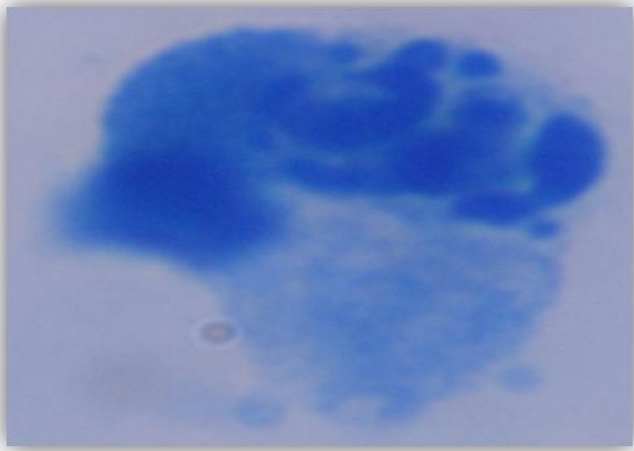


Fig.26. Linfocito en apoptosis. 100X