

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERIA

“EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
EN LINFOCITOS HUMANOS”

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

BALAM RUIZ RUIZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. SEPTIEMBRE 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

“EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
EN LINFOCITOS HUMANOS”

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

BALAM RUIZ RUIZ

Aprobado por:



---

DRA. MARÍA EVARISTA ARELLANO  
GARCÍA

Director de tesis  
Presidente del Comité



---

DRA. NINA BOGDANCHIKOVA  
Co-director de tesis  
Miembro del Comité



---

DR. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS  
Sinodal  
Miembro del Comité



---

DRA. PATRICIA RADILLA CHÁVEZ  
Sinodal  
Miembro del Comité



---

DR. DAVID SERGIO SALAS VARGAS  
Sinodal  
Miembro del Comité

## DEDICATORIA

*Este trabajo está dedicado a Dios por el regalo de la vida.*

*A mi familia Ruiz Romero, mi amada esposa Adriana y mis amados hijos Alexa y Adrián Balam, sin duda son el motor de mi desarrollo y son parte fundamental de este trabajo.*

*A mi familia, mi padre Héctor Ruiz Romero y mi madre Julieta Ruiz Suarez, mis hermanos Katya y Eliu, su confianza y apoyo son muy importantes para mí.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a DIOS por el regalo de la vida y por permitir que esto sea hoy una realidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca número 227890/208648 para estudios de Doctorado durante el periodo correspondiente al 01 de agosto de 2015 al 31 de julio de 2019.

Agradezco al Universidad Autónoma de Baja California (UABC), al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI) con sede en Facultad de Ciencias, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco el apoyo de los proyectos: PAPIIT-UNAM IT200114, así como al proyecto CONACYT No. 270242, Redes 279889 otorgados a la Red Internacional de Bionanotecnología con Impacto en Biomedicina y Bioseguridad por facilitar los recursos necesario para los experimentos de este trabajo.

Agradezco de manera muy especial a la Dra. María Eavarista Arellano García por creer y confiar en mí, aun en virtud de mis limitaciones, muchas gracias Mtra Eva, de corazón se lo digo, siempre ha sabido como guiarme y llevarme hacia adelante en mí desarrollo profesional y personal, sin su confianza y apoyo no me encontraría en esta etapa.

A la Dra. Nina Bogdanchikova por el gran ejemplo de trabajo y disciplina que se necesita para generar nuevo conocimiento, es el vivo ejemplo de tesón y fortaleza para llevar a cabo esta tarea, muchas gracias.

Gracias al Dr. Juan Carlos García Ramos y la Dra Yanis Toledano Magaña, por la gran ayuda que fueron y son para sacar adelante el trabajo, son un repositorio de opciones para hacer las cosas tanto en el laboratorio como fuera de él, muchas gracias, es muy bueno tenerlos como amigos.

A la Dra. Patricia Radilla Chávez y al Dr. David Sergio Salas Vargas, muchas gracias por confiar en mí y por ser parte fundamental de este proceso de formación.

A mis amigos, compañeros, hermanos, cómplices y demás, Roberto Luna (Ingeniero) y Francisco Casillas (Pancho), muchas gracias por todo el apoyo en cada momento de esta travesía, la verdad sin ustedes no hubiese sido igual, se disfruta mucho su compañía en todos los sentidos, académicos y no académicos, muchas gracias jóvenes del cuarto y quinto piso.

Al Dr. Roberto Romo Martínez, muchas gracias por sus incomparables clases de Física Cuántica, como olvidar cuando nos poníamos a filosofar en la importancia de la Física Cuántica para entender y explicar algunos procesos biológicos, gracias Dr.

Agradezco mucho a Vero por la dedicación y el empeño al trabajo para determinar los biomarcadores de daño, horas y horas frente al microscopio, muchas gracias Vero.

Agradezco al donador sano por proporcionar las muestras biológicas para llevar a cabo este trabajo.

Agradezco a la escuela de Ciencias de la Salud, a sus directoras la Dra. Patricia Radilla (actual) y la Dra. Lynnette Amparo Velasco Aulcy (periodo anterior) por permitirme usar las instalaciones de la escuela y hacer experimentos para este trabajo, muchas gracias.

Agradezco a mi familia de Ensenada al Mtro. Pedro Ruiz y la Dra. Evarista Arellano, muchas gracias por su adopción verbal pero muy real, han sido fundamentales en mi formación.

Además de dedicarle este trabajo, agradezco mucho a mi amada esposa Adriana y mis amados hijos Alexa y Adrián Balam, son el motor que me impulsa a seguir adelante haciendo cosas que me gusta hacer, muchas gracias por toda la paciencia y por entender mucho de lo relacionado a este proceso de formación, los quiero mucho.

Siempre quedan personas y momentos que agradecer, por ello en estas líneas vaya mi agradecimiento a esas personas y momentos que talvez ni siquiera supe que pasaron, pero fueron parte importante de esto, muchas gracias.

## RESUMEN

Las nanopartículas de plata (AgNPs, por sus siglas en inglés) son los nanomateriales más utilizados en todo el mundo debido a sus notables propiedades antibacterianas, antivirales y antitumorales, entre otras. Sin embargo, la información sobre su potencial genotóxico y citotóxico es controversial. En el presente trabajo se evaluó el efecto de las nanopartículas de plata sobre linfocitos de sangre periférica humana en cultivos *in vitro* de donadores masculinos sanos, con base en el modelo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN), recomendado por la OCDE para evaluar daño genotóxico y citotóxico. Se comparan dos formulaciones comerciales de AgNPs: Argovit® y nanoCompsix® en concentraciones de 0.012 a 12 µg/mL, utilizando el arsenito de sodio (0.12 µg/mL) como control positivo de generación de micronúcleos. Ambas formulaciones de AgNPs están recubiertas por polivinilpirrolidona (PVP) y tienen algunas propiedades fisicoquímicas similares. Los resultados del CBMN, muestran que las nanopartículas de plata Argovit™ en concentraciones de 0.012 a 12 µg/mL presentan indicios de mayor citocompatibilidad con linfocitos humanos, en comparación con las nanopartículas de plata nanoCompsix®, las cuales en las mismas concentraciones ensayadas, presentaron más necrosis, aumento de la frecuencia de los brotes nucleares (NBUDs) y de puentes nucleoplasmicos (NPBs), aunque no se observaron cambios en el índice de división nuclear ni aumentaron la frecuencia de micronúcleos. Además, se descubrió que la polivinilpirrolidona (PVP) ( $12.6 \pm 2.7$  kDa) por si sola produce daño citotóxico y genotóxico en linfocitos de sangre periférica humana desde 0.0188 µg/mL, pero sus efectos adversos sobre los linfocitos no se manifiestan cuando es el agente de recubrimiento de las AgNPs. Los resultados permiten apoyar las ideas de que 1) la relación

Ag:PVP es un factor sobresaliente en el efecto biológico provocado por las formulaciones de nanopartículas y 2) las nanopartículas provocan los efectos biológicos como una entidad completa. Estos resultados contribuyen positivamente al uso seguro de nanopartículas de plata Argovit® como agente antiviral, antibacteriano y antitumoral, además de que abren la puerta para explorar nuevas áreas de oportunidad.

## ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) are the most widely used nanomaterials in the world due to their excellent antibacterial, antiviral, antitumor, and other properties. However, there is little information about its genotoxic and cytotoxic potential. In the present work the effect of silver nanoparticles is evaluated in in vitro cultures of human peripheral blood lymphocytes, this primary culture is a model recommended by the OECD to evaluate genotoxic and cytotoxic damage. The parameters provided by the micronucleus assay per block of cytokinesis (CBMN), showed that Argovit™ silver nanoparticles at concentrations of 0.012 to 12 µg/mL are completely safe for human lymphocytes. In this study we also evaluated the cytotoxic and genotoxic effects caused by sodium arsenite (0.12 µg/mL) and the nanoCompsix™ silver nanoparticles in concentrations of 0.012 to 12 µg/mL, the results show the presence of necrosis, the increase of the frequency of nuclear outbreaks (NBUDs) and nucleoplasmic bridges (NPBs), although they did not produce changes in the nuclear division index nor did they increase the frequency of micronuclei. It is important to indicate that the range of these concentrations includes the concentrations that were found active in many applications. In addition, it was discovered that polyvinylpyrrolidone (PVP) ( $12.6 \pm 2.7$  kDa) alone causes cytotoxic and genotoxic damage in human peripheral blood lymphocytes from 0.0188 µg/mL, but the adverse effects of lymphocytes disappear when it is the coating agent of the AgNPs. The Ag: PVP ratio is an outstanding factor in the biological effect caused by the nanoparticle formulations. The results support the idea that nanoparticles cause biological effects as a complete entity. These results contribute positively to the safe use of

Argovit™ silver nanoparticles as an antiviral, antibacterial and antitumor agent and open the door to explore new areas of opportunity.

## TABLA DE CONTENIDO

Contenido de tablas-----	1
Contenido de figuras-----	2
Introducción -----	3
Justificación-----	6
Antecedentes-----	9
Genotoxicidad y Citotoxicidad -----	11
Toxicidad de nanopartículas de plata -----	12
Estudios recientes con Argovit® -----	19
Trabajos en acuicultura y agricultura. -----	19
Estudios en medicina y veterinaria -----	25
Investigaciones en salud humana -----	28
Hipótesis-----	32
Objetivos -----	33
Objetivo general -----	33
Objetivos específicos-----	33
Metodología -----	34
Diseño experimental -----	35
Caracterización de las nanopartículas de plata utilizadas-----	36
Nanopartículas de plata Argovit® -----	36
Nanopartículas de plata nanoComposix® -----	38
Procedimiento de técnica de micronúcleos por bloque de la citocinesis (CBMN)-----	39
Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad -----	43
Resultados y Discusión -----	45
Conclusiones-----	64
Referencias bibliográficas-----	66
Anexos -----	82

## Contenido de tablas

**Tabla 1.** Diseño experimental de los diferentes tratamientos en los cultivos de linfocitos de sangre periférica humana.

**Tabla2.** Valores de referencia de genotoxicidad y citotoxicidad para linfocitos de personas sanas descritos por Fenech.

## Contenido de figuras

**Figura 1.** Características de las nanopartículas de plata Argovit®.

**Figura 2.** Características de las nanopartículas de plata nanoComposix®.

**Figura 3.** Representación esquemática de los procedimientos de la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.

**Figura 4.** Representación esquemática de los diferentes tratamientos para cada cultivo.

**Figura 5.** Biomarcadores de citotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana cultivados *in vitro*.

**Figura 6.** Biomarcadores de genotoxicidad en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

**Figura 7.** Daño citotóxico y genotóxico que puede ser rastreado por el ensayo CBMN.

**Figura 8.** Estabilidad de AgNPs respecto al agente de recubrimiento.

## Introducción

La utilización de los nanomateriales se ha incrementado significativamente en los últimos años, así como la incertidumbre acerca del uso seguro de estos materiales y los riesgos emergentes para el medio ambiente y la salud humana. Esto se debe a que existen pocos estudios referentes a las rutas de absorción, transporte, distribución y la interacción de las nanopartículas con los sistemas biológicos en general [1].

Las innovaciones y la producción de distintos tipos de materiales a nanoescala crece diariamente dado al amplio espectro de utilización y aplicación de los nanomateriales. Los sectores en donde se ha reportado que se utilizan los nanomateriales son: la medicina, la industria textil, la cosmetología, tecnologías alimentarias y energéticas, entre otros. Sin embargo, los nanomateriales presentan propiedades y efectos muy distintos a sus correspondientes elementos de tamaños convencionales, lo que genera riesgos desconocidos para las poblaciones expuestas [2].

Diferentes artículos muestran los efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de plata (AgNPs), dichos efectos se han relacionado con las propiedades fisicoquímicas (tamaño, recubrimiento, carga superficial y composición química) que influyen de manera definitiva en la respuesta que producen en los sistemas con los que se encuentran en contacto, característica que los hace únicos [3,4]. Aunado a esto, la falta de un modelo sistemático para identificar el potencial genotóxico de los nanomateriales dificulta aún más la toma de decisiones con respecto a la seguridad de estos, especialmente para aquellos ampliamente utilizados, como las nanopartículas de plata.

Los sectores con mayor participación en el desarrollo y uso de las nanotecnologías son el farmacéutico, el sanitario y el militar; la población expuesta a este tipo de tecnología es cada vez mayor, aunque se desconoce los posibles efectos nocivos. Varios autores coinciden en que los materiales en nanoescala inducen toxicidad a nivel celular y genético, por lo que, se considera de gran importancia evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad que estos materiales pueden producir.

Como se menciona antes, 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 en diversos sectores productivos y de investigación [1], generando una creciente preocupación acerca de los efectos que estos materiales pueden tener, tanto en el medio ambiente como en la salud. Lo anterior ha promovido la generación de un campo emergente denominado nanotoxicología, la cual, se dedica al estudio del potencial impacto tóxico de nanomateriales en sistemas biológicos en función de las propiedades físicas y químicas [5]. Este campo emergente promueve la atención desde diferentes perspectivas con el fin de evaluar el riesgo potencial que conlleva el uso y aplicación de los nanomateriales.

La nanotecnología incluye el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas de control de forma y tamaño a una escala menor a 100 nanómetros. Se considera como nanomaterial, aquel que en uno o más de sus componentes presenta al menos una estructura dimensional de un tamaño entre 1 a 100 nanómetros [6]. Los nanomateriales, incluyendo las nanopartículas y nanofibras, son categorizados dentro de cuatro clases, materiales basados en carbono, materiales basados en metales (puntos cuánticos, nanoplatina y nano-oro, entre otros), dendrímeros (polímeros nano) y otros compuestos. Entre algunas de sus

características destacan la durabilidad, alta conductibilidad y reactividad [7] y son usados en muchos productos comerciales y en prácticas industriales.

En el presente trabajo se explora la citotoxicidad y la genotoxicidad de dos nanopartículas de plata de uso comercial: Argovit® y nanoComposix® en concentraciones de 0.012 a 12 µg/mL, utilizando el arsenito de sodio (0.12 µg/mL) como control positivo. Ambas marcas de AgNPs están recubiertas por polivinilpirrolidona (PVP) y tienen algunas propiedades fisicoquímicas similares.

Se utiliza el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN, por sus siglas en inglés), como modelo experimental para medir el efecto citotóxico y genotóxico de Argovit® y nanoComposix®. El CBMN es un modelo que permite registrar diferentes biomarcadores de citotoxicidad como el índice de división celular o índice mitótico, necrosis y apoptosis, así como tres biomarcadores de inestabilidad genética: micronúcleos, brotes nucleares y puentes nucleoplasmicos. Los resultados sugieren que las AgNPs Argovit™ son seguras para su uso en humanos.

## Justificación

La importancia de este trabajo radica en primer lugar, en que México fue en 2019 el principal productor de plata en el mundo con aproximadamente 6300 toneladas métricas, por encima de Chile, Perú y China [8].

En segundo lugar, la relevancia de este trabajo también contempla que en Baja California es donde la industria de los nanomateriales está en auge [Referencia], por lo que es cada vez más amplio el sector de la población que está expuesto laboralmente a nanomateriales cuyos efectos sobre la salud aún no están del todo estudiados.

Se han reportado padecimientos poco usuales relacionados a la exposición ocupacional a nanopartículas, tales como, fibrosis pulmonar, granuloma pleural y daño orgánico múltiple [9–11].

Por lo anterior, se busca determinar si las nanopartículas de plata de diferentes tipos, tamaños y en diferentes concentraciones tienen la capacidad de inducir daño genotóxico y citotóxico en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, con la finalidad de plantear recomendaciones de uso seguro en diferentes ambientes laborales.

El presente estudio se abordó desde una perspectiva interdisciplinaria, debido a las características propias y complejas que conlleva el uso, aplicación y producción de nanomateriales, con la intención de interactuar con el problema desde diferentes puntos de vista y establecer medidas integrales para el uso seguro de este tipo de tecnología.

Existen estudios que muestran los efectos citotóxicos y genotóxicos de las AgNPs, sin embargo, la falta de una sistematización en la evaluación de la toxicidad de los nanomateriales hace difícil la toma de decisión con respecto al uso seguro de materiales en la escala nano. Lo anterior cobra relevancia en estos tiempos debido a que los nanomateriales son cada vez más utilizados en diferentes productos de consumo, en especial las nanopartículas de plata, por sus propiedades antibióticas, antivirales, antifúngicas, entre otras.

El ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN) es una técnica que se utiliza para evaluar el daño citotóxico y genotóxico en linfocitos humanos de sangre periférica. Esta técnica recientemente aprobada por la OCDE [12], se considera uno de los métodos más sólidos para evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad, ya que proporciona seis indicadores. Para la citotoxicidad, los tres biomarcadores son el índice de división nuclear (NDI), la apoptosis y la necrosis. El primero muestra la capacidad proliferativa de los linfocitos en las condiciones experimentales probadas. Por otro lado, la apoptosis y la necrosis muestran el número de células que mueren a través de procesos regulados o vinculados a eventos de daño severo que exceden la capacidad de la célula para controlar el daño. Para evaluar la genotoxicidad se toma en cuenta la frecuencia de micronúcleos (MNi), brotes nucleares (NBUDs) y puentes nucleoplásmicos (NPBs).

Los micronúcleos son indicadores de daño genotóxico de punto final de procesos clastogénicos y/o aneugénicos [13,14], lo cual significa, que en el proceso de división celular ocurrió un daño que la célula no pudo reparar y se perdió parte de la información genética. En cambio, los puentes nucleoplásmicos son el resultado de procesos de reparación celular, cromosomas mal emparejados que surgen del daño en el huso mitótico relacionado con inhibidores en la síntesis

y reparación del ADN, y por agentes químicos que rompen la estructura fosfodiéster del ADN. Por su parte, los brotes nucleares se han descrito como fragmentos de ADN de reparación amplificada producidos en respuesta al daño provocado por especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) [14,15]. Los puentes nucleoplásmicos y los brotes nucleares son indicadores de procesos de daño genotóxico, en donde, la célula todavía no pierde por completo parte de la información genética, pero si existe una división anormal de dicha información [16].

## Antecedentes

Existen estudios que han tratado de demostrar los efectos tóxicos de las nanopartículas, sin embargo, hasta el momento no se han encontrado investigaciones que prueben dichos efectos de manera concluyente [17]. Actualmente el conocimiento de cómo interactúan las nanopartículas y cómo producen toxicidad en líneas celulares de mamíferos es muy limitado.

Algunos autores proponen que el tamaño y el ligante de las nanopartículas, así como las líneas celulares utilizadas tienen influencia en la toxicidad de este tipo de materiales [18–22]. Las investigaciones recientes sugieren que, entre los mecanismos de toxicidad de las nanopartículas más aceptados, se han relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), proceso que consiste en una disrupción en la cadena respiratoria en la mitocondria e impide la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP), lo cual induce el daño al ADN [23].

De entre los nanomateriales, las nanopartículas de plata (AgNPs) y las nanopartículas de oro (AuNPs) son algunas de las más comercializadas y ampliamente usadas en productos de consumo. Sus aplicaciones se han extendido dentro del campo biomédico y de la salud, particularmente en los sistemas de imagen médica y diagnóstico, farmacéutica, entrega de fármacos y terapias, no obstante, las nanopartículas de plata destacan principalmente por sus propiedades antimicrobianas [5,7].

Una de las grandes preocupaciones relacionadas con la toxicidad de los nanomateriales es la bioacumulación. Los estudios de Li y colaboradores (2010), en ratas que inhalaban nanopartículas de oro mostraron que dichas partículas se acumulan significativamente en los

pulmones y pueden ser detectadas en otros órganos semanas después. Aplicándolas vía intravenosa se acumulan en el hígado y riñones [24].

Por otro lado, la plata se ha conocido desde la antigüedad por ser un potente agente antibacteriano, antifúngico y antiviral. Según el reporte en 2010 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) [25], 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 [26].

Actualmente, la plata se utiliza en la fabricación de prótesis óseas, implantes cardiacos de 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 [27–29]. Según diversos autores, las AgNPs, se usan en productos para el envasado de alimentos, suplementos alimenticios, textiles, electrónica, electrodomésticos, cosméticos, dispositivos médicos, desinfectantes de agua, aerosoles de habitaciones, se usan en tazas, tazones y tablas de cortar, productos de cuidado personal, productos sanitarios, pulverizadores de habitación, en juguetes de los niños, productos infantiles y de salud [30].

Según el reporte de la EPA en 2010, el seguimiento de los productos que contienen nanoplata puede llegar a ser difícil, debido a que, la normatividad vigente del etiquetado de los diversos productos que contienen nanoplata no obliga que aparezca el nanomaterial como un ingrediente [25], por lo que existe preocupación a nivel mundial sobre el uso indiscriminado ya

que, como se mencionó anteriormente, existe poca información relacionada con la toxicidad y los posibles efectos a la salud y al ambiente por el uso de estos nanomateriales.

### **Genotoxicidad y Citotoxicidad**

La toxicidad de un agente físico, químico o biológico consiste en la capacidad que estos tienen para inducir efectos adversos en un individuo a nivel celular. La toxicología engloba dos grandes grupos de estudio que incluyen la genotoxicidad, que indica el daño genético (mutaciones, daño en los cromosomas 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 establece la capacidad de agentes físicos, químicos o biológicos de alterar las funciones basales y/o funciones especializadas de las células, especialmente en lo concerniente a la duración de las fases del ciclo celular y los procesos de muerte celular [31].

En ese sentido, la toxicología genética es la disciplina que proporciona información esencial para favorecer el mantenimiento de la integridad del material genético con el fin de prevenir o identificar la carcinogénesis, el desarrollo de enfermedades hereditarias o el envejecimiento [32]. Por ello la genotoxicidad estudia, lo concerniente a la caracterización y descripción de la acción de aquellos agentes que provocan algún tipo de modificación en el material genético [33]. La acción de los agentes genotóxicos puede dar lugar a la inducción de cambios en la secuencia del ADN (translocaciones) provocando la aparición de mutaciones puntuales, o a una escala más grande, de aberraciones cromosómicas visibles como son las modificaciones en la cadena

polinucleotídica que a menudo producen la adición (inserciones) o eliminación (deleciones) de segmentos de ADN.

La evaluación del daño genotóxico consiste en estimar las alteraciones genéticas, y relacionarlas con la toxicidad de algún agente precursor; implica la valoración de las modificaciones en la estructura del ADN que ocurren durante la división celular provocadas por agentes tóxicos. Estas modificaciones al ADN se conocen con el nombre genérico de mutaciones *de novo*. Cuando las mutaciones se presentan en las células germinales, afectan el desarrollo embrionario y conducen a daños de naturaleza irreversible y de largo plazo denominados efectos teratogénicos, cuya manifestación más conocida son los defectos al nacimiento.

Las mutaciones que se presentan en células somáticas pueden derivar en dos consecuencias: la primera consiste en un crecimiento celular desmesurado y desordenado también denominado cáncer y la segunda conduce a la muerte celular a la que se ha designado con el nombre de necrosis. La evaluación de la genotoxicidad es una práctica de gran impacto para la salud ya que entre las consecuencias de la toxicidad a nivel genético se encuentran los defectos al nacimiento, alteraciones metabólicas, cambios en la fertilidad y enfermedades crónico-degenerativas [34].

### **Toxicidad de nanopartículas de plata**

Diversas investigaciones han demostrado la toxicidad de las nanopartículas de plata, por ejemplo, en animales acuáticos, se menciona que las AgNPs producen especies reactivas de oxígeno (ROS), aberraciones cromosómicas, sobreexpresión de p53, necrosis, apoptosis, entre

otros daños [35–37]. No obstante, en la actualidad persiste un vacío de información y controversia respecto al entendimiento de las vías del daño relacionado con las pruebas experimentales y el tamaño de las nanopartículas.

Foldbjerg y colaboradores (2009), demostraron que monocitos humanos THP-1 tratados con iones de Ag y AgNPs cubiertos con Polivinilpirrolidona (PVP) presentan inducción de apoptosis y necrosis dependientes de la concentración y el tiempo de exposición [38]. Además, diferentes estudios han demostrado la citotoxicidad de AgNPs, aunque todavía existen conflictos en cuanto a la promoción de estrés oxidativo y se carece de información de su potencial genotóxico [39].

AshaRani y colaboradores (2008), demuestran que las AgNPs tienen actividad antiproliferativa en células humanas normales de fibroblasto (IMR-90) y células humanas de glioblastoma (U251), presentando inestabilidad en los cromosomas y arresto del ciclo mitótico [40]. Sugieren que las AgNPs pueden promover modificaciones momentáneas en la concentración de calcio en la célula o provocar aberraciones cromosómicas, a la vez de intervenir directamente o a través de la activación de enzimas catabólicas en la cascada de señalización, que tienen un rol importante en las deformaciones del citoesqueleto y por lo tanto inhibe la proliferación celular [41].

Diversos estudios revelan que las AgNPs podrían causar toxicidad importante en un amplio espectro de células, como en células madre germinales, células madre mesenquimales, células de hígado de rata (BRL 3A), 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). Además, de tener el potencial de inducir la expresión de genes asociados con la progresión del ciclo celular, daño al ADN y apoptosis en células humanas a dosis no citotóxicas [5,42].

Trabajos relacionados con la biodistribución y toxicidad de nanopartículas de plata en ratas y en ratones han demostrado que, administradas por inhalación, ingestión o inyecciones intraperitoneales, se pueden localizar en sangre y causan toxicidad en diferentes órganos como el cerebro. Por otro lado, estas AgNPs son las responsables de causar malformaciones en el desarrollo de organismos no mamíferos que se utilizan para elucidar enfermedades en humanos [42].

Xu y colaboradores (2012), probaron la genotoxicidad de hidrogel a base de AgNPs, como vehículos de las nanopartículas, usando el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (CBMN) observaron la inducción de micronúcleos; además, analizaron las rutas del gen oncológico (GO, por sus siglas en inglés) y encontraron que se expresaron y se apagaron miles de genes en células HeLa a las 48 horas de exposición [5]. El análisis de las rutas del GO sugiere que existen 14 rutas teóricas activas de señalización para genes sobre-expresados y 3 para genes no expresados. Los autores mencionan que las rutas de señalización de los balances entre la respuesta anti-ROS y el daño al ADN, la inestabilidad cromosómica y la inhibición de mitosis podrían jugar un rol importante en la toxicidad de AgNPs.

Ghosh y colaboradores (2012), demostraron la genotoxicidad de AgNPs sin recubrimiento con tamaños que van desde 90 a 180 nm. Dicho estudio se realizó en cultivos *in vitro* de linfocitos

humanos aplicando distintas concentraciones de AgNPs y los resultados revelaron que a una concentración de 25 µg/mL pueden causar toxicidad a nivel genético [43].

En 2011, Greulich y colaboradores, estudiaron las respuestas celulares específicas en células mononucleares de sangre periférica de humanos expuesta a AgNPs (monocitos CD14+ y células T CD3+). Este trabajo proporciona la primera evidencia de una respuesta celular específica provocada por la absorción de AgNPs en células mononucleares de sangre periférica. Se confirma 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 AgNPs y por lo tanto, la cantidad de plata intracelular y la liberación de iones desencadenan la activación de los monocitos y la subsecuente generación de ROS [44].

En otro estudio realizado por Li y colaboradores (2012), se evaluó la genotoxicidad de AgNPs usando el ensayo de Ames en *Salmonella* y el ensayo de micronúcleos en células linfoblastoides humanas TK6. Demostraron que en *Salmonella* no se incrementó la frecuencia de mutantes, sin embargo, en las células TK6 la frecuencia de micronúcleos aumentó de manera dosis dependiente, hasta 3.17 veces más, con un incremento de 1.60% de frecuencia de micronúcleos con respecto al control [45]. Esto sugiere que el ensayo *in vitro* de micronúcleos puede ser más apropiado que el ensayo de Ames para evaluar la genotoxicidad de AgNPs, ya que el primer ensayo detecta pequeños fragmentos de ADN unidos a la membrana nuclear (micronúcleos), en el citoplasma de células en interfase. De esta manera, se mide la clastogenicidad (rompimiento de cromosomas) y la aneugenicidad (cambios en el número de cromosomas) en células que han estado bajo división celular durante o después de una exposición a agentes químicos.

Muchos trabajos de diferentes autores indican que existen experimentos *in vitro* para medir la genotoxicidad de las AgNPs, sin embargo, señalan que falta claridad en los resultados debido a los métodos usados, los materiales de las pruebas y otras condiciones como los agentes utilizados para disolver o funcionalizar los nanomateriales, que influyen en la aglomeración y/o agregación de las partículas. En cuanto a la citotoxicidad de las AgNPs se plantean que hay diferentes estudios que la han evidenciado, pero los reportes de su habilidad para promover el estrés oxidativo se encuentran en conflicto [39].

Existen investigaciones que demuestran que las AgNPs podrían inducir toxicidad *in vivo* bajo una variedad de condiciones de exposición incluyendo inhalación, absorción oral, por vía hipodérmica de inyección, entre otras. Cheng-Ten Ng y colaboradores en 2010, realizaron experimentos en ratones en donde encontraron que la administración de altas dosis de AgNPs administrada por 28 días producía daño al hígado, pero no presentaba genotoxicidad de manera significativa en eritrocitos y medula ósea, por otro lado, estudios realizados en plantas demostraron el daño en el ADN debido a errores en la división celular [7], por lo anterior, se puede inferir que las AgNPs tienen respuestas diferentes respecto a la genotoxicidad en diferentes sistemas biológicos.

El trabajo realizado por Kim y colaboradores (2011), sobre genotoxicidad de AgNPs después de 90 días de exposición por inhalación en ratas, señalan que no hubo diferencias estadísticas significativas con los controles 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 AgNPs por 90 días no induce genotoxicidad en medula ósea *in vivo*. No obstante,

mencionan que existe una bioacumulación dependiente de la dosis de AgNPs debido a que estos nanomateriales fueron encontrados en sangre, estómago, cerebro, hígado, riñones, pulmones y testículos [46].

Foldbjerg y colaboradores (2009), señalan que cuando se evalúa la nanotoxicidad de AgNPs, el tamaño y la composición química de la nanopartícula son propiedades de gran importancia para la bioacumulación [38]. Por ejemplo, Li y colaboradores en 2011, mencionan que los estudios en líneas celulares donde se relaciona la concentración de las AgNPs con el tamaño de las mismas, no son concluyentes, debido a que, los diferentes tipos de líneas celulares suelen tener distintas respuestas genotóxicas dependientes del tamaño del nanomaterial, el estudio propone que entre más pequeña es la nanopartícula mayor es su toxicidad [45]. Por otro lado, Nymark y colaboradores (2012), publicó que las AgNPs cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) inducen daño genotóxico en células humanas de epitelio bronquial (BEAS 2B); en este estudio se observó una dosis-dependencia después de 4 horas, sin embargo, no hubo inducción de micronúcleos en ninguna de las concentraciones en los tiempos estudiados [47]. Los autores sugieren que la ausencia de inducción de daño a cromosomas por las AgNPs cubiertas con PVP puede ser atribuible al tipo de recubrimiento. El recubrimiento con PVP pudiera proteger a las células de una interacción directa con las AgNPs, ya sea reduciendo la liberación de iones de las partículas retardando la respuesta celular, o bien, por una gran acumulación de nanopartículas sobre la pared celular impidiendo el transporte a través de membrana promoviendo una reducción de la absorción celular [47].

La toxicidad de las AgNPs puede ser explicada por una combinación de los efectos del tamaño, cubierta, solubilidad, carga superficial y las tasas de absorción por parte de la célula. La carga

superficial de las AgNPs que se probaron en el trabajo de Nymark y colaboradores (2013), estaban neutralizadas por los constituyentes del medio, ya que la mayoría de las AgNPs solo tenían una ligera carga negativa, lo que podría afectar su absorción por las células BEAS 2B. Aunque las AgNPs cubiertas con PVP no fueron capaces de inducir daño cromosómico permanente en células bronquiales humanas, hay muchas evidencias de clastogenicidad y aneugenicidad de otras formulaciones de AgNPs con diferentes compuestos estabilizantes en otros tipos de líneas celulares [47].

Singh y colaboradores (2009), expresan que para estudios de nanotoxicología principalmente se evalúa el daño citotóxico en exposición a concentraciones muy altas, sin incluir el daño genotóxico que pueden ocasionar las exposiciones a concentraciones bajas, lo cual es problemático porque el daño al ADN puede iniciar el desarrollo de cáncer, afectar las células reproductivas e impactar en la salud de las futuras generaciones, por lo tanto, las pruebas de genotoxicidad y la evaluación del potencial carcinogénico y mutagénico de los nanomateriales cobra mucha relevancia en la nanotoxicología. En el estudio también refieren el peso ponderado entre el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos. La primera mide altos niveles de daño porque detecta puntos de rompimiento de ADN, que son reparables, mientras que la prueba de micronúcleos posee un mayor peso en alusión a la genotoxicidad, debido a que el daño medido permanece después de la división celular y esto proporciona más información acerca de los errores que permanecen sin reparar [39].

## Estudios recientes con Argovit®

Varios estudios se han publicado por parte de los diferentes grupos asociados a la Red Internacional de Bionanotecnología con Impacto en Biomedicina y Bioseguridad, con relación a diversas aplicaciones de AgNPs Argovit®. En los párrafos siguientes se describen algunos de los estudios más emblemáticos.

### Trabajos en acuicultura y agricultura.

Spinoso-Castillo y colaboradores (2017), estudiaron el potencial uso de Argovit® en los procesos de micropropagación comercial de plántulas de *Vainilla planifolia*, ya que la contaminación microbiana es un problema grave en los sistemas de inmersión temporal (TIS) durante la micropropagación comercial, con el objetivo de evaluar los efectos antimicrobianos y horméticos de Argovit®, sobre la regeneración in vitro de vainilla (*Vanilla planifolia*) utilizando un TIS. Los resultados mostraron que la contaminación bacteriana se redujo a 50, 100 y 200 mg/L de Argovit®. Se observó estimulación del crecimiento a 25 y 50 mg/L de Argovit®, mientras que la inhibición significativa fue detectada a 100 y 200 mg/L de Argovit®. El análisis reveló cambios en las concentraciones de macro y micronutrientes ejercidos por Argovit®. Además, la presencia de Argovit® indujo la producción de ROS y aumentó el contenido total fenólico, capacidad antioxidante y peroxidación lipídica con efecto dosis-dependiente. Los resultados sugieren que la producción de ROS y la nutrición mineral son mecanismos clave de la hormesis inducida por AgNPs para la vainilla. Por lo tanto, la adición de 50 mg/L de Argovit® en los medios

de cultivo tuvo un efecto antimicrobiano y hormético. El uso de Argovit® podría ser una estrategia eficiente para la micropropagación comercial de vainilla y otras especies [48].

Bello-Bello y colaboradores (2017), evaluaron la respuesta hormonal de las nanopartículas de plata (AgNPs) en la multiplicación *in vitro* de la caña de azúcar mediante un sistema de inmersión temporal. Los resultados se presentaron como una curva de dosis-respuesta. El crecimiento de la fase de estimulación se observó a 50 mg/L de AgNPs, mientras que la fase de inhibición se detectó a 200 mg/L de AgNPs. El análisis de nutrientes minerales mostró cambios en el contenido de macronutrientes y micronutrientes debido al efecto de los AgNPs. Además, los AgNPs indujeron la producción de ROS y aumentaron el contenido fenólico total, con un efecto dependiente de la dosis. Por lo antes mencionado los autores concluyen que la producción de ROS y la nutrición mineral son mecanismos clave de la hormesis inducida por AgNPs, y que la acumulación fenólica se obtuvo como respuesta de la planta al estrés producido por altas dosis de AgNPs. Por tanto, pequeñas dosis de AgNPs en el medio de cultivo podrían ser una estrategia eficaz para la micropropagación comercial [49].

Bello-Bello y colaboradores (2018), presentaron el primer estudio de los efectos citotóxicos y genotóxicos promovidos por AgNPs (Argovit®) en plántulas de *Vainilla planifolia* después de un período de exposición de seis semanas, mostrando que el crecimiento de las plántulas de *V. planifolia* con dosis de 25 y 50 mg/L favorecen la citotoxicidad con una pequeña disminución en el índice mitótico. También se encontró una dosis-dependencia en la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas y micronúcleos. Sin embargo, los efectos genotóxicos podrían considerarse mínimos debido a que esto se observó con la mayor concentración empleada (200 mg/L), el porcentaje total de aberraciones cromosómicas es inferior al 5%, con solo tres

micronúcleos en 3000 células, a pesar de la exposición prolongada a Argovit®. Por lo tanto, se identificaron como concentraciones seguras para el crecimiento de *V. planifolia* en condiciones in vitro las de 25 y 50 mg/L, que equivalen a 1.5 y 3 mg/L de plata metálica respectivamente. También se observó que la exposición de las plántulas a AgNPs aumentan el polimorfismo, lo que podría ser útil para promover la variabilidad genética de esta especie. Un aspecto que limitó la interpretación de estos datos fue la falta de un control positivo para el número de micronúcleos en *V. planifolia* [50].

Pimentel-Acosta y colaboradores (2019), determinaron en peces de cultivo el efecto antihelmíntico *in vitro* de las nanopartículas de plata contra adultos y huevos de monogéneos en agua dulce usando *Cichlidogyrus spp* como organismo modelo. Probaron dos tipos de AgNPs con diferentes metodologías de síntesis y diámetros de tamaño: nanopartículas Argovit® (35 nm) y nanopartículas UTSA (1–3 nm). Se observó daño al tegumento del parásito mediante microscopía electrónica de barrido. Las AgNPs de UTSA fueron más efectivas que Argovit®; en ambos casos, hubo un efecto dependiente de la concentración. Una concentración de 36 µg/L UTSA AgNPs (concentración de Ag metálica) durante 1 hora fue 100% efectiva contra huevos y parásitos adultos, que causan hinchazón, pérdida de corrugaciones e interrupción del tegumento del parásito. Este es un interesante resultado considerando que los huevos de monogéneos son típicamente tolerantes a las drogas antiparasitarias y agentes químicos. Los autores concluyen que, ningún informe previo ha evaluado el efecto de AgNPs en parásitos metazoos de peces y sostienen que su trabajo proporciona una base para futuras investigaciones sobre el control de enfermedades parasitarias de peces [51].

Ochoa-Meza y colaboradores (2019), determinaron la capacidad de una formulación comercial de nanopartículas de plata recubiertas de PVP reportadas como no tóxicas, para promover la respuesta del sistema inmunológico de los camarones infectados por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) con, o sin un exceso de iones de hierro. Los resultados mostraron que una sola dosis de plata metálica en el rango nanomolar (111 nmol/camarón), que equivale a 12 ng/mL de nanopartículas de plata (calculada para plata metálica), produce un 20% de supervivencia de los camarones infectados tratados. La misma concentración administrada en camarones sanos no muestra evidencia histológica de daño. La tasa de supervivencia observada podría estar asociada con el aumento de casi el doble de los niveles de expresión de LGBP en comparación con los camarones infectados no tratados. LGBP es un gen clave de la respuesta inmunológica del camarón y su regulación positiva esta inducida muy probablemente por el reconocimiento del recubrimiento de AgNPs por proteínas de reconocimiento de patrones moleculares (PAMP) asociadas a patógenos específicos del camarón. Se observó que una sola dosis de una pequeña cantidad de AgNPs fue capaz de mejorar la respuesta del sistema inmunológico del camarón sin efectos tóxicos en camarones sanos [52].

Fuentes-Valencia, (2020) encontraron que las nanopartículas de plata Argovit® son eficaces para combatir parásitos ciliados del género *Tetrahymena* en peces sin evidencia de efectos nocivos para los peces [53].

Romo-Quiñones y colaboradores (2020), realizaron cuatro ensayos experimentales para evaluar el uso de una nueva formulación de nanopartículas de plata llamada Argovit-4, que se preparó con ligeras modificaciones para mejorar su actividad biológica contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en cultivo de camarones. Los resultados de Argovit-4 inyectado por

vía intramuscular mostró un efecto dependiente de la dosis en la mortalidad acumulada de camarones de 0 a 96 horas después de la infección. En el segundo bioensayo, los camarones alimentados con Argovit-4 suplementado en alimento no mostró signos de toxicidad para el ensayo durante el experimento de 192 horas. El tercer y cuarto bioensayos mostraron que los camarones con WSSV a 1000 µg/g de alimento, exhibieron una mortalidad reducida sin alterar la expresión de algunos genes relacionados con el sistema inmunitario, de acuerdo con el nivel observado de potencial transcripcional como un aditivo antiviral en la alimentación contra WSSV, lo cual, demuestra una estrategia terapéutica práctica para controlar WSSV y posiblemente otros patógenos de invertebrados en la acuicultura de langostinos. Este estudio es el primer programa que se realiza con la nueva formulación de Argovit-4 [54].

Bravo-Guerra y colaboradores (2020), utilizaron exitosamente Argovit® contra el parásito *Perkinsus marinus*, que es un patógeno notificado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), como infectante de varias especies de ostras y determinaron que el tratamiento con 0.927 mM de plata, como AgNPs o AgNO<sub>3</sub>, fue altamente letal, con más del 90% de mortalidad [55].

Stephano-Hornedo (2020), establece que la enfermedad de Huanglongbing (HLB), comúnmente conocida como "enfermedad del dragón amarillo", afecta a los cultivos de cítricos en todo el mundo y tiene un efecto devastador en el sector agroindustrial. Se han realizado esfuerzos significativos para combatir la enfermedad, pero, aun así, no existe un tratamiento efectivo para erradicar la enfermedad. El trabajo evalúa la capacidad de las nanopartículas de plata (AgNPs Argovit®) para erradicar directamente la bacteria responsable de la enfermedad de Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), en el campo. Los AgNPs fueron

administrados por aspersión foliar e inyección en el tronco de 93 árboles enfermos con resultados notables. Ambos métodos producen una disminución del 80-90% del título bacteriano, cuantificado por qRT-PCR en el tejido foliar recolectado, en comparación con el grupo de control. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran una reducción esencial de acumulación de almidón en los vasos del floema después de los tratamientos con AgNPs, sin evidencia de bacterias en muestras analizadas en comparación con otros métodos efectivos que involucran antibióticos betalactámicos, la potencia de AgNPs Argovit® es de 3 a 60 veces mayor cuando se administra por aspersión foliar y de 75 a 750 veces mayor cuando la administración fue por inyección troncal, en comparación con los antibióticos betalactámicos. Proponen a Argovit® como una alternativa prometedora para el tratamiento de árboles infectados en el campo [56].

Casillas-Figueroa y colaboradores (2020), realizaron un trabajo en *Allium cepa* sobre la actividad citotóxica y genotóxica de la formulación Argovit™ de AgNPs disponible comercialmente. En este estudio el rango de concentración evaluado fue de 5–100 µg/mL de contenido de plata metálica (85–1666 µg / mL de formulación completa), esto es de 10–17 veces mayor que las concentraciones utilizadas para otras formulaciones de polivinilpirrolidona PVP-AgNPs reportadas anteriormente y no mostró daño citotóxico o genotóxico en el modelo de *Allium cepa*. Por el contrario, se observó que las concentraciones bajas (5 y 10 µg/mL) promueven el crecimiento sin dañar las raíces ni los bulbos. Hasta este trabajo, todas las formulaciones de PVP-AgNP evaluadas en *Allium cepa* independientemente de su tamaño, concentración o tiempo de exposición habían mostrado fitotoxicidad. La respuesta biológica observada en *Allium cepa* expuesta a Argovit™ es causada por nanopartículas y no por iones de plata. La

relación metal/agente de recubrimiento juega un papel fundamental en esta respuesta y debe considerarse dentro de los parámetros fisicoquímicos clave para el diseño y fabricación de nanomateriales más seguros para el medio ambiente, debido que el modelo de Allium cepa es eficiente para monitorear daño al medio ambiente [57].

### **Estudios en medicina y veterinaria**

Glotov y colaboradores (2004 a, b), estudiaron en experimentos *in vitro* la actividad antiviral de Argovit® junto con otros 10 fármacos diferentes contra el herpes viral causante de la rinotraqueítis infecciosa bovina (BIRT) y la diarrea viral bovina (BVD). Los resultados de estos estudios comprobaron la efectividad de Argovit® para combatir ambos padecimientos en ganado bovino, comparables a los viricidas como la bromuridina, el aciclovir, la ribavirina y el metisazonum, entre otros, en tanto que eracond y anandid demostraron ser ineficaces [58].

Kalmantaeva y colaboradores (2014), identificaron la influencia de Argovit® en el sistema inmune de ratones después de su inhalación, administración intragástrica o subcutánea. No se encontraron efectos tóxicos en las células y órganos del sistema inmune, tampoco cambios en la cantidad de linfocitos T y B en el bazo ni en la producción de citocinas proinflamatorias después de la exposición a nanopartículas de plata por inhalación o por vía intragástrica. Con la administración subcutánea de nanoplatina cambió la proporción de subpoblaciones de linfocitos y aumentó la cantidad de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) que producen los linfocitos, en una proporción de 3.6 veces en comparación con el control; además, aumentaron el contenido de

IFN $\gamma$  en el suero de los ratones a  $125 \pm 9.2$  pg/mL en comparación con el control ( $74.5 \pm 6.4$  pg/mL) [59].

Bogdanchikova y colaboradores (2016), utilizaron una composición farmacéutica veterinaria de nanopartículas de plata (AgNPs Argovit<sup>®</sup>) para el tratamiento del moquillo en perros con síntomas neurológicos y no neurológicos. Reportaron que el tratamiento AgNPs de animales con moquillo no neurológico generó una tasa muy alta de recuperación sin secuelas, en cambio, en perros con síntomas neurológicos, el tratamiento no pudo revertir el curso natural de la enfermedad [60].

Por otra parte, Gmoshinski y colaboradores (2016), estudiaron la influencia de nanopartículas de plata Argovit<sup>®</sup>, introducidas por vía oral en ratas durante un experimento que duró 92 días, sobre algunos indicadores de homeostasis de oligoelementos esenciales. Para Argovit<sup>®</sup> se determinó la acumulación dosis-dependiente de plata en el hígado del animal a una dosis que oscila entre 0.1 y 10 mg/kg de peso corporal, en riñón y bazo en el rango de 0.1 a 1 mg/kg de peso corporal, lo cual es una cantidad muy pequeña según datos obtenidos de la literatura. Por lo tanto, las AgNPs Argovit<sup>®</sup> que ingresan al cuerpo a través del tracto gastrointestinal a una dosis de plata de al menos 1 mg/kg de peso corporal, pueden afectar la homeostasis de oligoelementos esenciales y algunos elementos tóxicos. Por otro lado, los indicadores de suministro de selenio (excreción urinaria, el contenido en el plasma sanguíneo, la actividad de glutatión peroxidasa) son significativamente menores en las ratas que reciben AgNPs a una dosis de 1.0-10 mg/kg de peso corporal. El antagonismo de Ag (como parte de Argovit<sup>®</sup>) y Se en la composición de la dieta, debe tenerse en cuenta al evaluar la seguridad de los complementos alimenticios ampliamente utilizados, como fuentes de Ag coloidal [61].

Zeinalov y colaboradores (2016), sostienen que la plata como nanopartículas es varias veces más activa que sus otras formas y sus propiedades biológicas suelen ser mucho más antibióticas y biocidas. Al mismo tiempo, las nanopartículas pueden penetrar más fácilmente las barreras protectoras en los organismos y entrar directamente en sus tejidos y órganos. En este trabajo se presentan datos experimentales sobre el efecto de dos preparaciones de nanoplate (Poviargol y Argovit) en ratones de laboratorio. Se determinó que la observación en fresco de la morfología de las células de sangre periférica y el análisis bioquímico del suero sanguíneo de los organismos vivos, puede servir para fines de monitoreo primario de la patología en condiciones nocivas causadas por las nanopartículas de plata [62].

Borrego y colaboradores (2016), probaron la posible actividad antiviral de las nanopartículas de plata Argovit® contra el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV), que es un importante patógeno zoonótico. Determinaron que la aplicación de nanopartículas de plata es útil para controlar la infectividad de este virus [63].

Shkil y colaboradores (2018), mostraron que al tratar vacas con mastitis administrando Argovit®, con una duración promedio del tratamiento de  $2.9 \pm 0.1$ ,  $3.3 \pm 0.3$  y  $4.1 \pm 0.2$  días, que es 1.6, 1.8, 1.9 veces menos en comparación con el fármaco Espectromast en el grupo control. Se obtuvo un efecto de sensibilidad antibiótica en seleccionados de microflora en el tratamiento de organismos subclínicos, serosos y mastitis catarral. En el estudio realizado para determinar la sensibilidad a los antibióticos de microorganismos aislados después del tratamiento de mastitis de las vacas se observó un efecto dosis-dependiente para Argovit® en comparación con el fármaco utilizado y la forma clínica de la enfermedad. El uso de la Espectromast causó una disminución pronunciada en el 76% de preparaciones con mastitis subclínica, 96% serosas y

92% catarral. Con el uso Argovit®, se observó un aumento en la sensibilidad a los antibióticos a 21 fármacos, 84% en subclínico, 96% en seroso y 92% en mastitis catarral. En el tratamiento de mastitis subclínica del grupo experimental, se observó una ligera disminución del 16% de los fármacos [64].

Castañeda-Yslas y colaboradores (2018), evaluaron la capacidad genotóxica de Argovit® en reticulocitos de sangre periférica de ratones a partir de la técnica de micronúcleos y con las mismas dosis terapéuticas administradas contra el moquillo canino, 6 mg/mL, utilizando citosina arabinosa como control positivo y agua como control negativo. Los resultados mostraron que Argovit® produce menos micronúcleos que el control positivo, lo cual sugiere que la formulación de Argovit® no es genotóxica en la dosis evaluadas [65].

### **Investigaciones en salud humana**

Semenov y Fridarova (2012), estimaron la eficacia del Argovit® en el tratamiento de otitis supurativa crónica (CSOM), que se desarrolla en los pacientes sometidos al procedimiento quirúrgico. El estudio realizado incluyó a 35 pacientes entre 12 y 69 años de edad que se presentaron con CSOM después de una intervención quirúrgica en la cavidad timpánica del oído medio. El tratamiento resultó en la eliminación rápida de los síntomas clínicos y la dinámica positiva de los signos objetivos de la enfermedad, como la reducción o la terminación de la exudación patológica y la estimulación de los procesos de epidermización. La mayoría de los pacientes tratados tuvieron una remisión estable durante los 6 meses posteriores a la finalización del tratamiento [66].

Uraskulova y Gyusan (2017), evaluaron Argovit® para el tratamiento de la tuberculosis del tracto respiratorio superior. El estudio *in vitro* se basó en el dispensario de tuberculosis Karachaevo-Cherkessian. Encontraron que la solución de Argovit-C al 3.3% poseía una actividad bactericida del 100% en cepas de micobacterias resistentes a las concentraciones máximas y mínimas de isoniacida, el cual, es un fármaco de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis a nivel mundial. Con base en estos hallazgos, esta preparación fue elegida para el estudio clínico. Se probó que esta preparación tiene una mayor efectividad terapéutica en comparación con el tratamiento estándar para la tuberculosis. Los autores concluyeron que se puede recomendar la inhalación de la solución de Argovit-C al 3.3% dos veces al día por 10 minutos, durante 2 meses para el tratamiento local de la tuberculosis laríngea [67].

Juárez-Moreno y colaboradores (2017), evaluaron los efectos citotóxicos de AgNPs Argovit® en ocho líneas celulares de cáncer humano entre las que se encuentran células de cuello uterino (HeLa), de mama (MDA-MB-231, MCF7), de próstata (DU-145), colorrectal (DLD-1, HT29) y de pulmón (H1299 y H1437). En el caso de las líneas celulares de cáncer de cuello uterino y cáncer de mama, la concentración inhibitoria media máxima (CI50) de AgNPs produjo la formación de especies reactivas de oxígeno después de 24 horas de incubación, aunque no fue estadísticamente significativo con respecto a las células no tratadas. Sin embargo, las células HeLa, MDA-MB-231 y MCF7 tratadas con la concentración inhibitoria máxima de AgNPs indujo la formación de ROS a las 12 o 24 horas de incubación. Se evaluó la genotoxicidad por el ensayo cometa a estas mismas líneas celulares (HeLa, MDA-MB-231 y MCF7) y se observó que la exposición a la CI50 de AgNPs no induce daño notable al ADN en estas líneas celulares. Por su parte, la concentración inhibitoria de AgNPs provocó graves daño en el ADN después de 12 y 24

horas de exposición. El trabajo concluye que las AgNPs Argovit® induce un efecto citotóxico dosis-dependiente en las líneas celulares de cáncer analizadas, aunque el efecto genotóxico estuvo restringido principalmente por la concentración. Sugieren explorar nuevas aplicaciones terapéuticas de AgNPs Argovit® para malignidades en modelos murinos y estudiar a profundidad los efectos citotóxicos y genotóxicos de AgNPs en células sanas del tejido circundante a la neoplasia [68].

Almonaci y colaboradores (2017), presentan el uso de AgNPs Argovit® para el tratamiento de úlceras de pie diabético de grado II y III en la clasificación Wagner. Las úlceras fueron tratadas por administración tópica de AgNPs con un contenido de 1.8 mg/mL de plata metálica, además de los antibióticos convencionales. En todos los casos se observó una mejora significativa en la evolución de las úlceras con la administración de AgNPs. Este trabajo sugieren la importancia de nuevos estudios sobre el uso de AgNPs para el tratamiento de úlceras crónicas de diferentes orígenes [27].

Álvarez-Suárez y colaboradores (2020), mostraron la efectividad de Argovit® en el desarrollo de apósitos absorbentes para aplicación en quemaduras y úlceras cutáneas. El objetivo de este trabajo es investigar las propiedades de las microfibras de poli ( $\epsilon$ -caprolactona)/poli (vinilpirrolidona) (PCL/PVP) producidas mediante electrohilado junto con absorbentes cargados con nanopartículas de plata Argovit® (Ag-Si/ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) como componentes constituyentes de apósitos compuestos para heridas. Se observó que tanto las fibras como los absorbentes mostraron actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*), Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y el hongo *Candida albicans* [69].

Los efectos en la salud provocados por el contacto o consumo de este tipo de nanomateriales, no se conocen por completo. Por lo que es necesario determinar dichos efectos con sistemas estandarizados y confiables que nos permitan visualizar el posible impacto en la salud de los seres humanos, animales y en el ambiente, así como la forma en que los individuos, células o el ambiente contrarresten los efectos que se puedan generar debido a la exposición de las nanopartículas.

La evaluación de la toxicidad de las nanopartículas es un aspecto transcendental en la actualidad, debido a que el uso, producción e investigación de este tipo de nanomateriales se ha incrementado en la última década. Es de suma importancia determinar los efectos que tienen las nanopartículas producto de las diferentes rutas de exposición y los factores relacionados que puedan provocar efectos en la salud.

## Hipótesis

Existen nanopartículas de plata cuya capacidad genotóxica y citotóxica en un intervalo de concentraciones que resultan efectivas como antivirales, antibacterianas o antitumorales no representan un riesgo para la salud humana.

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de diversas concentraciones y tipos de nanopartículas de plata en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, mediante la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN).

### Objetivos específicos

1. Determinar la citotoxicidad de nanopartículas de plata Argovit® y nanoComposix® en diferentes concentraciones mediante el cálculo del índice de división nuclear, apoptosis y necrosis.
2. Estimar el nivel de daño genotóxico de nanopartículas de plata Argovit® y nanoComposix® en diferentes concentraciones, mediante biomarcadores del daño al ADN, micronúcleos, brotes nucleares y puentes nucleoplasmicos.

## Metodología

En los últimos años se ha incrementado el uso y la producción de los nanomateriales, debido a ello, se hace necesario determinar la toxicidad que estos materiales pudieran presentar en el ser humano. Para monitorear la toxicidad a nivel celular y a nivel genético existen diversas técnicas, tales como ensayo cometa, la susceptibilidad genética, el ensayo de micronúcleos, citometría de flujo, identificación de aneuploidías, entre otras. En el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad y la genotoxicidad de nanopartículas de plata, en cultivos *in vitro* de células de linfocitos humanos a través de la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN).

La población que se tomó en cuenta para esta investigación fueron hombres jóvenes de entre 18 a 27 años con perfiles sanguíneos dentro de los intervalos considerados para personas sanas. La elección de los sujetos de estudio se hizo mediante análisis clínicos, en donde, se observaron los parámetros cuantificables en sangre, tales como, conteo celular, nivel de glucosa, colesterol, triglicéridos, entre otros, con el fin de ubicar a pacientes normocíticos. Se eligieron individuos con las características antes señaladas para minimizar los factores de confusión y probar el efecto de las nanopartículas sobre cultivos de linfocitos humanos sanos.

Los individuos que formaron parte del estudio firmaron un consentimiento informado (anexo 1) en donde se les explica los objetivos de la investigación, que se va hacer con sus muestras biológicas, así como los beneficios que se deslinden del estudio.

Las variables dependientes de este trabajo son los biomarcadores que la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis establece: el índice de división nuclear (NDI), el porcentaje de apoptosis y de necrosis (calculado en 500 células contadas, en este total se toman

en cuenta células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas), la frecuencia de micronúcleos (MNI), la frecuencia de brotes nucleares (NBUDs) y la frecuencia de puentes nucleoplasmicos (NPBs) (por cada 1000 células binucleadas contadas, a partir de cultivos *in vitro* de linfocitos humanos de sangre periférica).

Las variables independientes, correspondieron a las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata que se utilizaron en los cultivos *in vitro*. Las nanopartículas de plata Argovit® que se evaluaron fueron proporcionadas por el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y las nanopartículas de plata nanoComposix® se compraron directamente con el distribuidor.

### **Diseño experimental**

El presente estudio es de tipo experimental, en donde se evaluó el efecto de dos tipos de nanopartículas de plata en diferentes concentraciones en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, mediante la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis. En la tabla 1 se detalla el diseño experimental para cada individuo, de cada tratamiento se realizaron réplicas:

Tabla 1. Diseño experimental de los diferentes tratamientos en los cultivos de linfocitos de sangre periférica humana, para cada individuo que participo en el estudio.

Tratamientos experimentales	Concentración Ag metálica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Propósito
Control blanco (sin tratamiento)	NA <sup>€</sup>	Cultivos de linfocitos en condiciones estándar de la técnica CBMN <sup>†</sup> .
Control de PVP <sup>‡</sup>	0.0188, 188	Control para probar el efecto del estabilizante de PVP en cultivos de linfocitos.
AgNPs Argovit <sup>®</sup>	0.012, 0.12, 1.2, 12	Tratamientos para probar el efecto de las nanopartículas de plata sobre cultivos de linfocitos humanos.
AgNPs nanoComposix <sup>®</sup>	0.012, 0.12, 1.2, 12,	Tratamientos para probar el efecto de las nanopartículas de plata sobre cultivos de linfocitos humanos.
Control positivo (NaAsO <sub>2</sub> )	0.12	Control positivo para inducir daño a los cultivos de linfocitos.
S/PHA <sup>*</sup>	NA <sup>€</sup>	Control para verificar la eficiencia del estimulador de crecimiento.

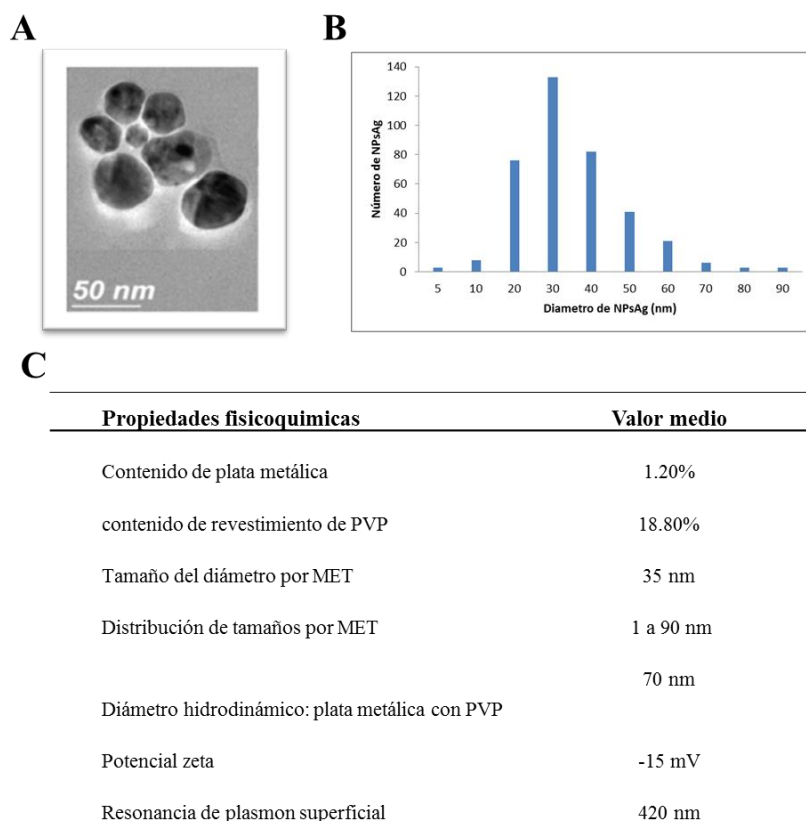
<sup>†</sup>CBMN: Técnica de micronúcleos por bloqueó de la citocinesis, <sup>€</sup>NA: No aplica, <sup>‡</sup>PVP: Polivinilpirilidona, <sup>\*</sup>PHA: Phytohemaglutinina

## Caracterización de las nanopartículas de plata utilizadas

### Nanopartículas de plata Argovit<sup>®</sup>

Las nanopartículas de plata Argovit<sup>®</sup> fueron facilitados por el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. La elección de la formulación

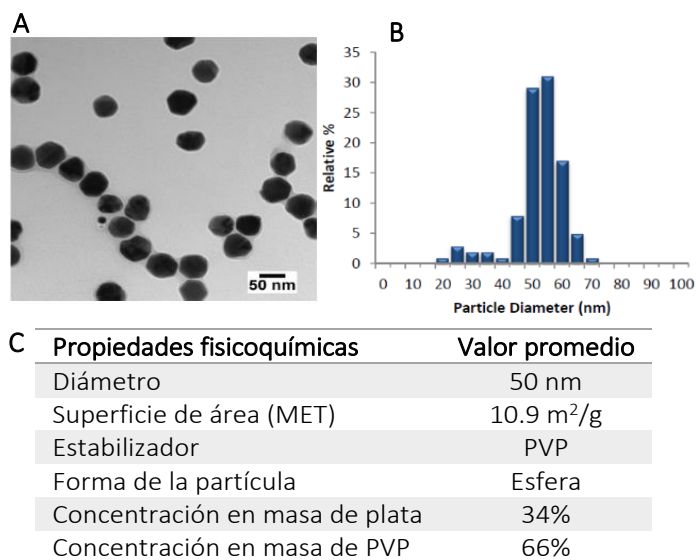
de AgNPs Argovit® se debe a que se ha utilizado en múltiples áreas de aplicación, cuenta con certificaciones para uso en aplicaciones veterinarias y humanas y esta comercialmente disponible [66,70]. Las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs Argovit® reportadas por el proveedor son: contenido de plata metálica 1.2%, contenido de revestimiento de PVP 18.8% (12,6 ± 2,7 kDa, Boai NKY Pharmaceuticals, China), tamaño de diámetro 35 nm y su distribución de tamaños es de 1 a 90 nm medido por microscopio electrónico de transmisión (MET), tienen un diámetro hidrodinámico (plata metálica con PVP) de 70 nm, un potencial zeta -15 mV y resonancia de plasmón superficial de 420 nm. La concentración final de Argovit® es 200 mg/mL (20%) de AgNPs [29]. A esta formulación se le identificará como PVP-AgNP de 35 nm (figura 1).



**Figura 1.** Características fisicoquímicas de las nanopartículas de plata Argovit®. A) Imagen que muestra la morfología esférica de AgNPs Argovit®, B) Frecuencia de distribución de tamaño de AgNPs calculada a partir de imágenes de MET, C) Resumen de las características fisicoquímicas.

## Nanopartículas de plata nanoComposix®

Además, se utilizaron nanoesferas de plata Eonix, que es una formulación comercial de AgNPs de la compañía nanoComposix®, San Diego, CA. Las nanoesferas fueron adquiridas como un polvo seco y se resuspendieron en agua para obtener las mismas condiciones experimentales que con Argovit® y emplearlas con fines comparativos. De acuerdo con los datos de caracterización proporcionados por el proveedor, el tamaño de esta formulación de AgNPs para este lote es de  $51 \pm 9$  nm, el contenido de plata metálica es el 34% de la masa y el 66% de PVP (40 kDa) como agente de recubrimiento, la resonancia plasmónica es de 430 nm. La resuspensión de AgNPs se realizó siguiendo las recomendaciones del proveedor con agua destilada para obtener una solución inicial de trabajo de 1.2 mg/mL. A esta formulación se le identificará como PVP-AgNPs de 50 nm (figura 2).

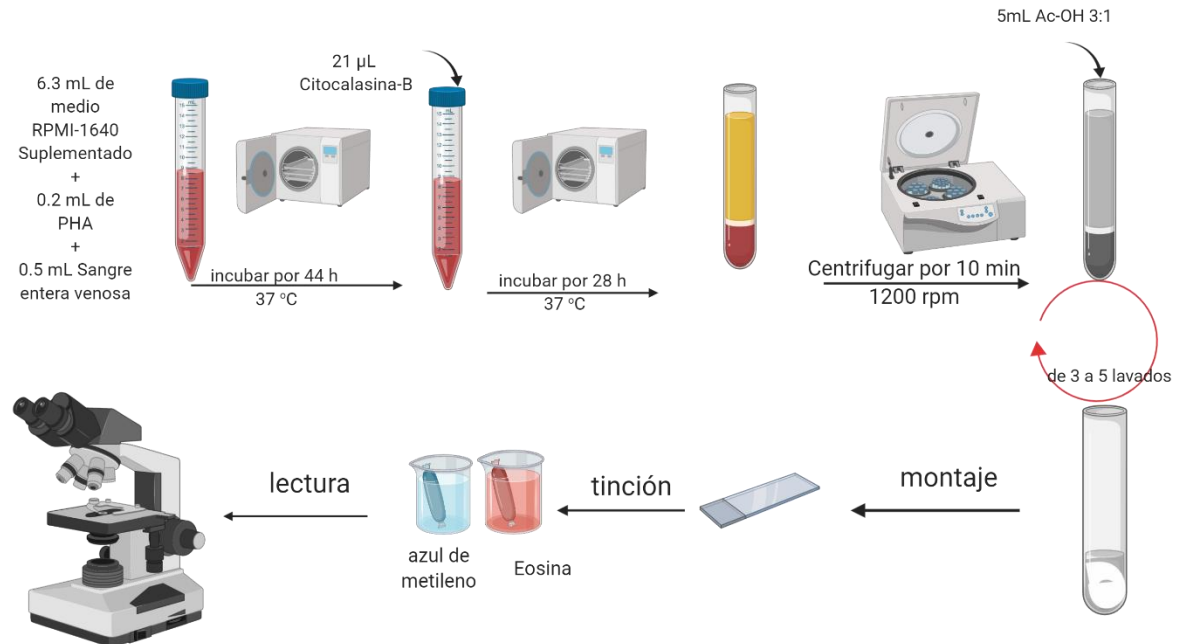


**Figura 2.** Características fisicoquímicas de las nanopartículas de plata nanoComposix®. A) Imagen que muestra la morfología esferoidal de AgNPs nanoComposix®, B) Frecuencia de distribución de tamaño de AgNPs calculada por MET, C) Resumen de las características fisicoquímicas.

### **Procedimiento de técnica de micronúcleos por bloque de la citocinesis (CBMN)**

Para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad fue necesario tomar una muestra de aproximadamente 20 mililitros 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.

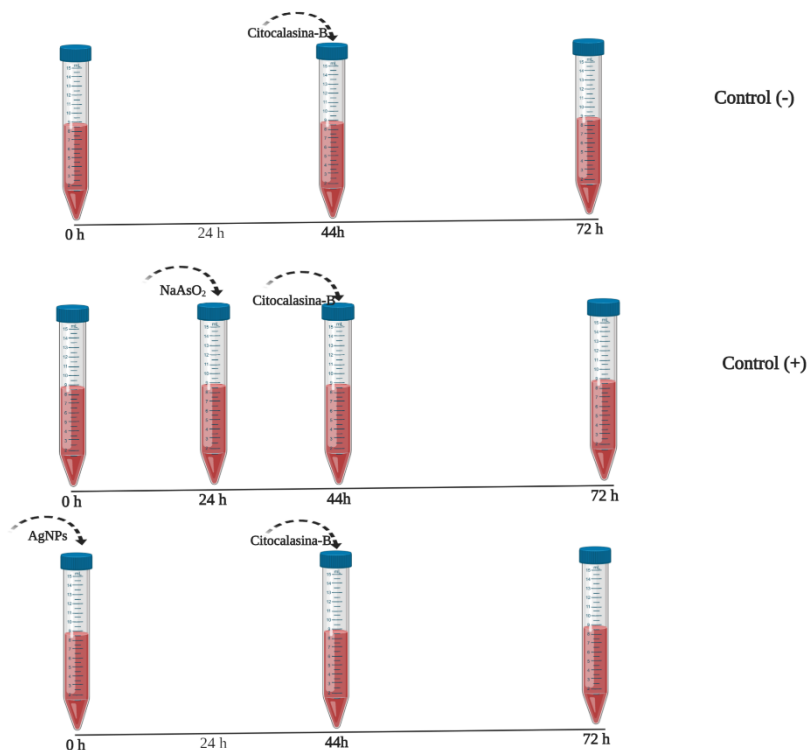
La técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (figura 3), se realizó según lo descrito por Fenech [13]. El primer paso consiste en la adición de 0.5 mL de sangre periférica heparinizada de un donante masculino, no fumador, normocítico a 6.3 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma R5886) suplementado con 1% L-Glutamina (Sigma G6392), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma M7145) y 0.2 mL de Fitohemaglutinina (1 mg/mL, Sigma L2646) este cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica, se realizó en tubos estériles de 15 mL de fondo cónico con tapa (Falcon® 352097).



**Figura 3.** Representación esquemática de los procedimientos de la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citosinesis (Fuente: elaboración propia)

Los linfocitos se incubaron a 37 °C y se expusieron a diferentes concentraciones de AgNPs: 0.012, 0.12, 1.2 y 12 µg/mL. Las diluciones se calcularon de acuerdo con el contenido de plata metálica de las formulaciones Argovit® y nanoComposix®. La solución fisiológica y NaAsO<sub>2</sub> (0.12 µg/mL, Sigma S7400, St. Louis, MO) se utilizaron como controles negativos y positivos. En el experimento, NaAsO<sub>2</sub> se agregó 24 horas más tarde que el resto de los compuestos analizados para evitar enmascarar el daño genotóxico por su poderoso efecto citotóxico. Se incluyó un experimento adicional con PVP (0.0188 y 188 µg/mL) para evaluar el impacto del agente de recubrimiento de las AgNPs (figura 4). Una vez agregadas las cantidades arriba mencionadas, los tubos se mezclaron suavemente con un vortex a velocidad baja, hasta que el cultivo quedo bien homogenizado, se colocó en una gradilla, en posición semihorizontal y se incubo a 37 °C por 44 horas. Después de 44 horas, se bloqueó la citocinesis de los linfocitos agregando 3 µL/mL

de Citocalasina-B (Sigma C6762) a una cocentración de 2 mg/mL, se mezcló suavemente el contenido del tubo con un vortex a velocidad baja para que el reactivo actúe bloqueando de manera homogénea todo el cultivo celular, una vez bloqueada la citocinesis se incubo por 28 horas más a 37 °C.



**Figura 4.** Representación esquemática de los diferentes tratamientos para cada cultivo. Los tubos representan los hemocultivos tratados con AgNPs o NaAsO<sub>2</sub>. (Fuente: Elaboración propia)

Para la cosecha del cultivo celular se utilizó como fijador una disolución de metanol (Sigma-Aldrich 34860) y ácido acético glacial (Sigma-Aldrich ARK2183) con una proporción de 3:1 MeOH:AcOH. Se sacaron los cultivos de la incubadora y con una pipeta automática de 1 mL se resuspendieron suavemente. Se agregó 1 mL de fijador suavemente por las paredes del tubo,

se tapó y se mezcló agitando suavemente el tubo, se centrífugo el cultivo por 10 minutos a 1200 revoluciones por minuto (rpm). Una vez terminada la centrifugación se extrajo el sobrenadante dejando aproximadamente 2 mL de cultivo en los tubos. Se resuspenden las células suavemente, se agregaron 5 mL de fijador y se centrífugo el cultivo por 10 minutos a 1200 rpm. Se siguió lavando el cultivo agregando cada vez 5 mL de fijador y centrifugando, hasta que se obtuvo un botón celular de apariencia esponjosa y de color café claro.

Con una pipeta automática de 1 mL se resuspende el botón celular, posteriormente se reabsorbió totalmente y se colocó el cultivo en un portaobjetos previamente rotulado, cuidando que esté bien frío. La preparación se efectuó a manera de zig-zag esparciendo las células por toda la superficie del portaobjetos, se dejaron secar en posición horizontal para que las células se adhieran al portaobjetos.

Para teñir las células se utilizó eosina-B (Sigma 2853) y azul de metileno (Sigma O3978), se sumergió cada laminilla primero en la eosina-B y se escurrió rápidamente en posición vertical sobre una toalla para quitar el excedente; inmediatamente después se introdujo en azul de metileno, se escurrió, se lavó con agua destilada muy suavemente y se puso a secar al ambiente en posición vertical, tapadas con un recipiente para que no se acumule polvo en la preparación. Las células se contaron usando un microscopio de campo de luz (Primo Star Zeiss) con un lente objetivo de 100x.

## Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad

Los biomarcadores de daño citotóxico que se tomaron en cuenta son: el índice de división nuclear (NDI), calculado de acuerdo a la ecuación 1 y el porcentaje de apoptosis y de necrosis calculado en 500 células contadas; en este total se toman en cuantas células mononucleadas (MONO), binucleadas (BN), trinucleadas (TRIN) y tetranucleadas (TETTRAN). Para considerar la genotoxicidad se tomó en cuenta la frecuencia de micronúcleos (MNI), la frecuencia de brotes nucleares (NBUDs) así como la frecuencia de puentes nucleoplasmicos (NPBs) por cada 1000 células binucleadas contadas, a partir de cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

$$NDI = \frac{MONO(1) + BN(2) + TRIN(3) + TETTRAN(4)}{500 \text{ células contadas}} \dots \dots \dots (1)$$

Para garantizar la homocedasticidad entre los grupos experimentales, se llevó a cabo una transformación de raíz cuadrada [71] que se sugiere para las variables con la bondad de ajuste al modelo de Poisson, como micronúcleos y otras anomalías nucleares, [72] de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\hat{X} = \sqrt{X + \frac{1}{2}}$$

$\hat{X}$  es el estimador de la variable transformada y X es la variable original, número de anomalías contadas.

Los datos transformados se analizaron utilizando StatSoft y Graph-Pad-Prism v8. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple post hoc de Tukey. \* Indica

diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), \*\* indica diferencias muy significativas ( $p \leq 0.01$ ), y \*\*\* indica diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.001$ ) en comparación con el control negativo (linfocitos sin tratamiento), mientras que § indica que las diferencias son significativas ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con el control positivo (arsenito de sodio). El valor p de cada análisis se indica en la parte superior de la figura correspondiente.

## Resultados y Discusión

La evaluación de los efectos citotóxicos y genotóxicos de los nanomateriales representa un problema reciente debido a su amplia presencia en todo el mundo, especialmente para las nanopartículas de plata con posibles aplicaciones biomédicas. Además, el modelo utilizado para evaluar la toxicidad de los AgNPs sigue siendo uno de los mayores desafíos. En este sentido, el uso de datos confiables y comparables con el uso de metodologías reproducibles y precisas es esencial para facilitar la toma de decisiones sobre el trabajo seguro con nanomateriales.

En particular, el ensayo CBMN es una técnica robusta que permite la evaluación simultánea de seis biomarcadores, proporcionando resultados notables con cultivos primarios, especialmente con linfocitos de sangre periférica humana, que, durante mucho tiempo, se han identificado como indicadores extremadamente sensibles de daño genotóxico [73]. Sin embargo, hasta donde se sabe, esta técnica se ha infrutilizado para la evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad de AgNPs [5,41,74,75]. Los resultados presentados en las figuras 5 y 6 demuestran que el ensayo CBMN es una técnica útil y reproducible para determinar los efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de plata, pero también muestran la necesidad de considerar los seis biomarcadores proporcionados por la técnica para generar una idea más completa respecto a los posibles daños producidos por el nanomaterial.

---

Tabla 2. Valores de referencia para linfocitos de personas sanas descritos por Fenech, analizados con la técnica de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (CBMN) [76].

---

Parámetro	Valor	Cantidad de células contabilizadas
-----------	-------	------------------------------------

---

<b>* Citotoxicidad</b>		
Índice de división nuclear (NDI)	1.3 a 2.2	500 células contadas
Células necróticas	0 al 9%	500 células contadas
Células en apoptosis	0 al 7%	500 células contadas
<b>* Genotoxicidad</b>		
Micronúcleos (MNI)	0 a 30	1000 células binucleadas contadas
Puentes nucleoplásmicos (NPBs)	0 a 10	1000 células binucleadas contadas
Brotos nucleares (NBUDs)	0 a 5	1000 células binucleadas contadas

La figura 5 muestra los biomarcadores de la CBMN que se utilizan para evaluar la capacidad de división que tienen los linfocitos humanos de sangre periférica, así como la apoptosis o muerte celular programada y la necrosis, todos ellos indicadores de citotoxicidad. La figura 5a muestra el índice de división nuclear (NDI) de los linfocitos expuestos a diferentes concentraciones (0.012 a 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de nanopartículas de plata con recubrimiento de PVP, AgNPs Arogovit® (PVP-AgNPs de 35 nm) y AgNPs nanoComposix® (PVP-AgNPs de 50 nm), dos concentraciones de PVP (0.0188 y 188  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y arsenito de sodio (0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Todos los valores están dentro del intervalo descrito por Fenech para una población de personas sanas, tabla 2 [76], excepto por los linfocitos expuestos al arsenito de sodio, que muestra una pequeña disminución en su valor de NDI a 1.11.

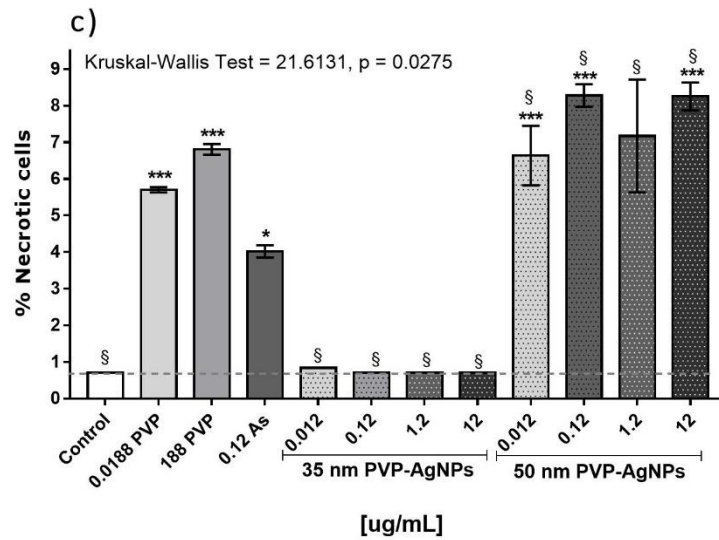
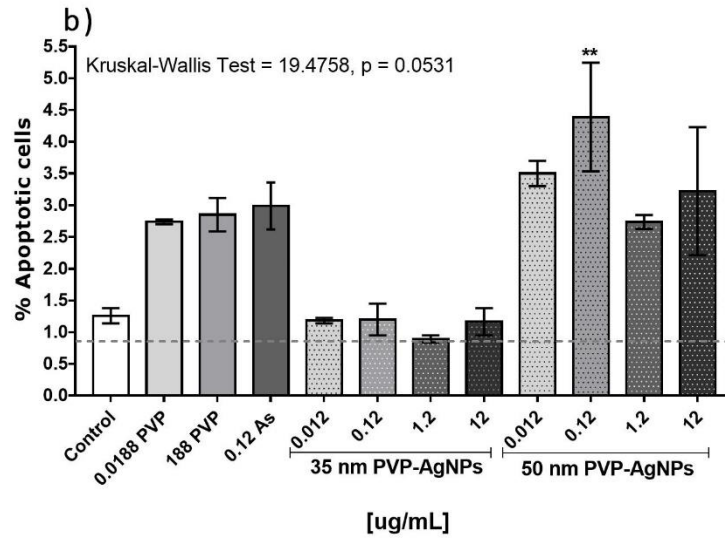
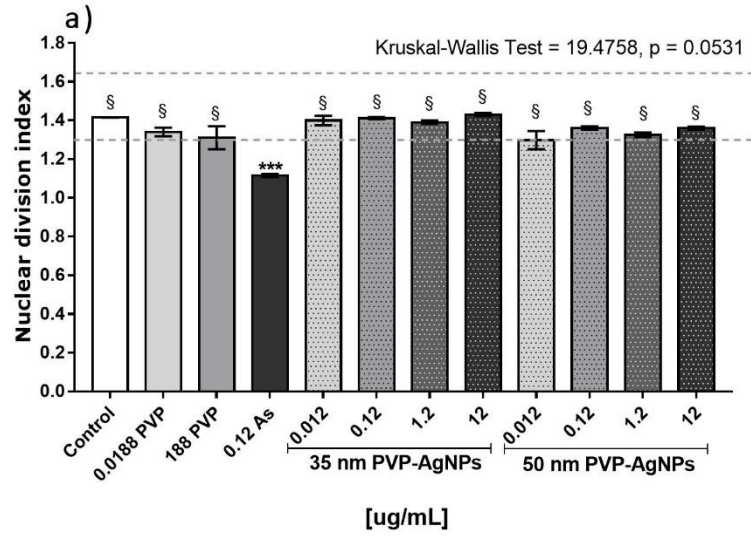
El efecto citotóxico del arsénico sobre los linfocitos humanos se ha descrito ampliamente en la literatura [77–79]. Según estos estudios, se sabe que la CI50 de arsenito de sodio en células mononucleares periféricas depende del tiempo de exposición, con valores superiores a 10  $\mu\text{M}$

después de 24 horas de exposición y 5  $\mu\text{M}$  después de 48 y 72 horas [80]. Por otro lado, Colognato y colaboradores, encontraron que la disminución del NDI en los linfocitos humanos de sangre periférica, muestra una dependencia de la concentración con un valor del NDI comparable a la encontrada en este trabajo con la misma concentración de arsenito de sodio 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1  $\mu\text{M}$ ) [81].

En el caso de la toxicidad de la PVP, la información sobre el efecto citotóxico de este compuesto directamente en los linfocitos de sangre periférica humana es muy escasa. La falta de conocimiento podría deberse a la extremadamente baja toxicidad reportada para este polímero. Para la PVP se ha establecido que la DL50 es superior a 100 g/kg administrada por vía oral y 10 g/kg por vía intravenosa o intraperitoneal [82]. La solución acuosa de PVP al 5% y 10% en lugar de DMSO se ha utilizado con éxito para la crioconservación de linfocitos humanos. Desafortunadamente, no se indica el peso molecular del polímero empleado [83], ya que la toxicidad de la PVP depende de su peso molecular [84]. Por lo antes mencionado, parece razonable que la PVP, en ambas concentraciones empleadas aquí, no afecte la división celular (figura 5a).

No es posible determinar el efecto citotóxico de ninguna sustancia solo evaluando el índice de división nuclear sin evaluar otros biomarcadores citotóxicos. Teniendo en cuenta solamente los valores del NDI parece que ninguno de los materiales evaluados en este trabajo produce cambios en la proliferación de linfocitos, excepto el arsenito de sodio. Sin embargo, como se observa en los siguientes párrafos, al analizar los datos de apoptosis y necrosis se encontraron diferencias importantes. Vecchio y sus colaboradores describen un caso similar al presente estudio al encontrar diferencias sutiles para formulaciones de AgNPs de diferentes tamaños y

agentes de recubrimiento, pero con diferencias esenciales en sus efectos genotóxicos. Ellos describen específicamente la diferencia en la frecuencia de células micronucleadas presentes, pero no sobre otros biomarcadores citotóxicos [74].



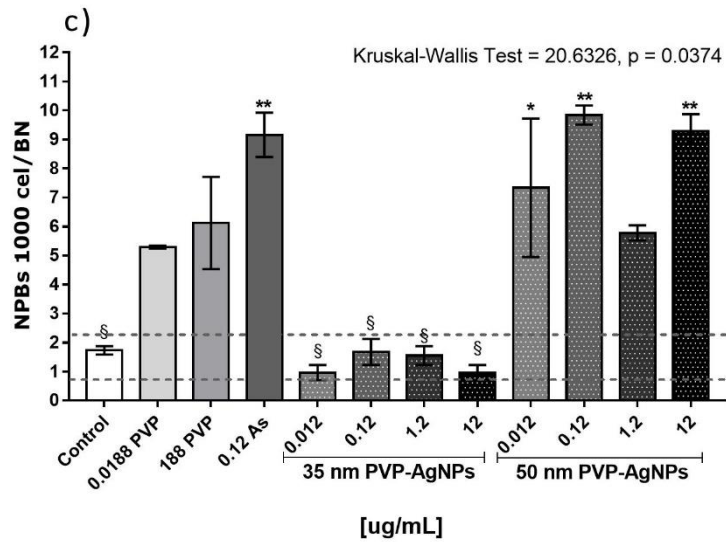
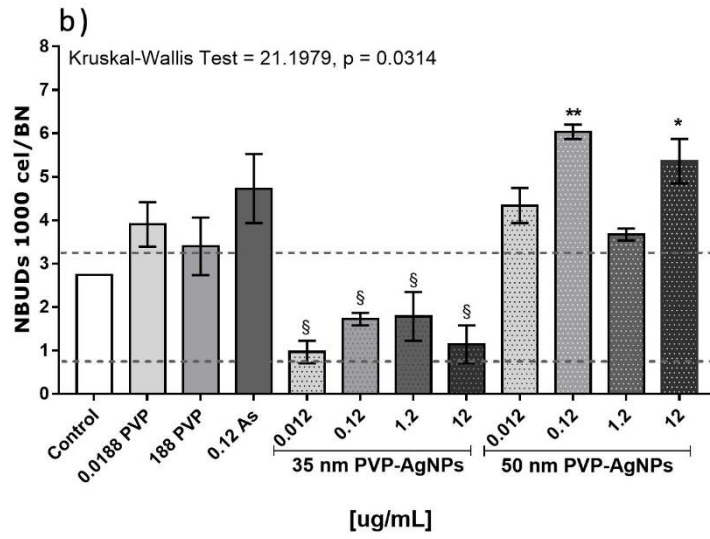
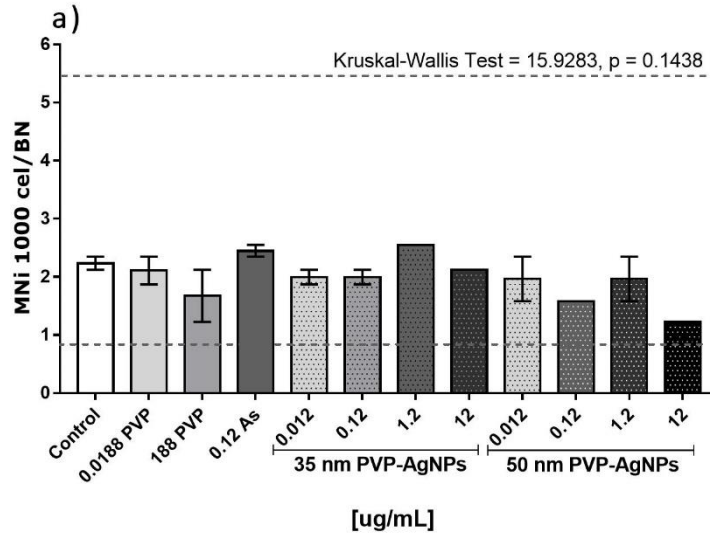
**Figura 5.** Biomarcadores de citotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana cultivados in vitro con PVP-AgNPs de 35 nm y 50 nm a diferentes concentraciones: 0.012, 0.12, 1.2 y 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; control negativo, control de PVP (0.0188 y 188  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y  $\text{NaAsO}_2$  (0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como control positivo. (a) Índice de división nuclear (NDI) (b) Porcentaje de apoptosis (c) Porcentaje de necrosis. Las líneas de puntos muestran los valores estándar encontrados en los donantes sanos para cada biomarcador. El análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ) se utilizó para analizar los datos; las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica las diferencias significativas en comparación con el control negativo (linfocitos sin tratamiento), mientras que § indica diferencias significativas en comparación con el control positivo (arsenito de sodio).

Ninguno de los compuestos evaluados presenta una diferencia significativa en la inducción de la apoptosis en comparación con el control positivo y prácticamente ninguno en comparación con el control negativo. La única excepción para este último fue la concentración de 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de las PVP-AgNPs de 50 nm como se muestra en la figura 5b.

Por otro lado, la inducción de necrosis mostró resultados interesantes. La necrosis observada en los linfocitos expuestos al arsenito de sodio podría ser activada por especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de oxígeno (ROS) en una vía dependiente de las mitocondrias, y esto podría abatir el sistema antioxidante de las células que provocan los procesos necróticos [85]. Por su parte, la PVP (12.6  $\pm$  2.7 kDa) a ambas concentraciones evaluadas (0.0188 y 188  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mostró un aumento importante en la frecuencia de necrosis. Se encontraron resultados similares para todas las concentraciones evaluadas (0.012 a 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de las PVP-AgNPs de 50 nm. Ambos, PVP y las PVP-AgNPs de 50 nm, inducen una necrosis aún mayor que el arsenito de sodio (4.0  $\pm$  0.16%) y de 8 a 11 veces más células necróticas que el control negativo. Por el contrario, ninguna de las concentraciones de las PVP-AgNPs de 35 nm analizadas mostró una diferencia significativa en comparación con el control negativo, a pesar de que el agente de recubrimiento induce un aumento de necrosis por sí mismo (figura 5c).

Los resultados descritos antes muestran claramente la importancia de evaluar todos los biomarcadores citotóxicos proporcionados por el ensayo CBMN que, a su vez, permitirá definir las condiciones experimentales para el ensayo de genotoxicidad evitando el efecto de enmascaramiento de la citotoxicidad. Además, se demuestra la necesidad de evaluar la respuesta específica de los agentes de recubrimiento en los sistemas estudiados. Los resultados sugieren que la falta de respuesta citotóxica de las PVP-AgNPs de 35 nm puede atribuirse a toda la nanopartícula.

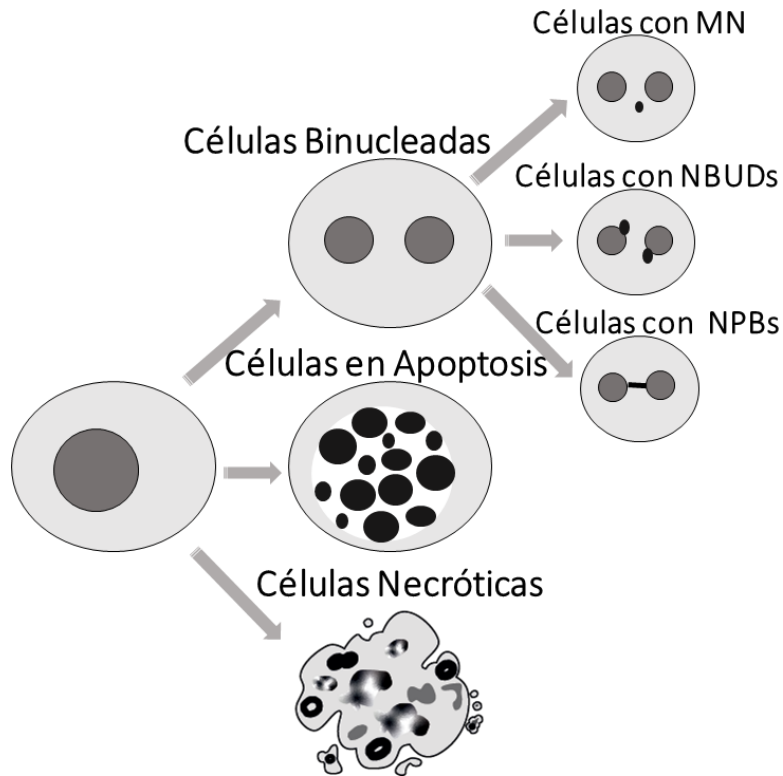
Como se muestra en este trabajo la exposición de linfocitos humanos de sangre periférica a diferentes especies químicas no produce un aumento en el número de micronúcleos en comparación con el grupo de control negativo. En este caso, tampoco se observó diferencia entre todos los compuestos evaluados y el control positivo. Todos los compuestos, independientemente de la concentración utilizada, muestran una frecuencia de micronúcleos dentro del rango establecido para donantes sanos, (tabla 2) [76]. Nuevamente, es necesario analizar el resto de los biomarcadores proporcionados por la técnica CBMN para evitar resultados falsos negativos con respecto a los efectos genotóxicos (figura 6).



**Figura 6.** Biomarcadores de genotoxicidad en linfocitos humanos cultivados in vitro con PVP-AgNPs de 35 nm y 50 nm a diferentes concentraciones: 0.012, 0.12, 1.2 y 12  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ; un control negativo (cultivo sin tratamiento); Control de PVP (estabilizador de PVP-AgNPs de 35 nm) a 0.0188 y 188  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; y un control positivo (0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{NaAsO}_2$ ). Las columnas representan la frecuencia de (a) micronúcleos (MNI), (b) brotes nucleares (NBUDs) y (c) puentes nucleares (NPBs) por cada 1000 células binucleadas (BN). Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. La línea de puntos representa los valores promedio de los biomarcadores de genotoxicidad encontrados en donantes sanos. \* indica las diferencias significativas en comparación con el control negativo (linfocitos sin tratamiento), mientras que § indica diferencias significativas en comparación con el control positivo (arsenito de sodio).

El tratamiento con arsenito de sodio no produce una diferencia significativa de micronúcleos (MNI) en los linfocitos expuestos en comparación con el control negativo. Sin embargo, el aumento de brotes nucleares (NBUDs) y puentes nucleoplasmicos (NPBs) puede considerarse como el resultado del daño celular provocado por el arsenito. La falta de MNI fue una respuesta esperada porque al usar concentraciones más altas de arsenito mayor es el efecto citotóxico que finalmente enmascara el daño genotóxico visible. Los efectos de daños genotóxicos se muestran esquemáticamente en la figura 7.

Se encontró un efecto similar al descrito anteriormente para el arsenito de sodio con el peróxido de hidrógeno; aumentando el daño a medida que aumenta la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se produce una mayor necrosis y una menor apoptosis. Contrariamente a lo observado para el arsenito de sodio, con el peróxido de hidrógeno también el aumento de la frecuencia de micronúcleos, presenta un comportamiento de dependencia de la concentración [16].



**Figura 7.** Daño citotóxico y genotóxico que puede ser rastreado por el ensayo CBMN.

Los brotes nucleares (NBUDs) [86] pueden interpretarse como intentos de reparación de daños en el ADN al amplificar el material genético que se elimina durante la fase S del ciclo celular [87,88]. En el presente estudio, solo dos concentraciones de la formulación de PVP-AgNPs de 50 nm, 0.12 y 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , presentan una mayor frecuencia de NBUDs estadísticamente significativa en comparación con el control negativo (figura 6b). La PVP y arsenito de sodio también mostraron una mayor frecuencia en NBUDs, aunque las diferencias entre ellos y el control negativo no fueron estadísticamente significativas. Por el contrario, solo las PVP-AgNPs de 35 nm, independientemente de la concentración, mostraron una frecuencia más baja que el control negativo. A pesar de que no hubo una diferencia estadísticamente significativa con el

control negativo, las PVP-AgNPs de 35 nm fueron las únicas que mostraron una diferencia significativa en comparación con el arsenito de sodio con la frecuencia más baja de NBUDs (figura 6b).

Por su parte, los NPBs se originan durante la anafase y se forman cuando los centrómeros de los cromosomas dicéntricos se extienden a los polos opuestos de la célula durante la mitosis, lo que resulta en una unión entre los dos nuevos núcleos formados [86,89,90]. Como se observó para los NBUDs, la PVP, el arsenito de sodio y las PVP-AgNPs de 50 nm mostraron una mayor frecuencia de NPBs que el control negativo, aunque sin diferencia estadística para la PVP. De nuevo, las concentraciones de PVP-AgNPs de 35 nm independientemente de la concentración, mostraron la frecuencia de NPBs más baja. El control negativo y las PVP-AgNPs de 35 nm fueron los únicos que mostraron una diferencia significativa en comparación con el arsenito de sodio como control positivo (figura 6c).

Estos resultados reflejan la inestabilidad genómica que podría ser causada por las PVP-AgNPs de 50 nm al formar regiones teloméricas de ADN amplificadas que eventualmente pueden separarse del núcleo principal, formando aberraciones cromosómicas como MNi, NBUDs y NPBs [86,90]. Por lo tanto, podría proponerse el mismo daño para los linfocitos expuestos a arsenito de sodio y PVP.

A pesar de la falta de una mayor frecuencia de MNi en los linfocitos expuestos al arsenito de sodio, el aumento de la frecuencia de NBUDs y NPBs deja claro el daño nuclear producido. Varios estudios proponen que la formación de NPBs se asocia con roturas en las cadenas de ADN causadas por inhibidores de la síntesis o reparación del ADN [91]. Esto podría significar

que, eventualmente, este daño también puede ocasionar MNi en las últimas etapas de la división celular [76], que se puede observar si el efecto citotóxico no predomina. Por lo anterior, el daño nuclear manifestado como NBUDs y NPBs en este trabajo debe ser un factor importante que permita explicar el aumento significativo de células necróticas en comparación con el control negativo, especialmente para PVP y las PVP-AgNPs de 50 nm.

El análisis comparativo de la respuesta de los linfocitos expuestos a arsenito de sodio, PVP y diferentes concentraciones de las PVP-AgNPs de 35 nm y las PVP-AgNPs de 50 nm, muestra claramente, por un lado, la ausencia de daño del material nuclear y los efectos citotóxicos de la formulación de las PVP-AgNPs de 35 nm y, por otro lado, los resultados completamente opuestos entre las PVP-AgNPs de 35 nm y las PVP-AgNPs de 50 nm.

Las diferencias de las formulaciones de PVP-AgNPs de 35 nm y PVP-AgNPs de 50 nm se basan en el tamaño de las nanopartículas, el peso molecular del agente de recubrimiento y la relación Ag:PVP. Como ya se mencionó [74], los cambios en la viabilidad de los linfocitos causados por las formulaciones de las PVP-AgNPs que usan PVP de 40 kDa como agente de recubrimiento, presentan una dependencia del tiempo y la concentración independientemente del tamaño de las nanopartículas, mientras que el daño genotóxico mostró una relación inversa con el tamaño de las nanopartículas.

Los resultados encontrados en este trabajo concuerdan con el comportamiento recién descrito, lo que se puede asociar con el peso molecular de PVP y la proporción Ag:PVP empleadas para generar las formulaciones de PVP-AgNPs; así, la toxicidad de PVP se asoció con el peso molecular del polímero [84]. La información es muy escasa sobre los efectos de la PVP en la viabilidad y

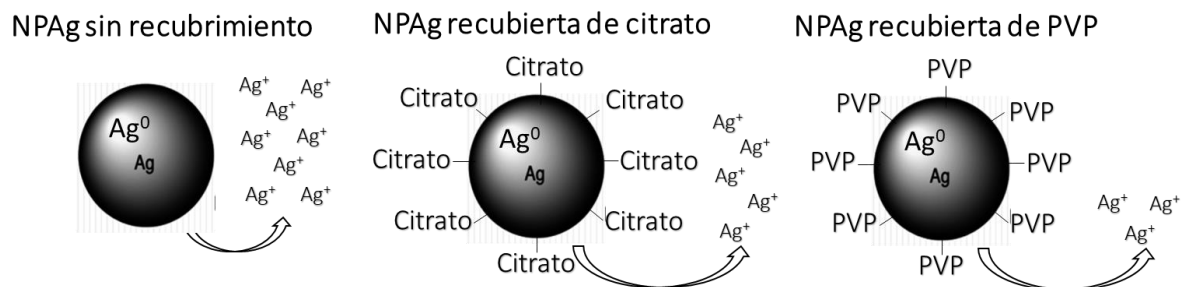
genotoxicidad de los linfocitos, por lo tanto, se deben realizar experimentos adicionales para aclarar su posible contribución a los efectos citotóxicos y genotóxicos en sistemas específicos, como los cultivos primarios.

Por otro lado, independientemente de la tendencia citotóxica y genotóxica observada para las AgNPs, no se puede hacer una generalización del efecto producido por las diferentes formulaciones de AgNPs. Varios informes han demostrado que las formulaciones de AgNPs menos estables, como las AgNPs sin recubrimiento de 3 a 7 nm estudiados por Joksic y colaboradores, provocaron daños citotóxicos y genotóxicos significativos con relación al tamaño y a la concentración en linfocitos humanos. Cuanto mayor sea la concentración de nanopartículas, menor será el NDI y mayor será la frecuencia de MNi. Sin embargo, en el mismo trabajo, los autores encontraron que las AgNPs sin recubrimiento de 2 nm promueven la proliferación celular, que está estrechamente relacionada con un aumento positivo del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) [92].

Ivask y colaboradores proporcionaron resultados interesantes del efecto de las AgNPs en los linfocitos humanos, encontraron que las AgNPs recubiertas con citrato ( $CI_{50} = 12.5 \mu\text{g/mL}$ ) son menos citotóxicas que las AgNPs más estables recubiertas con polietilenoimina ( $CI_{50} = 5.25 \mu\text{g/mL}$ ), ambas nanopartículas con prácticamente el mismo tamaño (18 nm). La citotoxicidad de la primera se atribuye a la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  debido a su menor estabilidad, mientras que, para la última, la citotoxicidad se atribuye a la nanopartícula completa debido a su alta estabilidad. Además, la cantidad de iones liberados por la nanopartícula recubierta con citrato no pueden generar el daño citotóxico observado. Ambas AgNPs de 18 nm promueven la aparición de marcadores de apoptosis en el 10% de las células en todas las concentraciones

evaluadas, a su vez, se observó un comportamiento dependiente de la concentración para la necrosis, alcanzando valores tan altos como el 50% de la población celular [93].

Por lo tanto, la estabilidad proporcionada por el agente de recubrimiento es crucial para los efectos citotóxicos observados en linfocitos humanos como se muestra esquemáticamente en la figura 8. Contrariamente a lo descrito por Ivask para polietilenimina-AgNPs [93], Vecchio y colaboradores encontraron que las AgNPs recubiertos con PVP disminuyen el daño genotóxico en los linfocitos humanos en comparación con las AgNPs de citrato. Incluso para las nanopartículas más pequeñas, los efectos de genotoxicidad fueron más moderados cuando se utilizó PVP como agente de recubrimiento en comparación con AgNPs de tamaño similar estabilizadas con citrato [74].



**Figura 7.** Estabilidad de AgNPs respecto al agente de recubrimiento. Las interacciones de los agentes de recubrimiento con la superficie de AgNPs proporcionan diferentes grados de estabilidad, así como interacciones más estables y menor cantidad de liberación de iones de Ag<sup>+</sup>.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los descritos anteriormente con respecto a la disminución de los efectos de citotoxicidad y genotoxicidad atribuidos al uso de PVP como agente de recubrimiento. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este

estudio, y sin tener en cuenta el posible efecto citotóxico y genotóxico de la PVP de 40 kDa, se puede asumir que el aumento de la cantidad de PVP en la relación Ag:PVP es necesario para que las AgNP-35 nm no produzcan daño citotóxico ni genotóxico. Se sabe que el uso de PVP como agente de recubrimiento interviene en la pasivación de la superficie de las nanopartículas por los tioles, además, otros compuestos biológicos presentes en los medios de cultivo proporciona una estabilización relevante para las formulaciones de AgNPs [94]. Por lo tanto, si se considera la composición de la formulación de PVP-AgNPs de 35 nm una vez seca, la relación Ag:PVP es del 6%:94%, mientras que la relación de las PVP-AgNPs de 50 nm es del 34%:66%. Las diferencias en el contenido de PVP de cada formulación podrían producir una diferencia significativa en el efecto opuesto encontrado para las formulaciones de PVP- AgNPs de 35 nm y PVP- AgNPs de 50 nm.

Según Ivask y colaboradores, el CI50 para iones de plata de una solución de  $\text{AgNO}_3$  en linfocitos primarios humanos es de 1.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [93], mientras que la PVP ( $12.6 \pm 2.7$  kDa) evaluada en este trabajo produce efectos citotóxicos y genotóxicos en los linfocitos como se muestra en las figuras 5 y 6. Por lo tanto, los efectos citotóxicos y genotóxicos observados para la formulación de las PVP-AgNPs de 35 nm deben asociarse con toda la nanopartícula y no a sus componentes por separado.

La identificación de los factores que provocan la respuesta biológica de cada formulación de AgNPs es crítica, debido a que, la citotoxicidad diferencial provocada por ellos no solo está relacionada con sus características físicoquímicas sino también con el tipo celular. Greulich y sus colaboradores muestran que las concentraciones de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PVP-AgNPs con respecto a la plata total determinada por espectroscopía de absorción atómica (AAS, por sus siglas en

inglés) no disminuyen la viabilidad celular de los linfocitos T aislados de sangre periférica humana, mientras que las concentraciones que comienzan a partir de 20 µg/mL muestran un comportamiento dependiente de la concentración en monocitos de la misma muestra de sangre [44].

Además, una formulación de PVP-AgNPs de 20-30 nm disponible en el mercado también presenta toxicidad diferencial entre células tumorigénicas y no tumorigénicas (PVP, 0.2% en peso de SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, TX, EE. UU.). Esta formulación mostró un alto potencial de inhibición en el crecimiento de células de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231, BT-549 y SUM-159, contrario a lo ocurrido en las líneas celulares no tumorigénicas MCF-10A, HMECs (184B5) y en HMEC post-éxtasis [95].

Para contextualizar la importancia de los resultados obtenidos en este trabajo, se compararon los resultados obtenidos con otros encontrados sobre la viabilidad de las líneas celulares de tumores humanos expuestas a la misma formulación de las PVP-AgNPs de 35 nm, encontrándose una excelente selectividad de los efectos citotóxicos. La CI50 encontrada para AgNPs en líneas de células tumorales humanas de mama (MDA-MB-231 y MCF-7), cuello uterino (HeLa), próstata (DU-145), colorrectal (DLD-1 y HT-29), pulmón (H1299 y H1437) están dentro del intervalo 1.82-3.43 µg/mL después de 24 horas de exposición. En todas las células tumorales, la apoptosis es la principal vía activada, probablemente desencadenada por la sobreproducción de ROS. No se observó evidencia de daño en el ADN o genotoxicidad en estas células [68]. Mientras tanto, una concentración de 12 µg/mL, que representa una concentración de 3.5 a 6.6 veces mayor que la utilizada para eliminar la mitad de la población de cultivos de

células tumorales, no muestra ningún signo de citotoxicidad y mucho menos de genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana, (figuras 5 y 6).

El uso de la formulación de PVP-AgNPs de 35 nm como agente antiviral contra el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) [52], o la aplicación como agente desinfectante y promotor de crecimiento en la micropropagación de plantas pueden provocar que los seres humanos puedan estar en contacto con AgNP-35nm [48,49]. La concentración utilizada para mejorar la respuesta inmunológica de los camarones infectados con WSSV (12 ng/mL,) es tres órdenes de magnitud menor [52] que la concentración más alta utilizada en este trabajo (12 µg/mL). Por otro lado, se informó que las concentraciones de 25 y 50 µg/mL son útiles como agentes antimicrobianos y horméticos en la caña de azúcar [49] y vainilla [48]. Como se ha demostrado, estas concentraciones tampoco fueron genotóxicas para la planta [50].

La concentración más alta de las PVP-AgNPs de 35 nm analizada en este trabajo, 12 µg/mL de AgNPs, no presento citotoxicidad ni genotoxicidad para linfocitos humanos. Teniendo en cuenta que el experimento se realizó en 0.5 mL de sangre periférica y que un ser humano de 70 kg tiene 5 litros de sangre, incluso la administración de una dosis tan alta como 60 mg de plata metálica, que debería estar contenida en 1 g de formulación de AgNPs concentrada debería ser una concentración segura para linfocitos humanos expuestos a ella.

Esta cantidad de plata metálica, 60 mg, es más de tres órdenes de magnitud mayor que la concentración más alta empleada en los experimentos de micropropagación (50 µg/mL). Por lo tanto, considerando que la tasa de absorción de plata coloidal después de la aplicación oral puede ser tan alta como el 5% y que las tasas de retención en humanos en condiciones normales

de exposición diaria a la plata están entre 0 y 10% [96], sería necesario un volumen de administración oral de más de 1 litro de la formulación de AgNPs concentrada para superar las condiciones de ausencia de daño encontrado en los linfocitos humanos en este trabajo, una dosis absolutamente fuera de la realidad.

Hasta donde se sabe, este es el primer informe en el que se analiza el efecto de las AgNPs con los seis biomarcadores de la prueba de MNi mediante el bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células de linfocitos humanos de donantes sanos, la formulación de PVP-AgNPs 35 nm estudiada aquí no mostró citotoxicidad ni efectos genotóxicos con ninguna de las concentraciones evaluadas. Como se ha expresado recientemente, este ensayo de punto final es una de las pruebas más sólidas en la evaluación de la citotoxicidad y la genotoxicidad [97].

Ninguno de los biomarcadores evaluados en linfocitos humanos expuestos a la formulación de PVP-AgNPs de 35 nm produjo diferencias en comparación con los resultados encontrados en los linfocitos del control sin tratamiento. Esto permite concluir que las PVP-AgNPs de 35 no son citotóxicos ni genotóxicos para uno de los agentes de primera respuesta del sistema inmunológico, los linfocitos de sangre periférica. Además, la cantidad de esta formulación administrada por vía oral necesaria para producir daño en los linfocitos humanos es realmente alta, más de 1 litro de la formulación concentrada.

Por su parte se identificó que la baja concentración de PVP ( $12.6 \pm 2.7$  kDa) analizada en este trabajo ( $0.0188 \mu\text{g/mL}$ ) comienza a afectar a los linfocitos de sangre periférica humana, induciendo marcadores de necrosis y aumentando la frecuencia de NBUDs y NPBs. Sin embargo, la presencia de PVP ( $12.6 \pm 2.7$  kDa) como agente de recubrimiento de la formulación de PVP-

AgNPs de 35 nm no muestra ninguno de estos efectos adversos. Esta es una evidencia adicional de que toda la nanopartícula es responsable de los efectos biológicos, debido a que ninguno de los componentes individuales de la formulación de AgNPs presenta la misma respuesta biológica por separado, que la encontrada para la formulación completa (PVP-AgNPs) estudiada en este trabajo.

## Conclusiones

Los resultados del presente estudio han demostrado que la formulación de PVP-AgNPs de 35 nm (Argovit®), en el intervalo de concentración de 0.012-12 µg/mL no es genotóxica ni citotóxica para los linfocitos de sangre periférica humana, en cambio, en la formulación de PVP-AgNPs de 50 nm, si se observó citotoxicidad tomando en cuenta el porcentaje de apoptosis y necrosis observado con las concentraciones evaluadas (0.012-12 µg/mL).

La consideración de los seis parámetros, índice de división celular, necrosis, apoptosis, micronúcleos, brotes nucleares y puentes nucleoplasmicos, permite confirmar positivamente la biocompatibilidad de la formulación de AgNPs Argovit® (PVP-AgNPs de 35 nm) con uno de los agentes que son fundamentales en la primera respuesta del sistema inmunológico, los linfocitos de sangre periférica humana.

No se encontró evidencia de daño citotóxico o genotóxico para la formulación de PVP-AgNPs de 35 nm, en contraste con el daño celular producido por la formulación de PVP-AgNPs de 50 nm. Estos resultados permiten identificar que la relación Ag:PVP es un factor crítico en la respuesta biológica provocada por las AgNPs, dicha relación es importante en la inducción de daño citotóxico y genotóxico en diferentes sistemas biológicos.

Se demostró que la información proporcionada por los biomarcadores más empleados, el índice de división nuclear y la frecuencia de los micronúcleos, deben complementarse indudablemente con el porcentaje de apoptosis y la inducción de necrosis, además de la frecuencia de brotes nucleares y puentes nucleoplásmicos para evaluar el daño real provocado por la sustancia evaluada, especialmente para los nanomateriales.

El uso de los seis biomarcadores en lugar de los dos o tres que comúnmente son reportados en la literatura, proporciona diferencias importantes con respecto al potencial citotóxico y genotóxico de los nanomateriales evaluados. Como ejemplo, en este trabajo se mostró que la técnica CBMN es una herramienta muy sensible que permite establecer las diferencias citotóxicas y genotóxicas de dos formulaciones de AgNPs con propiedades fisicoquímicas muy similares.

Los resultados obtenidos también revelaron que la formulación de AgNPs Argovit® mostró selectividad citotóxica, ya que las concentraciones utilizadas para producir una notable inhibición del crecimiento en varios sistemas biológicos, tales como, células tumorales, virus y bacterias patógenas, son las mismas concentraciones que producen escaso daño citotóxico y genotóxico en el cultivo humano primario (linfocitos). Esta selectividad puede ser un indicio prometedor para generar alternativas terapéuticas no solo para cáncer, virus o bacterias, sino también para enfermedades inmunológicas, neurodegenerativas o crónicas degenerativas, en estas, se puede promover la muerte celular en células con daño sin afectar de manera negativa células sanas.

Estos resultados contribuyen a generar una imagen completa sobre el uso seguro de los nanomateriales, especialmente para la formulación de AgNPs Argovit® en las diferentes áreas de aplicación que ya se han explorado y nuevas áreas que están por explorarse.

## Referencias bibliográficas

1. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2010;28(11):580–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>
2. Tanarro C, Gálvez V. Nanopartículas : ¿Un riesgo pequeño? *Cent Nac e Nuevas Tecnol*. 2009;10.
3. Foldbjerg R, Jiang X, Miclăuş T, Chen C, Autrup H, Beer C. Silver nanoparticles - Wolves in sheep's clothing? *Toxicol Res (Camb)*. 2014;4(3):563–75.
4. Kermanizadeh A, Chauché C, Brown DM, Loft S, Møller P. The role of intracellular redox imbalance in nanomaterial induced cellular damage and genotoxicity: a review. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2014;56(2):111–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25427446>
5. Panas A, Comouth A, Saathoff H, Leisner T, Al-Rawi M, Simon M, et al. Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle ( NP ) -based hydrogel. *Mutagenesis* [Internet]. 2012;2(1–2):1590–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.075>
6. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu Rev Biomed Eng* [Internet]. 2012;14(1):1–16. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>

7. Ng C-T, Li JJ, Bay B-H, Yung L-YL. Current Studies into the Genotoxic Effects of Nanomaterials. *J Nucleic Acids* [Internet]. 2010;2010:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jna/2010/947859/>
8. Sevilla B. Países líderes en la producción de plata a nivel mundial 2019 Publicado por Beatriz Sevilla, 11 mar. 2020 Esta estadística muestra un ranking de los principales países productores de plata a nivel mundial en 2019. En ese año, México fue el primer país pro. 2020.
9. Vannini C, Domingo G, Onelli E, Prinsi B, Marsoni M, Espen L, et al. Morphological and Proteomic Responses of *Eruca sativa* Exposed to Silver Nanoparticles or Silver Nitrate. *PLoS One*. 2013;8(7).
10. Handy RD, Shaw BJ. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health Risk Soc*. 2007;
11. Handy RD, Shaw BJ. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health Risk Soc*. 2007;9(2):125–44.
12. Guideline O, The FOR, Of T. *Oecd/Ocde Tg 487 Oecd Guideline for the Testing of Chemicals*. 2014;(September):1–26.
13. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007 May;2(5):1084–104.

14. Fenech M. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans. *Mutagenesis*. 2011;26(1):63–7.
15. Nersesyanyan A, Fenech M, Bolognesi C, Mišić M, Setayesh T, Wultsch G, et al. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2016;770:1–11.
16. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measure simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* [Internet]. 1999;14(6):605–12. Available from: [https://www.google.com.ng/?gfe\\_rd=cr&ei=6tMKVrO-AZDj8wf65JDgBA#q=M.+Fenech,+J.+Crott,+J.+Turner,+S.+Brown,+Necrosis,+apoptosis,+cytostasis+and+DNA+damage+in+human+lymphocytes+measure+simultaneously+with+n+the+cytokinesis-block+micronucleus+ass](https://www.google.com.ng/?gfe_rd=cr&ei=6tMKVrO-AZDj8wf65JDgBA#q=M.+Fenech,+J.+Crott,+J.+Turner,+S.+Brown,+Necrosis,+apoptosis,+cytostasis+and+DNA+damage+in+human+lymphocytes+measure+simultaneously+with+n+the+cytokinesis-block+micronucleus+ass)
17. Sepulveda MS, Stensberg MC, Wei QS, McLamore ES, Porterfield DM, Wei A. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine*. 2011;6(5):879–98.
18. Milic M, Marjanović AM, Pavičić I, Vrčec IV. Effect of charge and surface ligand properties of silver nanoparticles on toxicity in mammalian cells in vitro. *Toxicol Lett*. 2015;238(2):2015.

19. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal* [Internet]. 2014;22(1):116–27. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
20. Stensberg MC, Wei Q, Mclamore ES, Marshall D. *NIH Public Access*. 2012;6(5):879–98.
21. Rai M, Deshmukh SD, Ingle AP, Gupta IR, Galdiero M, Galdiero S. Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(1):46–56.
22. Lu W, Senapati D, Wang S, Tovmachenko O, Singh AK, Yu H, et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chem Phys Lett* [Internet]. 2010;487(1–3):92–6. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2010.01.027>
23. Kim HR, Kim MJ, Lee SY, Oh SM, Chung KH. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2011;726(2):129–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.08.008>
24. Li PW, Kuo TH, Chang JH, Yeh JM, Chan WH. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicol Lett*. 2010;197(2):82–7.
25. Oig EPA. Annual Superfund Report to Congress for Fiscal Year 2010. *Environ Prot*. 2010;(August).
26. Morones R. Historia de la plata : su impacto en las antiguas civilizaciones y la sociedad moderna. *Rev Digit Univ*. 2010;11(7):1–9.

27. Almonaci Hernández C, Juárez-Moreno K, Castañeda-Juarez M, Almanza-Reyes H, Pestryakov A, Bogdanchikova N. Silver Nanoparticles for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers. *Int J Med Nano Res.* 2017;4(1):1–6.
28. Juárez-Moreno K, Gonzalez EB, Girón-Vazquez N, Chávez-Santoscoy RA, Mota-Morales JD, Perez-Mozqueda LL, et al. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Hum Exp Toxicol.* 2017;36(9):931–48.
29. Valenzuela-Salas LM, Girón-Vázquez NG, García-Ramos JC, Torres-Bugarín O, Gómez C, Pestryakov A, et al. Antiproliferative and Antitumour Effect of Nongenotoxic Silver Nanoparticles on Melanoma Models. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:4528241.
30. Fauss E. The silver nanotechnology commercial inventory. Univ Virginia [Internet]. 2008;(September). Available from:  
[http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/6718/fauss\\_final.pdf](http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/6718/fauss_final.pdf)
31. Ekwall B, Silano V, Zucco F. Chapter 7 - Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. John Wiley Sons Ltd. 1990;75–98.
32. Kga M. Genetic toxicology. *Exp Toxicol.* 2007;243–312.
33. Brusick DJ. Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation. *Mutat Res Toxicol.* 1987;189(1):1–6.
34. Ci HBA, Ci GBA, R GDEM. In Vitro Testing for Genotoxicity of 4-CPA by Sister Chromatid Exchange in Human Lymphocyte Culture. 2005;35:75–8.

35. Wu Y, Zhou Q. Dose- and time-related changes in aerobic metabolism, chorionic disruption, and oxidative stress in embryonic medaka (*Oryzias latipes*): Underlying mechanisms for silver nanoparticle developmental toxicity. *Aquat Toxicol* [Internet]. 2012;124–125:238–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.009>
36. Chae YJ, Pham CH, Lee J, Bae E, Yi J, Gu MB. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol*. 2009;94(4):320–7.
37. Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol* [Internet]. 2010;100(2):151–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.012>
38. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Anh D, Jürgen H, Autrup H, et al. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett*. 2009 Oct;190(2):156–62.
39. Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials [Internet]. Vol. 30, *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2009. p. 3891–914. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>
40. AshaRani P V., Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells - SOM. *ACS Nano*. 2009 Feb;3(2):279–90.
41. AshaRani P, Hande MP, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol* [Internet]. 2009;10(1):65. Available from:

<http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-10-65>

42. Ahamed M, ALSalhi MS, Siddiqui MKJ. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010;411(23–24):1841–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.016>
43. Ghosh M, J M, Sinha S, Chakraborty A, Mallick SK, Bandyopadhyay M, et al. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2012;749(1–2):60–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.08.007>
44. Greulich C, Diendorf J, Geßmann J, Simon T, Habijan T, Eggeler G, et al. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomater* [Internet]. 2011;7(9):3505–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.030>
45. Li Y, Chen DH, Yan J, Chen Y, Mittelstaedt RA, Zhang Y, et al. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2012 Jun;745(1–2):4–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.010>
46. Kim JS, Sung JH, Ji JH, Song KS, Lee JH, Kang CS, et al. In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure. *Saf Health Work* [Internet]. 2011;2(1):34–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2093791111210059>
47. Nymark P, Catalán J, Suhonen S, Järventaus H, Birkedal R, Clausen PA, et al. Genotoxicity

of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology* [Internet]. 2013;313(1):38–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.014>

48. Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA, Bogdanchikova N, Pérez-Sato JA, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2017 May;129(2):195–207.
49. Bello-Bello JJ, Chavez-Santoscoy RA, Lecona-Guzmán CA, Bogdanchikova N, Salinas-Ruíz J, Gómez-Merino FC, et al. Hormetic response by silver nanoparticles on in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) using a temporary immersion system. *Dose-Response.* 2017;15(4):1–9.
50. Bello-Bello J, Spinoso-Castillo J, Arano-Avalos S, Martínez-Estrada E, Arellano-García M, Pestryakov A, et al. Cytotoxic, Genotoxic, and Polymorphism Effects on *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews after Long-Term Exposure to Argovit® Silver Nanoparticles. *Nanomaterials* [Internet]. 2018 Sep 25;8(10):754. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-4991/8/10/754>
51. Pimentel-Acosta CA, Morales-Serna FN, Chávez-Sánchez MC, Lara HH, Pestryakov A, Bogdanchikova N, et al. Efficacy of silver nanoparticles against the adults and eggs of monogenean parasites of fish. *Parasitol Res.* 2019;
52. Ochoa-Meza AR, Álvarez-Sánchez AR, Romo-Quiñonez CR, Barraza A, Magallón-Barajas FJ, Chávez-Sánchez A, et al. Silver nanoparticles enhance survival of white spot

syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system. *Fish Shellfish Immunol.* 2019;84(September 2018):1083–9.

53. Fuentes-Valencia MA, Fajer-Ávila EJ, Chávez-Sánchez MC, Martínez-Palacios CA, Martínez-Chávez CC, Junqueira-Machado G, et al. Silver nanoparticles are lethal to the ciliate model *Tetrahymena* and safe to the pike silverside *Chirostoma estor*. *Exp Parasitol.* 2020;
54. Romo-Quiñonez CR, Álvarez-Sánchez AR, Álvarez-Ruiz P, Chávez-Sánchez MC, Bogdanchikova N, Pestryakov A, et al. Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus infection. *PeerJ.* 2020;
55. Bravo-Guerra C, Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Pestryakov A, Bogdanchikova N. Lethal effects of silver nanoparticles on *Perkinsus marinus*, a protozoan oyster parasite. *J Invertebr Pathol.* 2020;
56. Stephano-Hornedo JL, Torres-Gutiérrez O, Toledano-Magaña Y, Gradilla-Martínez I, Pestryakov A, Sánchez-González A, et al. Argovit™ silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (: *Citrus aurantifolia* Swingle). *RSC Adv.* 2020;
57. Francisco Casillas-Figueroa, María Evarista Arellano-García, Claudia Leyva-Aguilera, Balam Ruíz-Ruíz, Roberto Luna Vázquez-Gómez, Patricia Radilla-Chávez, Rocío Alejandra Chávez-Santoscoy, Alexey Pestryakov, Yanis Toledano-Magaña JCG-R and NB. Argovit™ Silver Nanoparticles Effects on *Allium cepa*: Plant Growth Promotion without Cytotoxic Genotoxic Damage. *Nanomaterials* 2020, 10, 1386; 2020.

58. Glotov AG, Glotova TI, Sergeev AA, Sergeev AN. Study of antiviral activity of different drugs against bovine herpes virus and pestivirus. *Antibiot Khimioter.* 2004;49(6):6–9.
59. Kalmantaeva O V., Firstova V V., Potapov VD, Zyrina E V., Gerasimov VN, Ganina EA, et al. Silver-nanoparticle exposure on immune system of mice depending on the route of administration. *Nanotechnologies Russ* [Internet]. 2014;9(9–10):571–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S1995078014050061>
60. Bogdanchikova N, Huerta-saquero A, Nanociencias C De, Aguzvet CV, Picos-díaz PL. Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs Roberto Vázquez-Muñoz Antonio Pena-Jasso Gildardo Aguilar-Uzcanga Alexey Pestryakov Vasilii Burmistrov Oxana Martynyuk Roberto Luna-Vázquez-Gómez and Horacio Almanza. *Int J Nanotechnol.* 2016;13(1):227–37.
61. Gmoshinski I V., Shumakova AA, Shipelin VA, Maltsev GY, Khotimchenko SA. Influence of orally introduced silver nanoparticles on content of essential and toxic trace elements in organism. *Nanotechnologies Russ.* 2016;
62. Zeinalov OA, Kombarova SP, Bagrov D V, Petrosyan MA, Tolibova GH, Feofanov A V, et al. About the Influence of Silver Nanoparticles on Living Organisms Physiology. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther.* 2016;14(4):42–51.
63. Borrego B, Lorenzo G, Mota-Morales JD, Almanza-Reyes H, Mateos F, López-Gil E, et al. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of rift valley fever virus in vitro and in vivo. *Nanomedicine.* 2016 Mar;12(5):1185–92.
64. Shkil NN, Nefedova E V., Burmistrov VA. EFFECT OF NANOPARTICLES OF SILVER IN

ARGOVIT PREPARATION ON ANTIBIOTIC RESISTANCE OF BACTERIA IN COW MASTITIS TREATMENT. Polythematic Online Sci J Kuban State Agrar Univ. 2018;

65. Castañeda-Yslas IY, Ruiz-Ruiz B, Arellano-García ME, Juárez-Moreno KO, Torres-Bugarín O, Bogdanchikova N, et al. Micronúcleos en Reticulocitos de Ratones Balb/c Tratados de Forma Oral con Nanopartículas de Plata. Rev Ciencias Tecnológicas. 2018;
66. Semenov F V., Fidarova KM. [The treatment of the patients presenting with chronic inflammation of the trepanation cavity with a preparation containing silver nanoparticles following sanitation surgery of the open type]. Vestn Otorinolaringol. 2012;(6):117–9.
67. Uraskulova BB, Gyusan AO. The clinical and bacteriological study of the effectiveness of the application of silver nanoparticle for the treatment of tuberculosis. Vestnik Otorinolaringologii. 2017.
68. Juarez-Moreno K, Gonzalez EB, Girón-Vazquez N, Chávez-Santoscoy RA, Mota-Morales JD, Perez-Mozqueda LL, et al. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. Hum Exp Toxicol. 2017 Sep;36(9):931–48.
69. Álvarez-Suárez AS, Dastager SG, Bogdanchikova N, Grande D, Pestryakov A, García-Ramos JC, et al. Electrospun Fibers and Sorbents as a Possible Basis for Effective Composite Wound Dressings. Micromachines. 2020;
70. Bogdanchikova N, Vázquez-Muñoz R, Huerta-Saquero A, Pena-Jasso A, Aguilar-Uzcanga G, Picos-Díaz PL, et al. Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in

dogs. *Int J Nanotechnol*. 2016 Feb;13.

71. Bartlett MS. The Square Root Transformation in Analysis of Variance. *Suppl to J R Stat Soc*. 1936;3(1):68.
72. Bartlett MS, Brodin U. Statistical analysis of the micronucleus test - a modelling approach. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 1989;211(2):259–64.
73. Kusakabe H, Takahashi T, Tanaka N. Chromosome-type aberrations induced in chromosome 9 after treatment of human peripheral blood lymphocytes with mitomycin C at the G0 phase. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;85(3–4):212–6.
74. Vecchio G, Fenech M, Pompa PP, Voelcker NH, Camacho Á, Duarte Á, et al. Lab-on-a-chip-based high-throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials. *Rev Colomb Quim [Internet]*. 2016;10(1):2721–34. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84989246430&doi=10.15446%2Frev.colomb.quim.v45n1.58955&partnerID=40&md5=78a7b328ddf3057783823311a39cdf2d>
75. Souza TAJ, Franchi LP, Rosa LR, da Veiga MAMS, Takahashi CS. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016;795:70–83.
76. Fenech M. Cytokinesis - block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc [Internet]*. 2015;2(5):1–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546000%5Cnhttp://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2007.77>



REPORT ON THE SAFETY ASSESSMENT OF POLYVINYLPIRROLIDONE ( PVP ) The amide region of the pyrrolidone substituent absorbs in the UV region. ثبثب;1997. فقثق(5\_suppl2):95–130.

85. Flora SJS. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(2):257–81.
86. Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, et al. The HUMN and HUMNxLinternational collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis*. 2011;26(1):239–45.
87. Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol*. 1998;
88. Shimizu N, Shimura T, Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2000;
89. Kirsch-Volders M, Mateuca RA, Roelants M, Tremp A, Zeiger E, Bonassi S, et al. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(5):1038–42.
90. Cheong HSJJ, Seth I, Joiner MC, Tucker JD. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* [Internet]. 2013 Jul 1;28(4):433–40. Available from: <https://academic.oup.com/mutage/article-lookup/doi/10.1093/mutage/get020>

91. Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonassi S, Holland N, Migliore L, et al. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. Vol. 770, Mutation Research - Reviews in Mutation Research. 2016. p. 12–25.
92. Joksic G, Stasic J, Filipovic J, Sobot AV, Trtica M. Size of silver nanoparticles determines proliferation ability of human circulating lymphocytes in vitro. Toxicol Lett. 2016;247:29–34.
93. Ivask A, Voelcker NH, Seabrook SA, Hor M, Kirby JK, Fenech M, et al. DNA Melting and Genotoxicity Induced by Silver Nanoparticles and Graphene. Chem Res Toxicol. 2015;28(5):1023–35.
94. Ahlberg S, Antonopulos A, Diendorf J, Dringen R, Epple M, Flöck R, et al. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. Beilstein J Nanotechnol. 2014;5:1944–65.
95. Swanner J, Mims J, Carroll DL, Akman SA, Furdui CM, Torti S V, et al. Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cells. Int J Nanomedicine. 2015 Jan;10:3937–53.
96. OMS. Guías para la calidad del agua de consumo humano. Organ Mund la Salud [Internet]. 2011;608. Available from: <http://apps.who.int/>
97. OECD. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: 487, In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Organ Econ Co-operation Dev Publ [Internet]. 2016;(July):29.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264861-en>

## Anexos

### Anexo 1



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

DOCTORADO EN CIENCIAS

FACULTAD DE CIENCIAS



#### *CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN*

“Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad de nanomateriales en linfocitos humanos “

INVESTIGADORES: Dra. Evarista Arellano García, Dra. Nina Bogdanchikova, Dr. Juan Carlos García Ramos, Dra Patricia Radilla Chavez, Dr. David Sergio Salas Vargas, M.C. Balam Ruiz- Ruiz.

#### **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO**

La investigación y el desarrollo de productos basados en nanopartículas se incrementa año con año, por tal razón es importante evaluar la toxicidad de las nanopartículas (NPs) con el fin de establecer su riesgo potencial. Las aplicaciones de estos materiales se han extendido en diferentes campos, tales como el de la salud, en donde, se utilizan para la imagen médica y diagnóstico de algunas enfermedades, farmacéutica, entrega de medicamentos y terapias, dentro de los nanomateriales más utilizados en la práctica médica se encuentran las nanopartículas de plata (AgNPs) su uso radica en sus cualidades antimicrobianas principalmente (Cheng-Ten Ng, 2010). Por tal razón las AgNPs se utilizan en apósitos con plata, catéteres cubiertos con plata, hidrogel basado en nanoplata, y compuestos que son usados como acarreadores de nanopartículas de plata (Xu *et al.*2012).

Sin embargo, no hay consenso entre los investigadores, sobre el carácter concluyente de los resultados de toxicidad de estas sustancias, por lo que el presente estudio pretende probar la toxicidad de nanopartículas de plata en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

A las personas que acepten participar, se les proporcionaran los datos correspondientes a los procedimientos y análisis clínicos que se realizaran y se resolverán de manera exhaustiva todas las dudas que les surjan sobre el proyecto y sus resultados. Una vez satisfechas todas sus dudas se les invitara a firmar el consentimiento informado asegurándoles el respeto a sus derechos humanos y su libertad a dejar de participar en cualquier momento que lo decidan sin ninguna consecuencia.

Los resultados que se generen en la investigación podrán proporcionar información acerca de los posibles efectos tóxicos de las nanopartículas de plata en células humanas, además, brindará la oportunidad de continuar con más estudios que buscan entender los posibles efectos de las nanopartículas de plata, así como, su potencial uso en el tratamiento de algunas enfermedades que aquejan a los seres humanos. Por otro lado, los resultados podrían contribuir a conocer más sobre el comportamiento y la toxicidad de estas partículas.

Queda establecido que este protocolo de investigación se encuentra 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.

## **PROCEDIMIENTOS**

En caso que acepte participar en el estudio, se le realizaran algunas preguntas sobre hábitos alimenticios y estilo de vida, recomendadas para este tipo de estudios. Además, personal capacitado le tomará una muestra de aproximadamente 30 mL de sangre periférica mediante una punción, la muestra se tomará por la mañana y la persona deberá presentarse sin haber ingerido alimentos.

La muestra de sangre será utilizada para probar los posibles efectos que tengan las nanopartículas de plata, en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, mediante la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN), así como, para realizar las pruebas de química sanguínea correspondientes de manera gratuita.

## **POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS**

El estudio consta de dos fases, la primera consiste un breve cuestionario de hábitos alimenticios y estilos de vida, la segunda fase consiste en la toma de la muestra.

El proceso de extracción de sangre se llevará a cabo con ayuda de personal capacitado utilizando material estéril, en todo el proceso. Este procedimiento es el mismo que se sigue cuando se realizan análisis de química sanguínea de rutina y no representa ningún riesgo a la salud.

En caso de que presente algún efecto adverso o requiera otro tipo de atención, esta se le brindara sin ningún costo alguno.

Quedando bien establecido que solo se tomara la muestra de sangre de las personas que acepten el consentimiento informado y que este estudio no involucra ningún tipo de aplicación directa de alguna sustancia en seres humanos.

## **POSIBLES BENEFICIOS QUE RECIBIRÁ AL PARTICIPAR EN EL ESTUDIO**

Si usted decide participar de manera voluntaria en el estudio, se le entregaran los resultados de la química sanguínea de manera gratuita.

Por otra parte, si decide aceptar el consentimiento se podrán realizar estudios de toxicidad en linfocitos humanos con nanopartículas de plata, esto ayudaría a conocer la toxicidad de estos materiales con posible aplicación en el área médica.

## **INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS Y ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO**

Si usted acepta participar voluntariamente en el estudio, se le brindaran los resultados de los exámenes sanguíneos SMAC 33 que se realicen, así como de los resultados de la investigación si así lo deseara.

Si usted tiene alguna duda, pregunta o comentario relacionado con el estudio, puede acudir a cualquier investigador del proyecto para cualquier aclaración. Además, si desea conocer el resultado del proyecto, igualmente se le brindara la información que requiera, quedando establecido que solo los resultados serán publicados, reservándose la identidad de los participantes para conservar la confidencialidad de los participantes y salvaguardar sus intereses.

## **PARTICIPACIÓN O RETIRO**

Si usted desea participar voluntariamente en el estudio, se le brindaran las mejores condiciones posibles, así como los resultados totales o parciales del estudio, si así lo requiere. Sus datos personales se manejarán con estricta confidencialidad y solo serán manejados por los investigadores, quedando estipulado que solo los resultados del estudio serán dados a conocer en forma de promedios y nunca de manera individual.

Por otra parte, si usted no desea participar en el estudio, es usted libre de no firmar la carta de consentimiento informado y/o retirarse cuando así lo desee sin consecuencias.

## **PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD**

Si usted acepta o no participar en el estudio, sus datos serán manejados con estricta confidencialidad y solo serán tratados por el grupo de investigadores, salvo los resultados de toxicidad que serán publicados en una revista científica

## **BENEFICIOS AL TÉRMINO DEL ESTUDIO**

Si usted acepta firmar la carta de consentimiento informado, se le practicará un análisis de química sanguínea SMAC 33 de manera gratuita, los resultados de los estudios se le entregarán personalmente y serán gratuitos, por lo que no tendrá ningún costo alguno para usted.

## **ACLARACIONES**

La decisión de participar en el estudio es completamente **voluntaria**, por lo que no habrá consecuencia alguna si usted decide no participar. Además, si acepta participar usted tiene la posibilidad de retirarse del estudio en el momento en que lo desee y será totalmente respetada dicha decisión.

El estudio no tendrá ningún costo para usted, los estudios pertinentes serán totalmente gratuitos. Queda establecido que no se aplicaran sustancias directamente en los seres humanos, solo se aplicaran las nanopartículas de plata en las muestras de sangre que se obtengan.

Habiendo leído todo lo anterior, si usted considera que no tiene preguntas o dudas respecto al estudio y su participación en el, puede si así lo desea, firmar la Carta de consentimiento informado anexa a este documento.

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Acepto participar en el estudio y
<input type="checkbox"/>				No autorizo que se tome la muestra.
<input type="checkbox"/>				Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio
<input type="checkbox"/>				Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros

\_\_\_\_\_

Firma del participante

\_\_\_\_\_

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