



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*Cito y genotoxicidad
del ion plata en cultivo de linfocitos humanos:
índice mitótico y ensayo cometa*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

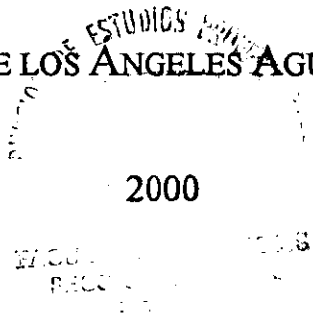
PRESENTA

MARÍA GUADALUPE GUADARRAMA HUERTA



DIRECTORA DE TESIS

M. en C. MARÍA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARÍA



284336



Universidad Nacional
Autónoma de México

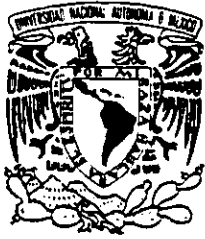


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

“Cito y genotoxicidad del ion plata en cultivo de linfocitos humanos: indice mitótico y ensayo cometa”

realizado por **María Guadalupe Guadarrama Huerta**
con número de cuenta **7723651-7**, pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M.en C. María de los Ángeles Aguilar Santamaria

Propietario

Dr. Miguel Betancourt Rule

Propietario

M. en C. Patricia Guadalupe Orozco Soto

Suplente

Biól. Miguel Ángel Meneses Pérez

Suplente

Biól. Exp. Leonor Rodríguez Cruz

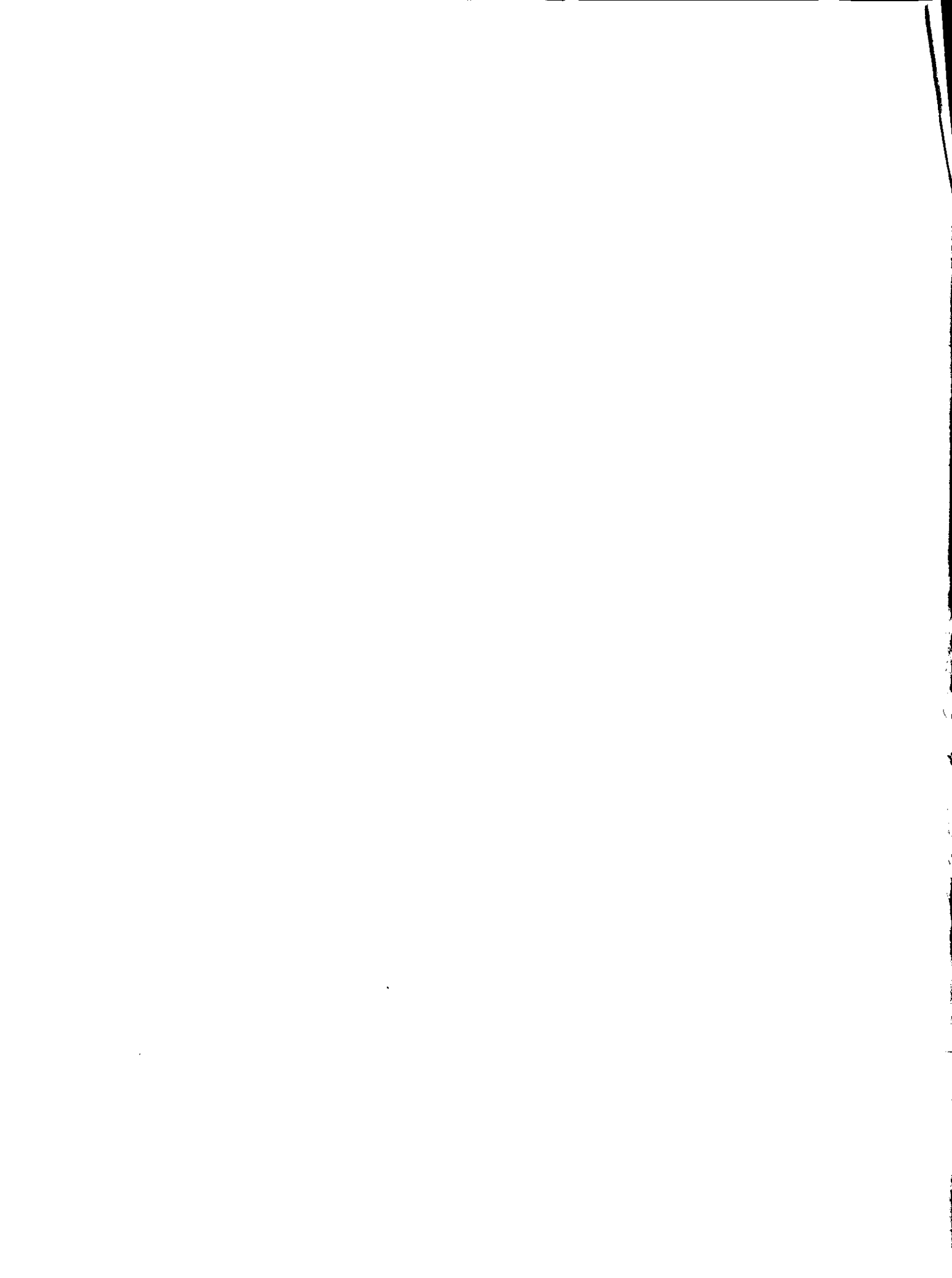
FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz
Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA



A MIS PADRES, MIS HERMANOS, MI SOBRINO Y MI COMPAÑERO
Con amor por su tolerancia y apoyo.

A LA MAESTRA MARÍA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARÍA
Mi directora de tesis
Con cariño y agradecimiento por su apoyo, sus enseñanzas y su gran tolerancia

A LA MAESTRA LEONOR RODRÍGUEZ CRUZ
Por su comprensión y apoyo en la realización de esta tesis

AL MAESTRO GERARDO LÓPEZ-O
Por todas sus enseñanzas y apoyo en el procesamiento estadístico de los datos.

A MIS SINODALES:
DR. MIGUEL BETANCOURT RULE
M. en C. PATRICIA OROZCO SOTO
BIOL. MIGUEL ANGEL MENESES PÉREZ
Por su valiosa colaboración en la revisión de este trabajo

G R A C I A S

**DEDICO ESTE TRABAJO A LA VALIENTE
GENERACIÓN 1999-2000
POR SU EJEMPLO DE DIGNIDAD
DEFENDIENDO LA UNIVERSIDAD PÚBLICA Y GRATUITA**

Índice

Resumen.....	2
Introducción	3
Objetivos generales y particulares.....	17
Hipótesis.....	18
Material y método.....	19
Diseño experimental	19
Cultivo de linfocitos humanos.....	21
Tratamiento	23
Determinación del índice mitótico	24
Ensayo cometa	25
Evaluación del daño al ADN	29
Resultados y discusión.....	31
<i>IM</i>	31
IM de cultivos expuestos al AgNO_3	31
IM de cultivos expuestos a NaNO_3	35
IM de cultivos expuestos a KNO_3	38
<i>Determinación del daño del ion plata sobre la molécula de ADN, mediante ensayo cometa</i>	<i>42</i>
Conclusiones	51
Bibliografía.....	52

Resumen

La plata es ampliamente utilizada en forma pura o combinada en industrias como la fotográfica, la química, en la elaboración de colorantes y pigmentos, en la fabricación de cerámica, en orfebrería, joyería, y en aparatos electrónicos de precisión. También es utilizada como solución bactericida, en la potabilización de agua para el consumo humano, en oftalmología, como revestimiento de prótesis, textiles o para asepsia de instrumental médico-quirúrgico, como cementante dental, etc.

Se ha sugerido su potencial tóxico y genotóxico, por lo que se realizó una evaluación de éste a la luz de dos pruebas citogenéticas: el índice mitótico (IM) y el *ensayo cometa* O técnica de electroforesis unicelular, teniendo como sistema el cultivo de linfocitos humanos obtenidos muestras de sangre periférica de 10 individuos adultos sanos para cada prueba.

Para determinar la citotoxicidad del ion plata, se expusieron los cultivos durante 48 h con 0.01, 10, 100 y 1000 μg AgNO_3/ml de cultivo; encontrando que el ion Ag^+ disminuye significativamente el IM a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y a 1000 disminuye a menos de 100 células y no se encuentran células en división.

Para evaluar la genotoxicidad se aplicó el *ensayo cometa* a muestras de cultivo de linfocitos expuestos durante 48 h, a concentraciones de: 10 y 100 μg AgNO_3/ml , encontrándose que el ion plata aumenta significativamente el número de células dañadas, así como la longitud promedio de la migración del ADN en ambas concentraciones.

Introducción

El desarrollo científico y tecnológico ha traído como consecuencia que cada vez más las poblaciones humanas estén expuestas a situaciones de riesgo por contaminantes químicos y biológicos. La naturaleza tiene mecanismos de autopurificación, pero su capacidad autorreguladora no es infinita, cuando es sobrepasada, se producen cambios irreversibles en el medio que perturban la vida, produciendo enfermedad o muerte (Albert, 1990). Muchas son las enfermedades asociadas con la exposición a agentes tóxicos cuyo mecanismo de acción es desconocido (Tice, 1995).

Por ello, es necesario evaluar el efecto que los contaminantes tienen sobre la salud y, al mismo tiempo, es indispensable desarrollar técnicas de monitoreo biológico y biomarcadores o indicadores de diagnóstico temprano que alerten y prevengan sobre el riesgo por exposición a tales contaminantes (Gonsebat, *et al.*, 1995; Butterworth, *et al.* 1995).

Las pruebas para evaluar daño de agentes tóxicos inicialmente se realizaban con sistemas *in vitro* y, posteriormente se llevaron a cabo con animales de laboratorio o plantas; en los últimos años la tendencia ha sido desplazar las pruebas *in vivo* por el uso de líneas celulares o cultivos de tejidos (Atterwill, 1995), pues se tiene gran interés por hacer cada vez menos invasivas estas pruebas a nivel individual y ecológico (Butterworth, *et al.*, 1995).

Los estudios epidemiológicos y el monitoreo de poblaciones que han estado expuestas, junto con investigaciones experimentales en varios sistemas de prueba, son de gran utilidad para identificar los cambios celulares y moleculares causados por agentes tóxicos (Butterworth, *et al.*, 1995; Dierickx, y Bredael-Rozen, 1996).

Existen informes de los efectos nocivos que sobre plantas y animales tienen muchos metales como el mercurio, plomo, cobre, cadmio, zinc, aluminio, lantano, fierro y níquel y se ha observado que, en general, existe una correlación positiva entre el grado de mutagenicidad y la incidencia de cáncer, es decir, que los metales con efecto genotóxico a menudo son carcinogénicos (Carson, *et al.*, 1986; Fishbein, *et al.*, 1987; Sharma y Talukder, 1987; Sullivan y Krieger 1992; Filov, *et al.*, 1993; Hirasawa, *et al.*, 1994). Se sabe del potencial clastogénico de metales como el mercurio y el arsénico (Ostrosky-Wegman, 1993); existen otros como el oro y, en este caso, la plata que han sido poco estudiados, los que por sus características físico-químicas suelen bioacumularse y potencialmente pueden llegar a ser clastogénicos (Nakamuro y Sayato, 1986; Sharma y Talukder, 1987).

Características generales de la plata

La plata es un metal que está incluido entre los elementos químicos del grupo I-B de la Tabla Periódica, es un mineral que se encuentra en forma pura o combinada con halogenuros, en forma de óxidos, de carbonatos, nitratos, fosfatos y sulfatos, y generalmente está asociado con otros metales como el oro, el cobre y el plomo. Por su maleabilidad y ductilidad, después del oro, es el mejor conductor del calor y la electricidad; además de no ser atacado por el agua y el oxígeno atmosférico (Fairbridge, 1972; Mortimer, 1983; Budavari, *et al.*, 1996).

En condiciones naturales se encuentra en bajas concentraciones, sin embargo, los desechos antropogénicos de plata contaminan suelos, pastizales y zonas costeras (Thurberg, *et al.*, 1974; Ramakrishna, *et al.*, 1982).

Falandysz y Danisiewicz (1995) estiman que, de 1.15×10^4 ton de Ag que se producen por año en el mundo, alrededor del 40% se vierten al ambiente; se han encontrado niveles de más del doble de la norma establecida en especies de invertebrados marinos, debidos a descargas con desechos de plata; también refieren que después del accidente de Chernobyl (1986), en toda Europa se registró la presencia de los radioisótopos ^{111}Ag y ^{110m}Ag meta-estable, los cuales se encuentran en descargas de nucleoelectricas que funcionan normalmente.

Importancia económica y usos de la plata

La plata es un metal precioso que por sus propiedades físicas y químicas es utilizado, puro o combinado, en las industrias eléctrica; minera —de gran importancia en nuestro país, pues es el primer productor a nivel mundial— (tabla I); en joyería y orfebrería y en la fabricación de instrumentos electrónicos de precisión (en electrodos de conductímetros, potenciómetros, oxímetros, entre otros) y en la manufactura de aparatos odontológicos. Por su capacidad bactericida y antiséptica, como nitrato de plata se utiliza en la potabilización de agua, en la elaboración de fármacos, en recubrimientos de prótesis y telas, en fotografía y en la elaboración de colorantes, pigmentos y cerámica, (Granati, *et al.*, 1982; Ramakrishna, *et al.*, 1982; Sullivan y Krieger, 1992; Filov, *et al.*, 1993; Hirasawa, *et al.*, 1994; Falandysz y Danisiewicz, 1995; Budavari, *et al.*, 1996). De manera que son muchas las personas involucradas en los procesos productivos, de extracción, transformación y manejo y que, por lo tanto, están ocupacionalmente expuestas a la plata en las diferentes áreas de la industria y la artesanía.

Tabla I. Producción mundial de plata en toneladas*
en el período 1990-1999

País productor	Producción anual de plata pura (Ton) ¹									
	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
México	2 453	2 283	2 115	2 136	2 215	2 324	2 528	2 679	2 877	2 700
Perú	1 725	1 770	1 570	1 573	1 700	1 908	2 000	2 077	1 934	1 900
EE.UU	2 170	1 848	1 804	1 645	1 480	1 640	1 800	2 150	2 060	1 860
Australia	NR ²	NR ²	1 245	1 100	1 060	1 100	900	1 106	1 469	1 500
Canadá	1 380	1 400	1 207	901	758	900	1 200	1 222	1 179	1 100
URSS	1 400	1 300	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²	NR ²
Otros	6 085	6 209	7 2033	6 7423	6 5703	6 6003	6 5003	7 1703	7 2003	6 7003
Total	15 213	14 810	15 144	14 097	13 783	14 024	14 928	16 404	16 719	15 760

* Incluye las actividades mineras de extracción, beneficio, fundición y afinación.

¹ Fuentes: Datos de México: de 1990-1995, INEGI, (1996), de 19996-1999 en, Base de datos del INEGI, 1998-2000 (<http://www.inegi.gob.mx>) y los otros países, en: U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries, 1991-2000, (<http://www.usgs.gov>).

² La producción en estos años, está reportada en Otros países.

Toxicología de la plata

En áreas contaminadas, se han encontrado altas concentraciones de plata en cuerpos fructíferos de los hongos *Agaricus campestris*, *A. bisporus*, *Lycoperdum perlatum* y *Calvatia utriformis* (Falandysz y Danisiewicz, 1995).

Se ha observado que en concentraciones de 4 µg/l ó más la plata es altamente tóxica y hasta letal en especies acuáticas como: algas, truchas, carpas, bivalvos, gasterópodos y *Daphnia* (Thurberg, *et al.*, 1974; USEPA, 1980; Filov, *et al.*, 1993; Falandysz y Danisiewicz, 1995).

El ion plata generalmente es de baja toxicidad para el hombre (USEPA, 1980); el contacto

directo con cristales de nitrato de plata (AgNO_3) tiene un efecto cáustico y astringente sobre la piel humana (Filov, *et al.*, 1993; Budavari, *et al.*, 1996), la exposición prolongada provoca que se comporte como metal pesado, acumulándose en piel y membranas mucosas del pulmón, tráquea, estómago e intestinos, tanto del hombre como de otros animales (Sullivan y Krieger, 1992), llegando a causar argiria generalizada y, en estados avanzados, necrosis tisular (Sullivan y Krieger, 1992; Filov, *et al.* 1993; Hirasawa, *et al.*, 1994).

La anormalidad conocida como argiria es una coloración parda-grisácea producida por la acumulación de partículas de plata en la piel. Esta misma coloración se ha observado en los ojos de personas que hacen uso continuo de fármacos oftálmicos que contienen nitrato de plata (AgNO_3) o cloruro de plata (AgCl_2) llegando a presentar daño en la visión y cuando se suministra en altas concentraciones provoca incluso la necrosis de las células del ojo debido a que, como otros metales (Hg, Sn, Cu, Zn y Pb), se solubiliza en la córnea (tabla II). En solución al 5% el AgNO_3 también se usa como desinfectante preventivo en los recién nacidos (Sullivan y Krieger, 1992).

Tabla II. Solubilidad en la córnea de algunos de los compuestos metálicos más comunes.*

Metal	Solubilidad en la córnea	Compuestos comunes
Mercurio	Alta	Cloruro de mercurio y mercurio líquido.
Estaño	Moderada	Cloruro de estaño.
Plata	Moderada	Amonio de plata y nitrato de plata.
Cobre	Moderada	Sulfato de cobre y nitrato de cobre.
Zinc	Baja	Sales de zinc.
Plomo	Baja	Acetato de plomo.

* Tomado de (Sullivan y Krieger, 1992).

En análisis forense realizado a un individuo de 69 años que murió por ingestión de un

líquido que contenía 25.5% de potasio y 30.7% de plata, se encontraron altos niveles de ésta en estómago, intestinos, hígado, riñón, corazón, pulmón y cerebro, en tanto que los niveles de potasio no se alteraron, por lo que se concluyó que la causa del deceso fue la plata (Lech, 1997).

Se han encontrado depósitos de plata en el cerebro de la progenie de ratas con argirosis; se ha observado que el ion plata altera significativamente el metabolismo del cobre, disminuyendo la actividad de la ceruloplasmina-oxidasa (CP-oxidasa) en hígado, páncreas y riñones de ratas sanas a las que se les suministró intra-peritonealmente una solución 9.3 $\mu\text{mol/Kg}$ de AgNO_3 durante 6 días (Hirasawa, *et al.*, 1994).

En casos de exposición crónica, en seres humanos se ha observado toxicidad renal, hepática y arterosclerosis (Hayes, 1994). De la misma manera que otros metales como el oro, estaño, bismuto, fierro, bario y el cobre, la exposición severa y crónica a la plata pueden provocar daño neurológico, estados confusionales y demenciales (Sullivan y Krieger, 1992).

En 1982, Granati, *et.al.*, estudiaron fluidos corporales de trabajadores expuestos a diferentes compuestos de plata, encontrando que, a pesar de su acumulación en órganos y tejidos, ésta es eliminada por el organismo. Robinson y Costa (1982) publicaron que existen evidencias de su potencial clastogénico, pues en forma de sulfuro es capaz de romper las cadenas de la molécula del ADN.

Nakamuro y Sayato (1986) sugirieron su capacidad clastogénica en células de mamífero, aún cuando este efecto no fue estadísticamente significativo, ya que encontraron aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos tratados con diferentes concentraciones de sulfuro de plata.

La *US Environmental Protection Agency* (USEPA), ha clasificado al ion plata en el grupo "D" de los metales no carcinogénicos (tabla III), debido a que no hay evidencias de carcinogenicidad en humanos y porque la mayoría de los estudios hechos en animales son negativos (Hayes, 1994).

La ha establecido una dosis de referencia (RfD) oral de $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ para proteger sensibilidades individuales y la cual se considera el límite cosmético, ya que está basado en la concentración en la que se deposita y causa argirrosis u oscurecimiento de la piel (Hayes, 1994).

La RfD para la exposición por inhalación no ha sido determinada; la *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (CGIH), ha adoptado los *Threshold Limit Value* (TLV) y *Time Weighted Average* (TWA para una exposición de 8 h/día) de 0.1 mg de Ag^+/m^3 para el metal y de 0.01 mg de Ag^+/m^3 para los compuestos solubles; estas mismas concentraciones son las normas de salud ocupacional recomendadas por el *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH), considerando que dosis mayores provocarán daño en los ojos, la nariz y la garganta, así como la irritación de piel y dermatitis. Las medidas preventivas sugeridas incluyen el uso de guantes, gafas y mascarillas aprobadas por el mismo instituto (Sullivan y Krieger, 1992).

Tabla III. Toxicidad y carcinogenicidad de la plata y algunos metales importantes.*

Metal	Toxicidad oral crónica		Inhalación crónica	Carcinogenicidad		Clasificación ^f
	RfD ^a (mg/Kg/día)	Confianza	RfC ^b ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Factor de riesgo por exposición oral mg/kg/día	Factor de riesgo por inhalación ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	
Boro	9×10^{-2}	Media	----- ^d	-----	-----	-----
Bario	7×10	Media	-----	-----	-----	-----
Níquel	2×10^{-2}	Media	-----	-----	2.4×10^{-4} 4.8×10^{-4}	A (polvos no refinados y Ni_3S_2) B-2 (níquel soluble y $\text{Ni}(\text{CO})_4$)
Vanadio	5×10^{-3}	Baja	-----	-----	-----	-----
Plata	5×10^{-3}	Baja	-----	-----	-----	D
Berilio	5×10^{-3}	Baja	-----	4.3	2.4×10^{-3}	B-2
Uranio	3×10^{-3}	Media	-----	-----	-----	A
Antimonio	4×10^{-4}	Baja	-----	-----	-----	-----
Talio	-----	-----	-----	-----	-----	D

* Tomado de Hayes, W. (1994). pp 436-437.

^a Dosis de Referencia.

^b Referencia de concentración

^c Grupo A: carcinógenos humanos conocidos; B-2: probables carcinógenos en humanos; Grupo D: No clasificado como carcinogénico en humanos.

^d Su valor fue menor de 5×10^{-1}

Linfocitos

Los linfocitos o glóbulos blancos son las células encargadas de la inmunidad, se calcula que en el hombre alrededor de 2×10^{12} de ellos circulan libremente en el torrente sanguíneo, en la linfa y en tejidos especializados de ciertos órganos como el timo, médula ósea, bazo, placas de Peyer en el intestino delgado, apéndice, nódulos linfáticos, amígdalas y adenoides; además, frecuentemente se les encuentra en la epidermis y endodermis de epitelios no escamosos. En cuanto a masa celular, el sistema inmune es equivalente al hígado o al cerebro (Alberts, *et al.*, 1995).

Los linfocitos se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas indiferenciadas, que migran por la sangre hasta el timo en donde se diferencian y de donde posteriormente van a los tejidos linfoides periféricos transformándose en linfocitos T, otras células madre se diferencian a linfocitos en el propio tejido hematopoyético (torrente sanguíneo) y posteriormente migran a los tejidos linfoides periféricos para convertirse en células. Ambos tipos de celulares se caracterizan por tener una alta capacidad reproductiva (Alberts, *et al.*, 1995).

El número de linfocitos por unidad de volumen de sangre varía dependiendo de la edad y el estado de salud, con un valor máximo en los recién nacidos y niños pequeños. Normalmente entre 55 y 80% de los linfocitos son T y un 10 a 15% del tipo B (Gonsebatt, *et al.*, 1995); las diferencias individuales en la proporción de los linfocitos T y B pueden ser considerables (Alberts, *et al.*, 1995). Cada uno de estos grupos celulares está compuesto de subpoblaciones con una función y cinética de proliferación diferente (Preston, *et al.*, 1987), especialmente las células T que, en general, producen las respuestas inmunes mediadas por células; algunas de las poblaciones de células T actúan como supresoras de la función. Las células B son las responsables de la inmunidad humoral

(Alberts, *et al.*, 1995).

La mayoría de las células que circulan por el torrente sanguíneo se encuentran en G_0 o interfase, aunque no necesariamente en el mismo estado metabólico del ciclo celular y pueden ser fácilmente estimuladas por agentes clastogénicos, cito y genotóxicos. Para el caso de exposición a agentes tóxicos, se ha calculado que cada 3 minutos la sangre cumple un ciclo de circulación por el cuerpo de tal forma que los linfocitos pueden tener contacto con éstos en la sangre periférica y ser específicamente estimulados para diferenciarse y producir una respuesta inmune (Alberts, *et al.*, 1995).

La inducción de proliferación en la mayoría de los linfocitos es un proceso múltiple. Los mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA) o la concavalina A (ConA), inducen la expresión de receptores para interleucina-2 en células T y les confieren la capacidad de actuar como mensajeros de la inmunidad mediada por células (Barile, 1994). La única proteína responsable de hacer esto a las células T es la interleucina-1, induciéndolas a sintetizar interleucina 2, con lo que se da inicio a la proliferación mediante la síntesis de ADN y la división celular (Gonsebatt, *et al.*, 1995).

Cultivo de linfocitos

El cultivo de linfocitos es uno de los sistemas más utilizados para evaluar, a través de diferentes parámetros, los mecanismos de toxicidad de muchas drogas y agentes tóxicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, marihuana, cocaína, morfina, metales, etc. (Preston, *et al.*, 1987; Gosden y Robertson, 1992; Ostrosky-Wegman, 1993; Gonsebatt, 1995).

Desde que Moorhead, *et al.* (1960) observaron que los linfocitos de sangre periférica eran estimulados a dividirse por la fitohemaglutinina (PHA), y de lo relativamente fácil que era obtener gran cantidad de células en cultivo, este sistema de prueba se convirtió en una valiosa herramienta en citogenética de mamíferos y ha sido extensamente utilizada en el monitoreo biológico (WHO, 1985). Esta estimulación *in vitro*, es morfológica y bioquímicamente similar a la respuesta inducida por la estimulación antigénica *in vivo*. Los inmunólogos han usado este sistema de prueba para el monitoreo de competencia inmunológica de los linfocitos de pacientes con varios desórdenes antes y después de la terapia inmunosupresiva; así como para explorar las interacciones de agentes tóxicos con el sistema inmune (Barile, 1994).

Aunque el origen de la mayoría de las enfermedades como el cáncer, la autoinmunidad o defectos congénitos en el hombre están relacionados con una exposición previa a sustancias tóxicas, los procesos o mecanismos por los cuales un agente presente en el ambiente causa estos efectos son desconocidos para la mayoría de los xenobióticos (Gonsebat, *et al.*, 1995).

Índice Mitótico

El índice mitótico (IM) o índice de proliferación es un parámetro que ha sido utilizado para determinar el efecto citotóxico de agentes químicos sobre cultivos de linfocitos humanos (Ostrosky-Wegman, 1993).

Se ha reportado que dosis bajas de agentes químicos son capaces de producir proliferación y, que la disminución de este índice es efecto de toxicidad celular, por lo que se eligió este parámetro para conocer el potencial citotóxico de la plata (Ostrosky-Wegman, 1993; Aguilar, *et al.*, 1999).

Ensayo cometa

El ensayo cometa es una prueba desarrollada por Singh, *et al.*, 1988 y modificada por Tice y Andrews (1993), que permite evaluar el daño al ADN, a partir de la detección de rompimientos de cadenas sencillas o monohebra, la cual ofrece grandes ventajas: la primera es que monitorea células individuales, siendo muy sensible, cuantificable y aplicable a una gran variedad de tejidos de diversas especies, siendo útil para cualquier población de células eucariontes. Además se requiere de muestras muy pequeñas, bastan unos cuantos miles de células (< 10,000) para obtener información sobre la distribución intracelular del daño; debido a que el análisis se hace a nivel de células individuales los resultados permiten determinar la sensibilidad interindividual en relaciones de bajas dosis-respuesta, para identificar el daño cito y genotóxico en muy poco tiempo (McKelvey-Martin, *et al.*, 1993; Tice y Andrews, 1993; Betancourt, *et al.*, 1995; Tice, 1995).

El daño que se detecta por esta técnica puede ser de varios tipos, pues con algunas modificaciones es sensible a rompimientos de una o de doble cadena de ADN; a sitios lábiles; a escisiones incompletas en sitios de reparación, al mismo tiempo que a la lisis y fragmentación del ADN que está asociada a muerte celular (McKelvey-Martin, *et al.*, 1993; Tice, 1995).

Características del sodio y el potasio.

Existen otros, como los metales como el sodio y de potasio, cuyos cationes 1^+ se combinan con el ion NO_3^- para formar las sales de nitrato de sodio (NaNO_3) y la de potasio (KNO_3) respectivamente, que son solubles en agua y tienen un pH neutro y que también son ampliamente utilizados en la industria (Budavari, *et al.*, 1996).

El sodio y el potasio son metales alcalinos clasificados en el grupo I de la Tabla periódica. Ambos iones son constituyentes fundamentales de fluidos intra y extracelulares de plantas y animales, y juegan un papel fundamental en la generación de potenciales bioeléctricos para el equilibrio osmótico, tanto en animales como en el hombre (Filov, *et al.*, 1993; Budavari, *et al.*, 1996).

El ion sodio además está involucrado en el metabolismo animal de minerales, en el balance ácido-base y en la conducción de impulsos nerviosos. En tanto que el potasio contribuye al metabolismo de los carbohidratos y la síntesis de proteínas (Filov, *et al.*, 1993).

El NaNO_3 denominado comercialmente como salitre de Chile o nitro de Chile, es utilizado en el curtido de pieles, en la manufactura de vidrio, cerillos y en la preparación de tabaco (mejora sus propiedades de ignición), como fijador de color en carnes para embutidos y como conservador, en el esmaltado de alfarería, clínicamente en el tratamiento de parásitos, también se le utiliza como fertilizante y como catalizador para la preparación de ácidos sulfúrico y nítrico (Budavari, *et al.*, 1996).

El KNO_3 es utilizado al igual que NaNO_3 en el embutido de carnes y como conservador, para tratar al tabaco (pues coadyuva a mejorar su ignición), en la fabricación de vidrio y cerillos; se usa en juegos pirotécnicos, en la elaboración de luces y velas; para templar el acero; como fertilizante y clínicamente se usa como diurético en el hombre (Filov, *et al.*, 1993; Budavari, *et al.*, 1996).

Toxicología de KNO_3 y NaNO_3

La actividad citotóxica tanto del sodio como del potasio, es más bien atribuida al anión al que están unidos, en este caso al NO_3^- . que a dichos metales. Sharma y Talukder (1987),

Objetivo general:

- ◊ Determinar el efecto citotóxico y genotóxico del ion plata en cultivos de linfocitos humanos mediante el índice mitótico y la aplicación del ensayo *cometa*.

Objetivos Particulares:

- ◆ Determinar la citotoxicidad del ion plata en cultivos de linfocitos humanos expuestos durante 48 horas a 0.01, 10, 1000 $\mu\text{g/ml}$ de nitrato de plata (AgNO_3) mediante el índice mitótico.
- ◆ Determinar el efecto citotóxico del NaNO_3 y del KNO_3 , aplicados en las mismas concentraciones que el AgNO_3 , en cultivos de las mismas muestras de sangre, utilizando también el IM, con el fin de descartar que el causante del posible daño a las células en cultivo sea el ion Ag^+ y no el NO_3^- .
- ◆ Determinar el daño del ion plata (Ag^+) sobre la molécula de ADN de linfocitos humanos *in vitro*, mediante el ensayo cometa o electroforesis unicelular.

Hipótesis:

Si el ion plata presenta efecto citotóxico se espera encontrar diferencias significativas entre los índices mitóticos de los cultivos tratados con AgNO_3 con respecto a los testigo y a los expuestos a NaNO_3 y KNO_3 ; asimismo, si dicho ion es genotóxico, se espera que las células expuestas a AgNO_3 produzcan diferencia significativa en la longitud del desplazamiento de ADN en el ensayo *cometa* con relación a las no expuestas.

Material y método:

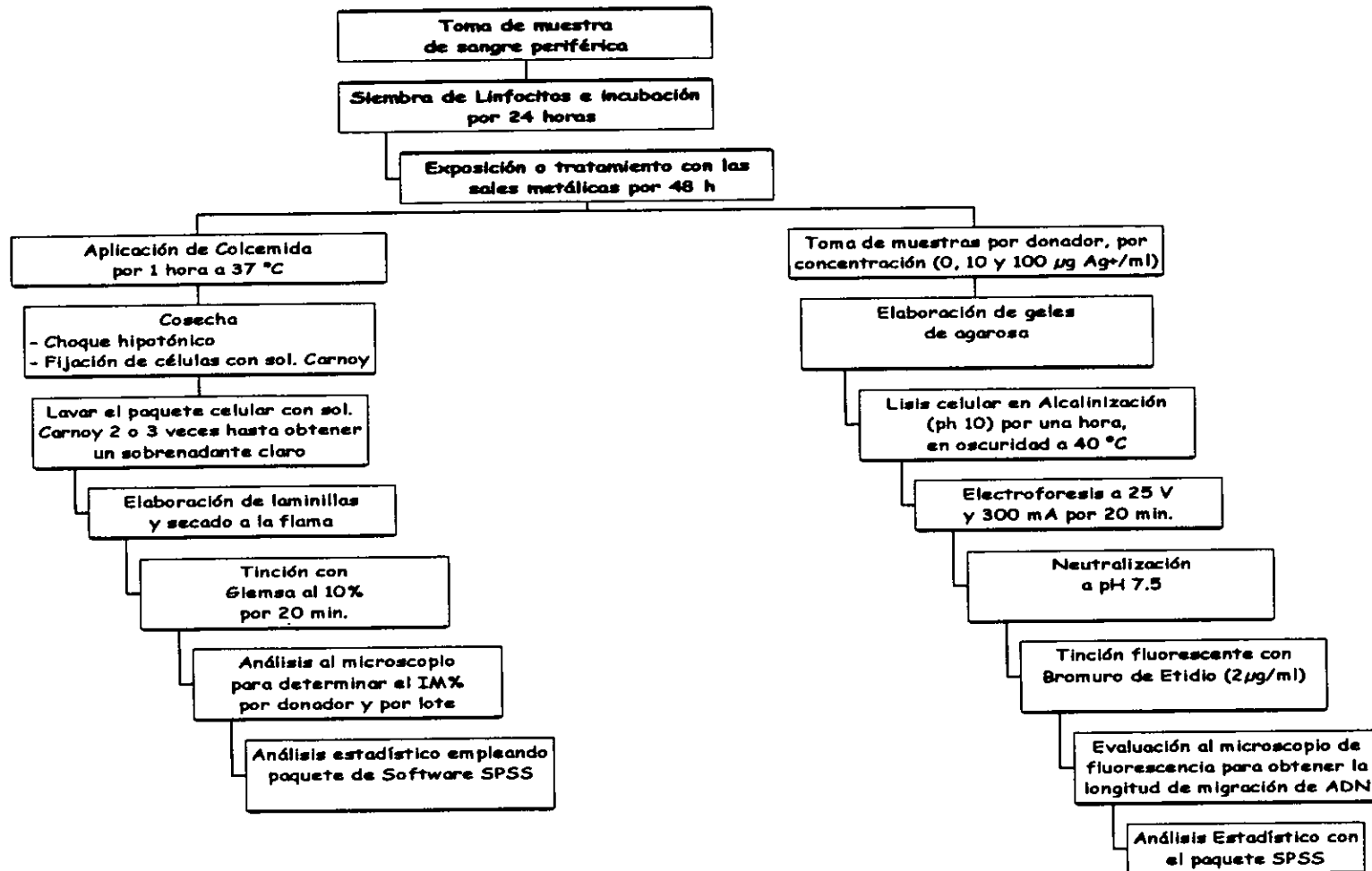
Diseño Experimental

Con el propósito de verificar la hipótesis y con base en lo propuesto por Preston, *et al.* (1987), se decidió utilizar como sistema de prueba el cultivo de linfocitos humanos por su bajo costo, su fácil acceso, ya que es suficiente extraer algunos ml de sangre para obtener una población considerable de éstos y por su reproductibilidad. Otra de las ventajas es que cerca del 90% de estas células están involucradas en la respuesta inmune y, dado que se encuentran en fase G_0 , son susceptibles de ser estimuladas con diferentes mitógenos, y de interactuar con agentes clastogénicos o citotóxicos, cuando se les expone a éstos por 48 horas.

Para estimar la citotoxicidad del ion plata se eligió emplear el índice mitótico (IM), porque se ha reportado que tanto el aumento como la disminución de éste, en cultivo de linfocitos, son indicadores de daño causado por exposición a xenobióticos (Preston, *et al.* 1987; Ostrosky-Wegman, 1993; Gonsebatt, *et al.* 1995).

Para la evaluación del daño genotóxico, se decidió utilizar como biomarcador, la técnica de electroforesis unicelular o *ensayo cometa*, propuesto por Singh, *et al.* (1988), que ofrece grandes ventajas, pues es una prueba rápida, sencilla y muy sensible para la detección y medición temprana de daño al ADN en células individuales de mamíferos y en este caso de linfocitos, requiriéndose una cantidad muy pequeña de muestra, 50 μ l (~10,000 células por gel), por lo que actualmente se utiliza como indicador en estudios de reparación, biomonitoreo y genética toxicológica.

Figura 1. Esquema del Diseño Experimental



El diseño experimental consistió en la preparación de los cultivos de linfocitos de 10 donadores adultos de ambos sexos, a los cuales, después de 24 horas de incubación a 37°C, se les expuso al ion plata (Ag^+) en las diferentes concentraciones durante 48 horas y se determinó el IM, así como el porcentaje de células dañadas, la longitud promedio del desplazamiento del ADN y la distribución de frecuencias de la migración de las células dañadas de los lotes experimentales y testigo (figura 1). De la misma manera, cultivos de los mismos donadores fueron expuestos a los iones sodio y potasio (Na^+ y K^+) en las mismas concentraciones y condiciones para la obtención del IM y posterior comparación para descartar el efecto genotóxico del ion NO_3^- .

Las concentraciones de exposición fueron seleccionadas con fundamento en lo reportado por Sharma y Talukder (1987) y los límites establecidos por la USEPA (Filov, *et al.*, 1993) para los compuestos de plata se prepararon soluciones de: 0.01, 10, 100 y 1000 μg de AgNO_3/ml de cultivo para la determinación del IM, en tanto que para evaluar el daño al ADN, sólo se utilizaron las dosis de 10 y 100 μg de AgNO_3/ml de cultivo.

Cultivo de linfocitos humanos

Obtención de la Muestra:

Con jeringas estériles heparinizadas se obtuvieron 10 ml de sangre periférica de 10 donadores adultos sanos de ambos sexos, de 31.6 ± 1.9 años de edad promedio, de los cuales sólo una persona manifestó tener el hábito del tabaquismo (tabla IV).

Tabla IV. Datos generales de los donadores de sangre para determinar el IM.

DONADOR	SEXO	EDAD (años)
AA	Femenino	40
CA	Masculino	24
DA	Masculino	35
ED	Masculino	32
GL*	Femenino*	37
HE	Masculino	36
IS	Masculino	24
LU	Femenino	36
ME	Femenino	25
ML	Femenino	27
PROMEDIO \pm EE		31.6 \pm 1.9

* Donadora con tabaquismo.

Siembra para evaluación del IM:

Con base en la técnica propuesta por Arakaki y Sparkes (1963) y Moorhead, *et al.* (1960) se prepararon cultivos, en condiciones de esterilidad, colocando en frascos 4.5 ml de Medio McCoy (Microlab), 0.02 ml de Fitohemaglutinina (Microlab), 0.02 de Solución Antibiótica (Microlab) y 0.3 ml de sangre completa; se incubaron a 37 °C. Cabe mencionar que de cada muestra de sangre se prepararon 60 cultivos para probar simultáneamente el efecto de las tres sales de nitrato AgNO_3 , NaNO_3 y del KNO_3 , en diferentes concentraciones, como se explica más adelante.

Tratamiento

Preparación de las soluciones de nitratos:

Se prepararon soluciones acuosas stock de los nitratos de plata, de sodio y de potasio (Merck), cada uno en las concentraciones de 0.1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ y se esterilizaron por filtración a través de membrana Millipore con diámetro de poro de 22 μm .

Exposición:

Después de las primeras 24 horas de incubación, a cada uno de los cultivos experimentales se les agregó 0.5 ml de la solución de AgNO_3 , de NaNO_3 o de KNO_3 , correspondiente (3 cultivos/concentración/donador) para obtener concentraciones finales de 0.01, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo. Todos los lotes se reincubaron por 48 h más, a 37 °C.

Cosecha:

Después de 71 horas de incubación, a todos los cultivos se les agregó 0.2 ml del mitostático Colcemida (Microlab) y se reincubaron a 37 °C por 1 hora más; transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y a los paquetes celulares se les aplicó un tratamiento hipotónico con agua destilada a 37 °C durante 20 min. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min y los paquetes celulares fueron fijados con solución Carnoy (metanol-ácido acético, 3:1) fresca. Se volvieron a centrifugar y se lavaron con fijador varias veces hasta obtener un sobrenadante claro y un paquete celular blanquecino.

Elaboración de laminillas:

Se retiró el último sobrenadante, se resuspendieron las células en 0.5 ml de fijador, con la pipeta Pasteur se tomó la mitad de la suspensión, dejándose caer en gotas sobre portaobjetos limpios y sumergidos en agua fría y, se secaron al calor de la flama del mechero. Se obtuvieron en total 6 preparaciones/lote/donador.

Una vez secas, las laminillas se tiñeron con colorante de Giemsa (Merck) al 10 %, durante 20 minutos, después de lo cual se enjuagaron con agua de la llave y se dejaron secar al aire.

Determinación del índice mitótico:

Las 60 laminillas de cada individuo se etiquetaron con una clave para ser revisadas por dos personas diferentes para evitar predisposición, es decir a doble ciego.

Auxiliándose con un contador de células manual, se contabilizó el número de núcleos interfásicos y el de los metafásicos, hasta completar un total de 1000 células por laminilla, un total de 6,000 células/lote/donador.

Se sumaron los datos de cada preparación/lote/donador y el índice mitótico (IM) se determinó con la fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de metafases}}{\text{Número de células observadas}} \times 100$$

Con los IM de cada donador se obtuvo el IM promedio y EE (error estándar) por lote y por tratamiento con las diferentes sales.

Los resultados de los cultivos no expuestos o testigo/lote/donador se compararon con cada uno de los cultivos expuestos a cada sal mediante el Análisis de Varianza con F de Snedecor y la prueba de rangos múltiples de Tukey, $\alpha=0.05$, empleando el paquete Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

Ensayo cometa

Para determinar si el ion plata tiene efecto genotóxico se realizó la técnica de electroforesis unicelular o *ensayo cometa*, desarrollada por Singh, *et al.* (1988) y modificada por Tice y Andrews (1993), con linfocitos humanos expuestos a este ion.

En virtud de que tanto el NaNO_3 como el KNO_3 resultaron inocuos en la prueba de IM y, con base en los resultados obtenidos en los cultivos tratados con Ag^+ , el *ensayo cometa* sólo se realizó con cultivos expuestos a 10 y 100 μg de AgNO_3/ml de medio.

Obtención de la muestra:

Se prepararon cultivos de linfocitos de sangre periférica de 10 donadores adultos sanos de ambos sexos (5 mujeres y 5 hombres), algunos de los cuales formaron parte del grupo de donadores para el IM, con una edad promedio de 32.1 ± 1.8 años, sin adicciones al tabaco o el alcohol (tabla V).

Los cultivos se prepararon por duplicado teniendo un lote testigo y dos experimentales, se incubaron 24 h a 37 °C y de la misma manera que en el caso de la muestra del IM, se expusieron por 48 horas a 10 y 100 µg/ml de AgNO₃, respectivamente. La primera es la que la USEPA ha establecido como límite para compuestos de plata y la segunda es la que resultó citotóxica en el caso de la determinación del IM de este trabajo.

Transcurrido el tiempo de exposición, los cultivos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se lavaron de 3 a 5 veces con PBS al 0.5% (Microlab) libre de Mg⁺ y Ca⁺, hasta obtener un sobrenadante claro y paquetes celulares blanquecinos que se transfirieron a tubos de Ependorf.

Tabla V. Datos generales de donadores para el *ensayo cometa*.

DONADOR	SEXO	EDAD (años)
AA*	Femenino	41
DA*	Masculino	36
ED*	Masculino	33
EM	Masculino	31
GU	Femenino	30
HE*	Masculino	37
LE	Femenino	27
LU*	Femenino	37
ME*	Femenino	26
SI	Masculino	23
PROMEDIO ± EE		32.10 ± 1.81

* Donadores de sangre tanto para IM como para este ensayo.

Preparación de Microgeles para la Electroforesis:

Sobre portaobjetos esmerilados (Fisher) se colocaron 110 μ l de solución de Agarosa regular (Gibco BRL) al 0.75% en PBS, se colocó el cubreobjetos, se dejó solidificar a temperatura ambiente. Deslizándolo suavemente se retiró el cubreobjetos y se les agregó una capa de 75 μ l de una mezcla de Agarosa de bajo punto de fusión (Gibco BRL) al 0.5% en PBS, a 37° C, con 50 μ l (~10,000 células) de linfocitos de cada cultivo/lote/donador, se colocó encima el cubreobjetos y se permitió solidificar sobre bolsas de hielo. Una vez solidificado el gel, se retiró el cubreobjetos y se agregó una tercera capa de 75 μ l de solución de Agarosa de bajo punto de fusión, se volvió a colocar el cubreobjetos y se dejó que solidificara en baño de hielo (figura 2-a).

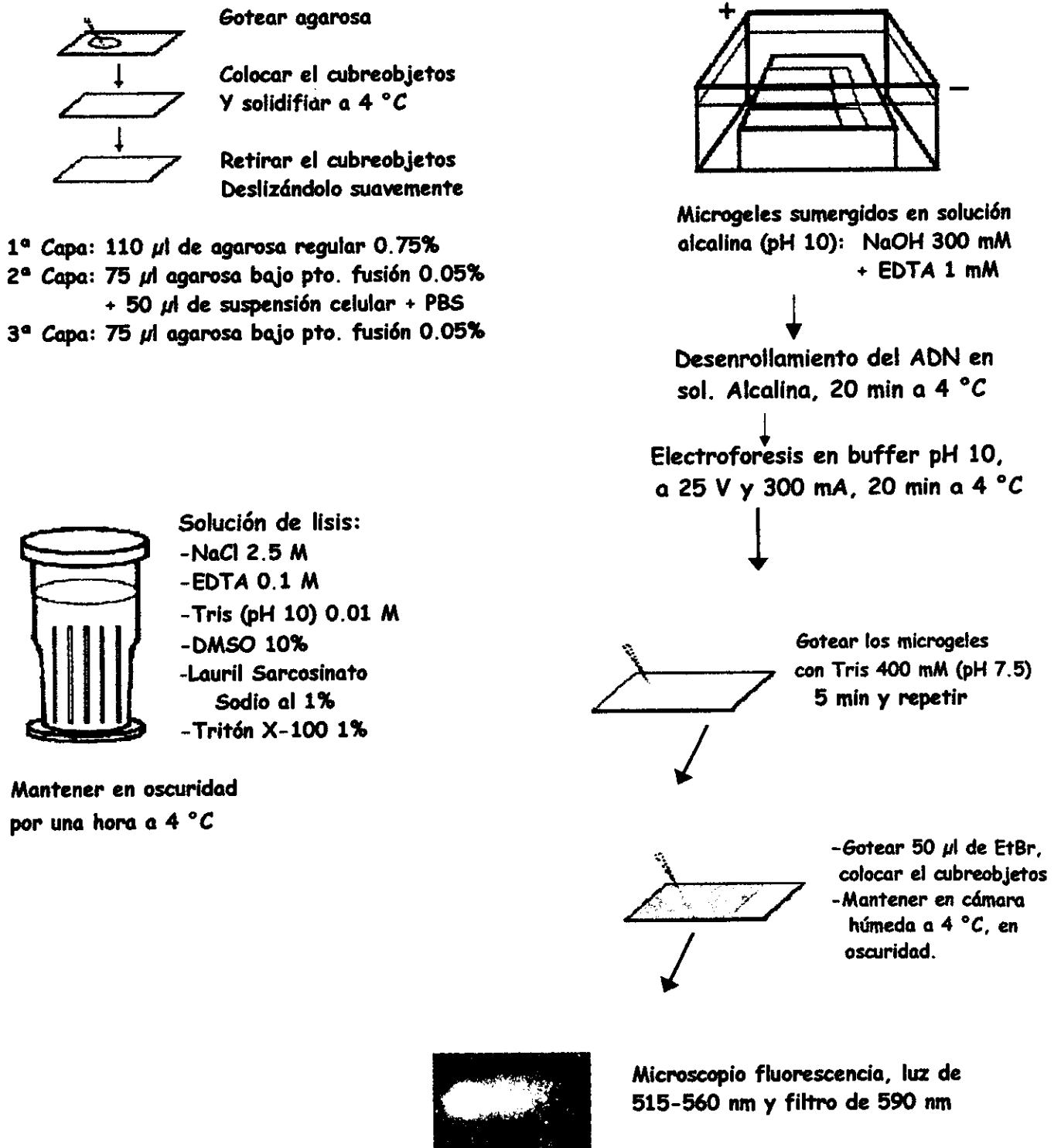
Lisis:

Con el fin de lisar las células y poder analizar el posible daño al ADN, los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis pH 10, en la cual se mantuvieron al menos por una hora, protegidos de la luz, a 4 °C (figura 2-b).

Electroforesis:

Los microgeles se sacaron de la solución de lisis y se colocaron lado a lado sobre la cámara horizontal de electroforesis (Biorad), la cual se llenó con buffer de electroforesis pH 10, recién preparado y a temperatura de 4 °C; los geles así sumergidos se dejaron reposar por 20 min (*alcalinización*) y después de este tiempo, se les aplicó una corriente eléctrica de 25 V y 300 mA por 20 min (figura 2-c).

Figura 2. Esquema de la técnica del ensayo cometa o electroforesis unicelular



Neutralización:

Después del tiempo de corrimiento electroforético, se sacaron los portaobjetos de la cámara y se gotearon con buffer de Tris (Sigma) pH 7.5 para neutralizar al álcali y se dejaron así 5 min. Este proceso se repitió dos veces más (figura 2-d).

Tinción del ADN:

Los microgeles neutralizados se escurrieron para eliminar el exceso de buffer y se les añadieron 50 μ l del colorante fluorescente Bromuro de Etidio (Sigma) en concentración de 2 μ g/ml, procurando que se extendiera por toda la superficie del gel (figura 2-e). Inmediatamente se les cubrió con un cubreobjetos limpio y se mantuvieron en cámara húmeda protegida de la luz, en refrigeración, hasta que fueron revisados al microscopio (no más de 72 h después).

Evaluación del daño al ADN:

Las preparaciones fueron revisadas usando objetivo 40x de un microscopio de fluorescencia Olympus, conectado a un analizador de imágenes VIDS IV (Synoptics). Se revisaron 100 células (50 células por cada una de las réplicas) por lote por donador, midiendo el largo de las caudas o longitud en micrometros — μ m— de la migración del ADN (figura 2-f).

Se agruparon los resultados obtenidos en cada lote, a partir de los cuales se calculó el porcentaje de células dañadas, es decir aquellas células que presentaban cauda o cola, así como los promedios de la longitud de la cauda o migración del ADN y se determinaron

las frecuencias relativas de la migración del ADN por cada uno de los lotes. La evaluación estadística se realizó mediante ANOVA con F-Snedecor y la prueba de rangos múltiples de Tukey, $\alpha = 0.05$, empleando el paquete SPSS.

Resultados y discusión.

El cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica es el sistema más utilizado para evaluar si un agente químico es citotóxico, clastogénico o mutagénico y, por tanto, potencialmente carcinogénico (Lerner y Dixon, 1973; Preston, 1987); incluso con este modelo también es posible evaluar genotóxicos en concentraciones subtóxicas, a partir de los cambios que producen en la proliferación celular (Ostrosky-Wegman, 1993).

En este trabajo se determinó la citotoxicidad del ion Ag^+ mediante el IM, el cual es un marcador muy accesible, en tanto que la genotoxicidad se valoró realizando la técnica de electroforesis unicelular o *ensayo cometa*, en ambos casos se utilizaron linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de $AgNO_3$.

Índice Mitótico

IM de cultivos expuestos al $AgNO_3$

En la tabla VI se presentan los resultados obtenidos del IM en los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de $AgNO_3$. En general, puede observarse que con la concentración de $0.01 \mu g/ml$ el IM se incrementó en tanto que con las de 10 y $100 \mu g/ml$ hubo una disminución gradual hasta llegar prácticamente a cero en los cultivos tratados con $1000 \mu g/ml$ (figura 3), comportamiento que pudo apreciarse en la mayoría de los individuos.

Particularmente, con la concentración de $0.01 \mu g/ml$, el IM en los cultivos de la mayoría de los individuos aumentó con relación al de sus testigos, como puede verse en la tabla VI. En los donadores con clave AA y ED el incremento fue de más del 100%, y en el

marcado con GL, de más del triple; en el resto del grupo, el índice disminuyó, siendo ML la donadora más sensible, en cuyos cultivos descendió a la décima parte (de 1.90 a 0.22).

Tabla VI. Índice mitótico promedio por donador encontrado en cultivos de linfocitos expuestos y no expuestos durante 48 h a diferentes concentraciones de AgNO_3 .

DONADOR	IM (%) \pm EE				
	Lote Testigo	Lotes Expuestos al Ion Plata ($\mu\text{g/ml}$ de cultivo)			
		0.01	10	100 DS*	1000**
AA	1.26 \pm 0.22	2.23 \pm 0.42	1.42 \pm 0.17	1.18 \pm 0.26	ND
CA	1.01 \pm 0.14	1.34 \pm 0.30	1.20 \pm 0.32	1.10 \pm 0.36	ND
DA	3.70 \pm 0.78	3.22 \pm 0.33	2.85 \pm 0.62	1.03 \pm 0.40	ND
ED	1.65 \pm 0.46	3.17 \pm 0.28	2.09 \pm 0.44	1.21 \pm 0.44	ND
GL	1.03 \pm 0.35	3.33 \pm 0.41	3.42 \pm 0.97	0.82 \pm 0.16	ND
HE	2.94 \pm 0.31	3.69 \pm 0.31	2.96 \pm 0.98	0.43 \pm 0.15	ND
IS	3.80 \pm 0.58	3.55 \pm 0.68	2.31 \pm 0.99	0.61 \pm 0.30	ND
LU	3.20 \pm 0.98	2.81 \pm 0.71	2.01 \pm 0.26	1.52 \pm 0.50	ND
ME	4.13 \pm 0.37	4.76 \pm 0.65	2.87 \pm 0.61	2.57 \pm 0.27	ND
ML	1.90 \pm 0.55	0.22 \pm 0.16	0.19 \pm 0.10	1.02 \pm 0.40	ND
Promedio \pm EE	2.46 \pm 0.47	2.83 \pm 0.42	2.13 \pm 0.55	1.15 \pm 0.32	ND

* Diferencias significativas para $\alpha=0.01$ y 0.05 mediante ANOVA y prueba de rangos múltiples de Tukey, con respecto al testigo y a los cultivos tratados con 0.01 y $10 \mu\text{g/ml}$ de AgNO_3 y a los expuestos a todas las concentraciones de NaNO_3 y KNO_3 .

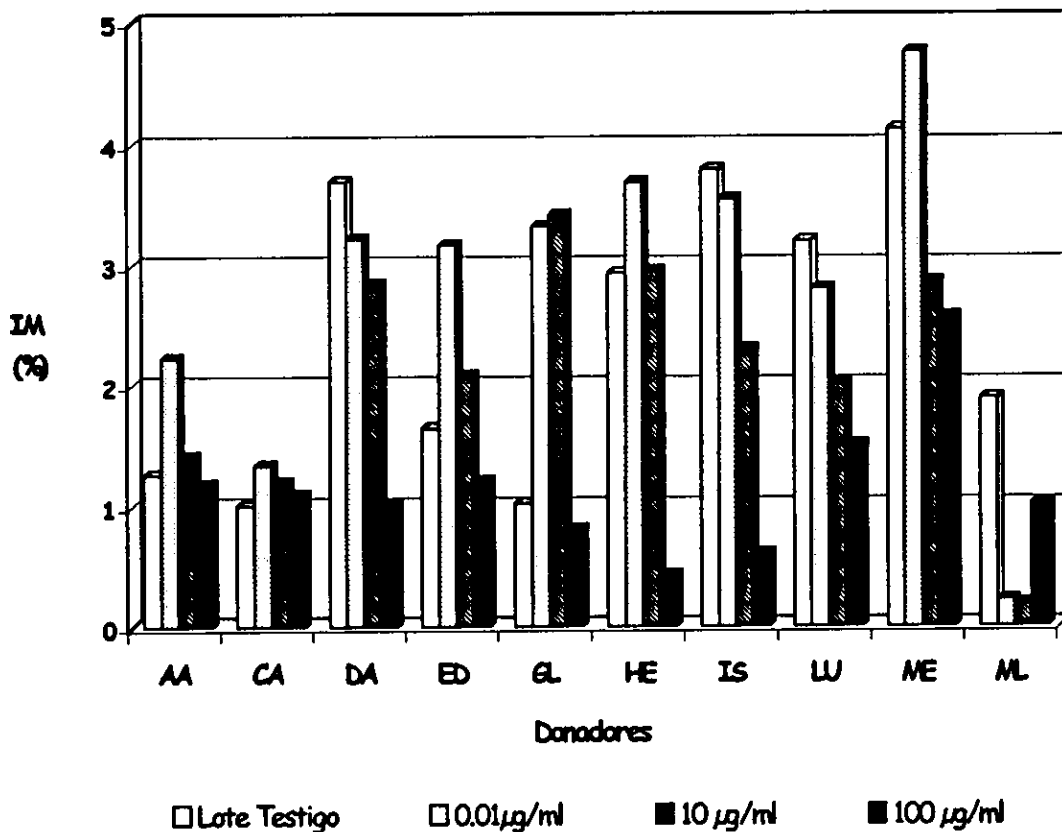
** No se determinó IM, debido a que en todos los casos no se obtuvieron suficientes células (menos de 100 por preparación).

El IM promedio de este lote fue 15% mayor al del testigo (2.83 y 2.46, respectivamente), diferencia que no resultó significativa de acuerdo con el Análisis de Varianza con F-Snedecor ($F= 3.987$); prueba de Tukey ($p>0.05$).

Sin embargo, este incremento puede interpretarse como estimulación de la proliferación y ha sido observado también por otros autores que han aplicado dosis pequeñas de

citostáticos como la mitomicina A y de metales como el cadmio y el arsénico (Ostrosky-Wegman, *et al.*, 1990; Zglinicki, *et al.*, 1992; Ostrosky-Wegman, 1993).

Figura 3. Índice mitótico promedio por donador, determinado en cultivos de linfocitos expuestos y no expuestos a AgNO_3 ($\mu\text{g/ml}$ de cultivo)



En el lote de cultivos tratados con $10 \mu\text{g/ml}$, la mitad de los donadores presentaron un IM mayor que el testigo; de éstos, sólo el individuo GL registró un incremento del doble y en los otros donadores el índice disminuyó, como se muestra en la tabla VI y figura 3. En este grupo, al igual que en el de $0.01 \mu\text{g/ml}$, el donador más sensible fue ML, aunque su índice disminuyó con la misma magnitud, de 1.90 del testigo a 0.19.

El índice promedio obtenido con este tratamiento fue menor que el del testigo (de 2.46 a 2.13), pero la diferencia no resultó significativa ($F=3.987$; Tukey, $p > 0.05$).

El no haber registrado diferencias significativas en estos dos lotes de menor concentración es indicio de que la muestra fue homogénea ya que, como lo señala Ostrosky-Wegman (1993), individuos adultos sanos de poblaciones homogéneas generalmente presentan variaciones en la susceptibilidad intra e inter individual cuando se les expone al mismo xenobiótico, sin que dichas variaciones sean significativas.

En los cultivos tratados con $100 \mu\text{g/ml}$, el IM descendió en la mayoría de los individuos, y de forma más notable en los casos DA, HE, IS y LU, en los que prácticamente se redujo al 50% de su testigo (tabla VI, figura 3). El promedio obtenido con esta concentración fue de 1.15, la mitad del testigo (2.46); las diferencias de este grupo resultaron estadísticamente significativas ($F=3.987$; Tukey, $p < 0.05$). Los cultivos no sólo difirieron en su proliferación, sino que además fueron cualitativamente distintos en color y consistencia y calidad de las preparaciones con relación a los no expuestos y a los tratados con 0.01 y $10 \mu\text{g/ml}$.

Con la concentración de $1000 \mu\text{g/ml}$ las diferencias fueron contundentes. Los cultivos de todos los donadores fueron invariablemente diferentes a los de su testigo, a los tratados con las otras concentraciones de AgNO_3 y a todos los expuestos a las sales de sodio y de potasio (ver figura 6, tabla VI). La cantidad de células fue mínima, casi nula, y no fue posible determinar el IM en ningún caso; posiblemente el efecto tóxico de la plata fue tal que la mayoría de las células murieron, y de las sobrevivientes, muy pocas o ninguna pudo responder al estímulo de la PHA.

En general los cultivos tratados con AgNO_3 siempre presentaron un color pardusco y precipitados o coágulos blanquecinos que aumentaban con la concentración de plata; los paquetes celulares al término del cultivo eran de menor tamaño, sobre todo con 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo. La calidad de las preparaciones fue menor a las del testigo y las de los expuestos a los nitratos de sodio y potasio, e incluso, con las concentraciones más altas, se dificultó la obtención de material suficiente para determinar el IM.

Como se mencionó anteriormente, con la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ estas diferencias fueron aún más claras, el color de los cultivos era totalmente pardo, los coágulos blanquecinos eran de mayor tamaño que con la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y, aún cuando el análisis microscópico se realizó al *doble ciego*, fue fácil reconocerlas pues éstas no presentaban más de 100 células en toda su superficie. Esto no dejó lugar a dudas sobre el efecto citotóxico del AgNO_3 .

IM de cultivos expuestos a NaNO_3

Al contrario de lo que ocurrió con la plata, en los cultivos tratados con todas las concentraciones de NaNO_3 (tabla VII y figura 4), los índices promedio presentaron poca variación con respecto al testigo, 2.18 con la concentración de 0.01 $\mu\text{g/ml}$, 2.35 con la de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 2.43 y 2.97 con 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

En la tabla VII y en la figura 4, se observa que con la concentración de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ el IM de la mayoría de los individuos aumentó, siendo de hasta un 50% en el caso del donador ED; en los otros el índice disminuyó. El donador más sensible fue IS, quien registró un descenso a cerca de la vigésima parte de su testigo (de 3.80 a 0.63). No obstante, el IM promedio (2.18) del lote no difirió de manera significativa del testigo ($F=3.987$; Tukey, $p>0.05$); por lo que, a esta concentración, no se encontró efecto del NaNO_3 sobre el IM.

Tabla VII. Índice mitótico promedio por donador encontrado en cultivo de linfocitos expuestos y no expuestos durante 48 h a diferentes concentraciones de NaNO_3 .

DONADOR	IM (%) \pm EE				
	Lote Testigo	Lotes expuestos al Ion Sodio ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de cultivo)			
		0.01	10	100	1000
AA	1.26 \pm 0.22	1.67 \pm 0.15	2.03 \pm 0.33	1.52 \pm 0.48	3.26 \pm 0.44
CA	1.01 \pm 0.14	1.41 \pm 0.70	1.96 \pm 0.53	1.08 \pm 0.37	2.89 \pm 0.17
DA	3.70 \pm 0.78	3.98 \pm 0.42	3.50 \pm 0.22	3.91 \pm 1.13	4.63 \pm 0.39
ED	1.65 \pm 0.46	3.04 \pm 0.90	2.82 \pm 0.60	3.24 \pm 0.51	2.30 \pm 0.44
GL	1.03 \pm 0.35	1.6 \pm 0.28	2.63 \pm 0.94	1.22 \pm 0.42	2.33 \pm 0.36
HE	2.94 \pm 0.31	3.55 \pm 0.30	2.00 \pm 0.30	1.86 \pm 0.25	**
IS	3.80 \pm 0.58	0.63 \pm 0.24	*	1.35 \pm 0.55	3.16 \pm 0.48
LU	3.20 \pm 0.98	2.71 \pm 0.68	3.37 \pm 0.39	4.41 \pm 1.00	2.42 \pm 0.19
ME	4.13 \pm 0.37	2.21 \pm 0.57	3.65 \pm 0.35	4.08 \pm 0.57	2.75 \pm 0.41
ML	1.90 \pm 0.55	0.96 \pm 0.47	1.55 \pm 0.27	1.61 \pm 0.36	**
PROMEDIO \pm EE	2.46 \pm 0.47	2.18 \pm 0.47	2.35 \pm 0.44	2.43 \pm 0.56	2.97 \pm 0.36

* No fue posible determinar el IM, por la escasa cantidad material celular..

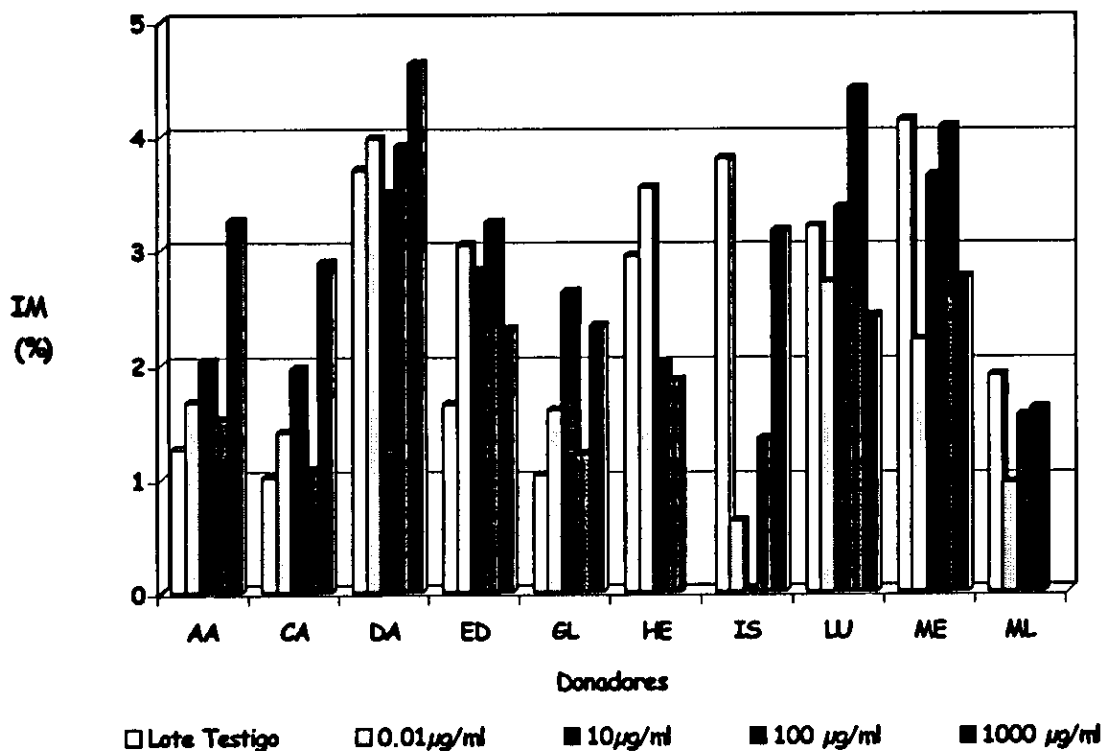
** No se contó con muestra del donador para esta concentración

En los cultivos tratados con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tabla VII, figura 4), la mitad de los donadores presentaron un incremento en el IM de más del 50%, mientras que en los demás disminuyó y sólo en el caso de IS fue de cero. El IM promedio del grupo fue de 2.35% y la diferencia con respecto al testigo no fue significativa ($F=3.987$; Tukey, $p > 0.05$) y por lo tanto, no se encontró efecto sobre el IM.

En cuanto a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en algunos casos el IM tuvo un aumento hasta de un 50%, mientras que en otros donadores descendió hasta la mitad, como en el caso de IS (tabla VII). Al promediar el índice de todos los donadores se obtuvo un valor de 2.43, que tampoco fue significativamente distinto con respecto al testigo ($F=3.987$;

Tukey, $p > 0.05$); por lo que podemos decir que la concentración de $100 \mu\text{g/ml}$ no tiene efecto citotóxico.

Figura 4. Índice mitótico promedio por donador, determinado en cultivos de linfocitos expuestos y no expuestos a NaNO_3 ($\mu\text{g/ml}$ de cultivo).



En los cultivos tratados con $1000 \mu\text{g/ml}$ de NaNO_3 , casi todos los individuos tuvieron aumento en el IM con relación a sus testigos (tabla VII, figura 4), llegando a ser del doble en algunos casos sin que el promedio del grupo fuera significativamente diferente al del testigo ($F=3.987$; Tukey, $p > 0.05$), y al de las otras concentraciones; por lo que el aumento registrado puede atribuirse a la variabilidad de la susceptibilidad de los donadores, quizá resultaría conveniente probar concentraciones más altas con NaNO_3 para determinar si el sodio estimula la proliferación linfocitaria.

A diferencia de los cultivos expuestos al nitrato de plata, la apariencia y consistencia de los cultivos tratados con las diferentes concentraciones de la sal de ion sodio no fue diferente a la de los testigos en cuanto a color, tamaño de paquete celular y calidad de las preparaciones, lo que sugiere que ni el ion Na^+ ni el NO_3^- afectan la proliferación celular.

IM de cultivos expuestos a KNO_3

Los IM promedio de las cuatro concentraciones de nitrato de potasio se presentan en la tabla VIII y en la figura 5, como se puede apreciar, las variaciones que se encontraron no resultaron significativas con relación a las del lote testigo ($F=3.987$; Tukey, $p>0.05$), lo que indica que el KNO_3 no tiene efecto sobre el IM de los linfocitos; sin embargo, en los cultivos expuestos a $0.01 \mu\text{g}$ de KNO_3/ml de cultivo, la mayoría de los individuos tuvieron un aumento en el IM, siendo de hasta un 50%, en el caso de DA (de 3.70 de su testigo a 5.26), en tanto que, en los demás, el IM se redujo siendo más drástico el descenso en CA, de 1.01 a 0.32. Asimismo, en la tabla VIII se observa que el índice de IS y de ML fue de cero, pues a pesar de que en ambos casos se obtuvo suficiente material celular no se registraron mitosis (tabla VIII, figura 5). El promedio resultante de esta concentración fue de 2.21%, sin que fuera significativamente diferente al del lote testigo ($F=3.987$; Tukey, $p >0.05$).

Con $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, la mitad del grupo presentó un IM menor al de su testigo, los donadores IS y ML fueron nuevamente los más sensibles y tuvieron un decremento de más del 70%; en la otra mitad, el IM aumentó y sólo en el individuo GL ese incremento fue de más del doble (tabla VIII y figura 5). El índice promedio del grupo fue de 2.16, no resultando significativamente diferente al testigo ($F=3.987$; Tukey, $p >0.05$).

Tabla VIII. Índice mitótico promedio por donador encontrado en cultivo de linfocitos expuestos y no expuestos durante 48 h a diferentes concentraciones de KNO_3 .

DONADOR	IM (%) \pm EE				
	Lote Testigo	Lotes expuestos al Ion Potasio ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de cultivo)			
		0.01	10	100	1000
AA	1.26 \pm 0.22	2.21 \pm 0.30	1.13 \pm 0.19	1.95 \pm 0.17	2.97 \pm 1.07
CA	1.01 \pm 0.14	0.32 \pm 0.15	0.94 \pm 0.28	1.67 \pm 0.46	1.96 \pm 0.39
DA	3.70 \pm 0.78	5.26 \pm 0.89	4.74 \pm 0.44	2.74 \pm 0.51	2.73 \pm 0.91
ED	1.65 \pm 0.46	2.79 \pm 1.33	1.03 \pm 0.25	0.67 \pm 0.34	0.81 \pm 0.44
GL	1.03 \pm 0.35	1.38 \pm 0.31	2.45 \pm 0.59	3.03 \pm 0.32	1.76 \pm 0.50
HE	2.94 \pm 0.31	2.17 \pm 0.31	3.28 \pm 0.23	2.90 \pm 0.43	**
IS	3.80 \pm 0.58	*	1.04 \pm 0.60	1.23 \pm 0.48	3.81 \pm 0.43
LU	3.20 \pm 0.98	3.47 \pm 0.61	4.25 \pm 0.70	4.14 \pm 0.71	4.09 \pm 0.71
ME	4.13 \pm 0.37	4.48 \pm 0.37	2.58 \pm 0.43	2.41 \pm 0.42	2.71 \pm 0.19
ML	1.90 \pm 0.55	*	0.20 \pm 0.12	0.48 \pm 0.22	**
Promedio \pm EE	2.46 \pm 0.47	2.21 \pm 0.43	2.16 \pm 0.38	2.12 \pm 0.41	2.60 \pm 0.58

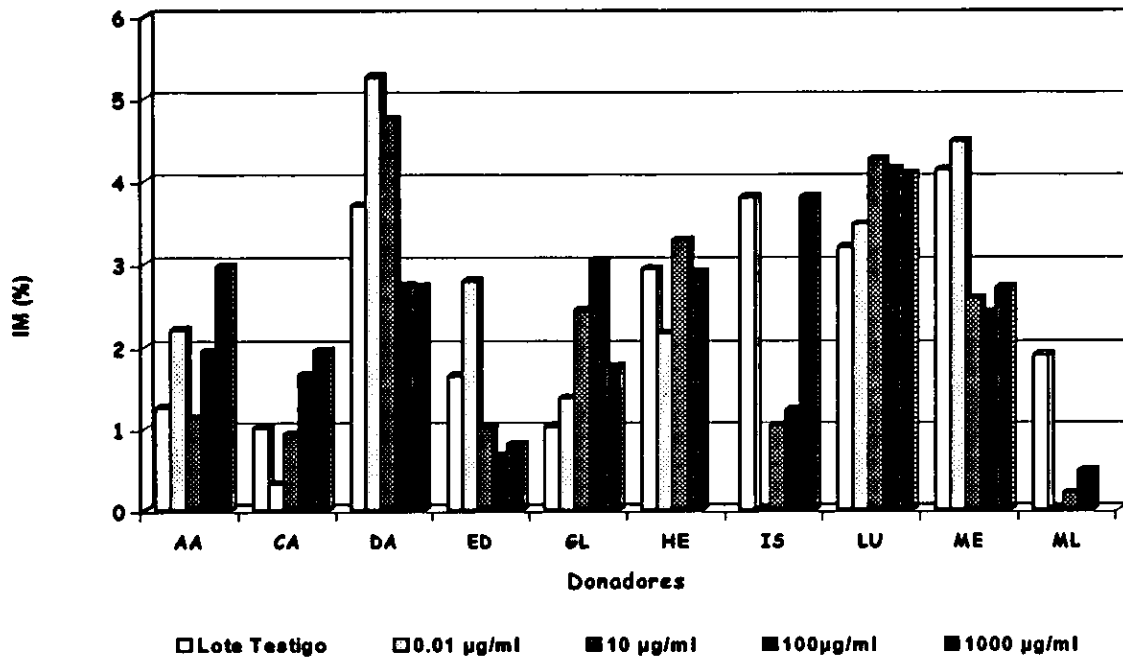
* No fue posible determinar el IM, por la escasa cantidad de células.

** No se tuvieron preparaciones.

En cuanto a los cultivos tratados con 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la mayoría de los individuos el IM aumentó hasta en un 50%, es decir, el KNO_3 estimuló la proliferación linfocitaria igual que el NaNO_3 a la misma concentración; en el resto de los donadores se registró un descenso hasta de la mitad de su testigo.

Al obtener el promedio de esta concentración se encontró un ligero aumento con respecto al testigo y a los cultivos expuestos a 0.01, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la sal de potasio (figura 5); sin embargo, tampoco estas diferencias resultaron significativas ($F=3.987$; Tukey, $p > 0.05$).

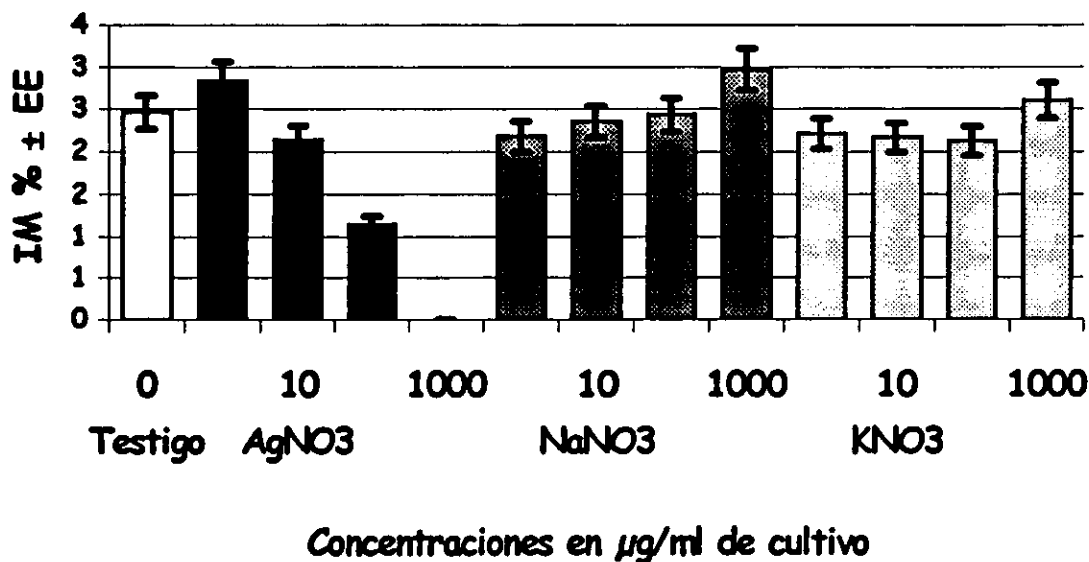
Figura 5. Índice mitótico promedio por donador, determinado en cultivos de linfocitos expuestos y no expuestos a KNO_3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de cultivo)



Cualitativamente, los cultivos tratados con las distintas concentraciones de la sal de potasio tampoco fueron diferentes a los no expuestos, en cuanto a apariencia, cantidad de células, y calidad de las preparaciones.

Como puede verse en la figura 6, en la que se grafican los promedios de todos los lotes, a diferencia de lo que sucedió con el ion plata, en los lotes tratados con las diferentes concentraciones de sodio y potasio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los índices y como se anota anteriormente, tampoco fueron cualitativamente diferentes al testigo; por lo que, con base en estos resultados se puede deducir que los iones NO_3^- , Na^+ y K^+ no afectan el IM y que las diferencias encontradas en el IM son producto de la variación en la sensibilidad de los donadores.

Figura 6. Índice mitótico promedio de los todos los lotes de cultivos de linfocitos expuestos y no expuestos a AgNO_3 , NaNO_3 y KNO_3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de cultivo)



En resumen, como se observa en la figura 6, presentaron diferencias significativas con relación al testigo, con las otras concentraciones de plata y con los tratados con sodio y potasio, únicamente los cultivos expuestos a las concentraciones de 100 y 1000 μg de nitrato plata/ml, en los que el IM disminuyó conforme aumentó la concentración de la plata; por lo que podemos decir que, el efecto citotóxico se manifiesta a partir de la exposición a la concentración de 100 μg de AgNO_3/ml y que éste es provocado por el ion Ag^+ .

Determinación del daño del ion plata sobre la molécula de ADN, mediante ensayo cometa

La evaluación del daño causado al ADN por el ion Ag^+ se realizó aplicando la técnica de electroforesis unicelular o ensayo cometa a una muestra de 10 individuos sanos; en este caso, los cultivos de linfocitos fueron expuestos a 10 $\mu g/ml$, concentración en la que no hubo efecto citotóxico, y a 100 $\mu g/ml$, concentración que si produjo dicho efecto. Este biomarcador fue elegido por su sensibilidad para determinar el efecto de agentes químicos directamente sobre las células individuales y particularmente sobre su ADN (Singh, *et al.* 1988; Tice y Andrews, 1993 y Tice, 1995).

Con los resultados de esta prueba, primeramente se determinó la fracción de células dañadas (tabla IX y figura 7), considerándose así a aquéllas que presentaron migración en el ADN o cauda y como normales las que presentaron núcleos íntegros. Como se observa en la misma tabla, en todos los donadores hubo una tendencia a presentar mayor daño en función del aumento de la concentración.

Al calcular los promedios por lote, el incremento en el daño ocasionado a los cultivos expuestos a 100 $\mu g/ml$, fue hasta de 3 veces con respecto al del lote testigo; de manera similar al efecto causado sobre el IM, los individuos presentaron variación en la respuesta al tratamiento; identificándose también diferentes grados de sensibilidad.

En particular, en el tratamiento con 10 $\mu g/ml$, los donadores con clave DA, ED, EM, GU, LE y LU presentaron un porcentaje de células dañadas de más del doble con relación a su testigo (tabla IX), es decir fueron más sensibles; mientras que en los demás donadores el incremento en dicho porcentaje fue menor.

Tabla IX. Porcentaje de células dañadas y normales por donador, encontrado en cultivo de linfocitos expuestos y no expuestos, al ion Ag^+ , durante 48 h.

Donador	Lote Testigo % de células		Lotes experimentales [$\mu g Ag^+/ml$]			
			10 (% de células)		100 (% de células)	
	Normales	Dañadas	Normales	Dañadas*	Normales	Dañadas*
AA	80.00	20.00	66.67	33.33	65.83	34.17
DA	69.00	31.00	32.00	68.00	8.00	92.00
ED	85.37	14.63	64.46	35.54	61.98	38.02
EM	82.50	17.50	54.17	45.83	24.17	75.83
GU	77.00	23.00	17.00	83.00	0.00	100.00
HE	85.12	14.88	72.73	27.27	53.41	46.59
LE	85.00	15.00	69.00	31.00	56.00	44.00
LU	89.47	10.53	72.50	27.50	59.17	40.83
ME	60.00	40.00	22.00	78.00	12.00	88.00
SI	71.00	29.00	48.00	52.00	24.00	76.00
PROMEDIO	78.45	21.55	51.85	48.15*	36.46	63.54*

* Diferencias significativas con χ^2 , $p < 0.01$ y $p < 0.05$.

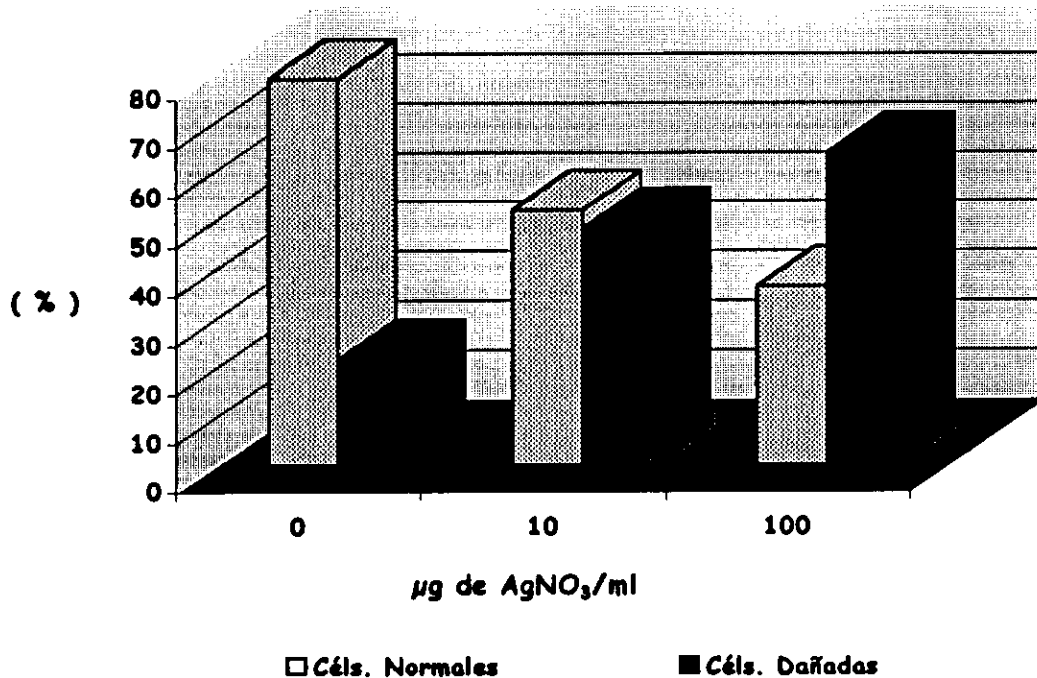
El promedio de células dañadas por grupo fue el doble del obtenido en el testigo (tabla IX, figura 7) y, al contrario de lo encontrado con el IM, esta concentración difirió de manera significativa a la del testigo (χ^2 , $p < 0.01$), lo que confirma el potencial genotóxico del ion Ag^+ y la sensibilidad del biomarcador utilizado.

Con la concentración de $100 \mu g/ml$, el porcentaje de células dañadas fue hasta tres veces mayor al del testigo como en el caso de los donadores EM, GU, HE, LE y LU, que fueron los más afectados; cabe señalar que DA no fue tan sensible a esta concentración como en la de $10 \mu g/ml$, lo que es muestra de la diferencia en la susceptibilidad individual (tabla IX).

El valor promedio de células dañadas en este lote (figura 7), también fue del triple del

testigo, diferencia que resultó estadísticamente significativa (χ^2 , $p < 0.01$).

Figura 7. Porcentajes promedio de células normales y dañadas de cultivos de linfocitos expuestos a diferentes concentraciones del ion plata [$\mu\text{g Ag}^+/\text{ml}$]



Los datos promedio de la migración del ADN (μm) por individuo se muestran en la tabla X, en ella se observa que hubo un incremento en la longitud de la cauda de las células de los cultivos expuestos a la plata, variando de $88.36 \mu\text{m}$ en el testigo a $101.34 \mu\text{m}$ en el lote de $10 \mu\text{g/ml}$ y a $110.26 \mu\text{m}$ en el de $100 \mu\text{g/ml}$ y se aprecia que hay un aumento proporcional del daño en función de la concentración utilizada, confirmándose la toxicidad a partir de la concentración de $10 \mu\text{g/ml}$ (figura 8). Estas diferencias fueron significativas ($F=20.199$; Tukey, $p<0.05$).), lo que también demuestra que el ensayo cometa es más sensible que el IM.

Tabla X. Migración promedio del ADNⁿ, registrada en células de cultivos expuestos

y no expuestos durante 48 h al ion Ag^+ en diferentes concentraciones

DONADOR	LOTE TESTIGO	LOTES EXPUESTOS A $AgNO_3$	
		10 $\mu g/ml$ de cultivo [™]	100 $\mu g/ml$ de cultivo [™]
	Migración media del ADN en $\mu m \pm EE$	Migración media del ADN en $\mu m \pm EE$	Migración media del ADN en $\mu m \pm EE$
AA	92.87 \pm 6.09	111.97 \pm 4.02	117.39 \pm 4.75
DA	89.87 \pm 5.87	110.91 \pm 3.58	111.90 \pm 2.92
ED	81.93 \pm 6.13	91.88 \pm 5.18	97.59 \pm 4.68
EM	84.18 \pm 5.55	95.20 \pm 3.98	113.91 \pm 3.04
GU	79.04 \pm 6.05	103.79 \pm 3.83	116.48 \pm 4.18
HE	82.37 \pm 7.67	84.38 \pm 5.12	117.01 \pm 5.62
LE	73.69 \pm 6.66	88.43 \pm 4.99	95.22 \pm 4.30
LU	66.63 \pm 9.28	90.40 \pm 5.59	102.72 \pm 5.72
ME	128.33 \pm 7.84	145.93 \pm 5.38	132.72 \pm 4.44
SI	104.67 \pm 4.95	90.54 \pm 4.48	97.71 \pm 3.24
Promedio \pm EE	88.36 \pm 6.58	101.34 \pm 4.61	110.26 \pm 4.29

* Datos basados en el análisis de 100 células por muestra.

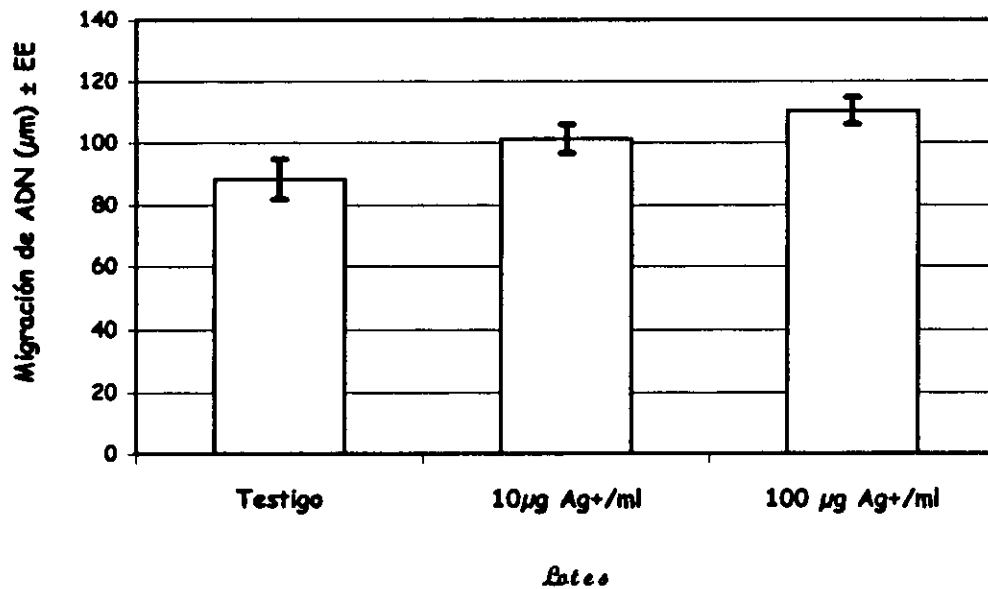
** Diferencias significativas de todo el grupo con ANOVA y prueba de Tukey $p < 0.05$ tanto con respecto al testigo como entre lotes.

En el grupo expuesto a 10 $\mu g/ml$ la media de migración en la mayoría de los individuos aumentó con relación al testigo, siendo GU y LU los donadores más sensibles; en el caso del donador SI, se registró un descenso de 104.67 μm de su testigo a 90.54 (tabla X). El promedio obtenido por lote (figura 8), como se mencionó anteriormente, se incrementó en un 20%, diferencia que resultó estadísticamente significativa con respecto al testigo ($F=20.199$; Tukey, $p < 0.05$).

Con 100 $\mu g/ml$, también la media de migración fue mayor a la del testigo, nuevamente el donador SI presentó un decremento de 104.67 en su testigo a 97.71 μm y, por el contrario en los otros donadores se incrementó, siendo GU y LU los más sensibles (tabla X). En este lote el promedio del daño aumentó en un 30% con respecto al testigo (figura

8), y la diferencia con relación a éste y al lote tratado con 10 μg resultó significativa ($F=20.199$; Tukey, $p<0.05$).

Figura 8. Migración promedio de ADN (μm) de linfocitos humanos expuestos y no expuestos durante 48 horas al ion plata



Ahora bien, al analizar la distribución de la longitud de migración del ADN, se puede obtener información acerca de la magnitud del daño (tabla XI y figura 9). En el lote testigo, se observa que la mayoría de las células dañadas caen en el intervalo de migración del ADN de entre 81 y 100 μm , mientras que, en el caso de los lotes expuestos a 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ag^+ , la mayor frecuencia se registra en los intervalos de 61 a 80 y de 81 a 100 μm , respectivamente.

Pudiera pensarse que con la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ la intensidad de daño disminuyó (tabla XI), pues la mayor frecuencia se encuentra en un intervalo menor al testigo; sin embargo, al analizar con más detalle la distribución, se observa que también en el intervalo de 101-120 μm hay una proporción alta de células dañadas. Más aún, en los intervalos de mayor longitud la frecuencia de éstas es notablemente mayor que en el testigo. Esta interpretación concuerda con lo encontrado en el análisis estadístico, ya que este lote fue significativamente diferente al testigo ($F=20.199$, Tukey; $p<0.05$).

Tabla XI. Distribución de frecuencias relativas, obtenidos de la evaluación el daño al ADN de linfocitos expuestos a Ag^+ .

Ag^+ $\mu\text{g/ml}$ de cultivo	Distribución de Frecuencias Relativas (%)										
	Intervalos longitud de migración del ADN (μm)										
	1-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	121-140	141-160	161-180	181-200	>200
0.00	0.0	7.5	13.2	16.2	22.4	19.7	11.4	3.9	2.6	2.6	0.4
10 (DS) [*]	0.0	1.4	10.1	20.2	16.0	19.4	14.9	9.1	4.8	2.4	1.8
100 (DS) [*]	0.0	0.7	7.0	10.3	22.9	21.4	18.1	9.0	6.0	3.1	1.1

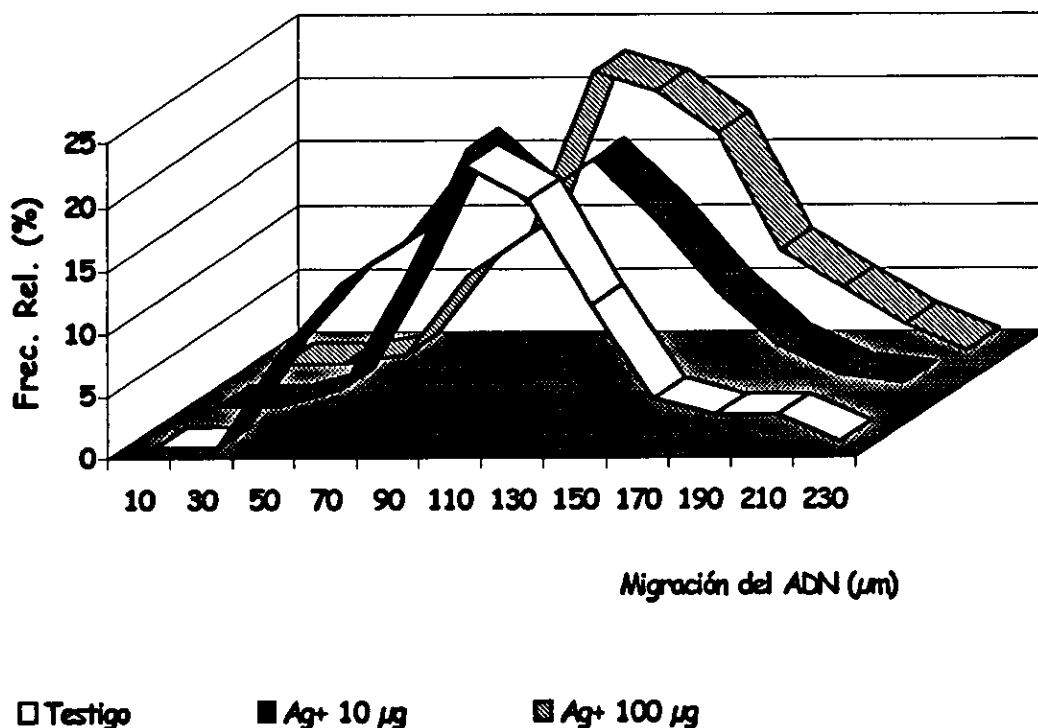
* Diferencias significativas con ANOVA y prueba de rangos múltiples, $p < 0.05$ y 0.01 .

En los cultivos expuestos a 100 $\mu\text{g/ml}$, la mayor frecuencia se ubicó, al igual que en el testigo, entre 81 y 100 μm (tabla XI); no obstante, la proporción de células dañadas que se encontró en los intervalos de mayor longitud se incrementó (figura 8). Este aumento se reflejó en el promedio de daño obtenido con esta concentración y las diferencias con respecto al testigo y al lote tratado con 10 $\mu\text{g/ml}$ resultaron significativas ($F=20.199$, Tukey; $p<0.05$). Con estos resultados se deduce que hay un incremento en la intensidad del daño al ADN proporcional a la concentración de la plata.

Los resultados obtenidos del IM y del *ensayo cometa* nos permiten afirmar que, en forma

de AgNO_3 , es el ion plata (Ag^+) y no el ion NO_3^- es el que tiene efecto citotóxico, ya que disminuye significativamente la proliferación linfocitaria a $100 \mu\text{g/ml}$ y a $1000 \mu\text{g/ml}$ produce muerte celular; también es genotóxica, pues produce rompimiento en el ADN, cuando se exponen cultivos de linfocitos humanos a soluciones de 10 o más $\mu\text{g/ml}$, por 48 h, concentración menor a las de las múltiples formas en que se emplea. Cabe mencionar que Aguilar (com. personal), en estudios recientes encontró que, a partir de $6 \mu\text{g/ml}$ de AgNO_3 , se registran diferencias significativas al aplicar *ensayo cometa* o electroforesis unicelular, lo que apoya nuestros resultados. Por otro lado, de acuerdo con Gosden, *et al.* (1992), el hecho de haber realizado estas pruebas con cultivos primarios nos permite tener una idea cercana a lo que sucedería en los sistemas vivos.

Figura 9. Distribución de Frecuencias Relativas (%) por lote de la migración del ADN de linfocitos tratados con el ion plata en forma de $\text{AgNO}_3 \mu\text{g/ml}$ de cultivo



Las diferencias encontradas en la respuesta de los individuos consideramos que son atribuibles a la variabilidad de la sensibilidad de los mismos, lo que concuerda con lo reportado por Ostrosky-Wegman (1993) y Aguilar, *et al.* (1999). Asimismo, tanto en los estudios de exposición crónica como aguda se ha observado que no todos los individuos presentan la misma respuesta; debe tenerse en cuenta que existen mecanismos de protección, desintoxicación y reparación a nivel inmunológico, celular y molecular.

Aunque Granati, *et al.* (1982), encontraron que la mayor parte de la plata que ingresa al organismo es eliminada a través de las heces fecales y la orina, recientemente se observaron, por primera vez, gránulos de plata en las glándulas sudoríparas y mastoides, así como flotando libremente en el citoplasma de células de la piel de un hombre con argirosis, lo que amplía el conocimiento de las diversas formas de interacción de la plata con el ambiente celular y extracelular y sobre los posibles mecanismos de desintoxicación (Lech, 1997; Massi y Santucci, 1998).

Las observaciones realizadas a lo largo de esta investigación, plantean la interrogante de si, en algunas dosis, las células son capaces de recuperarse o reparar el daño y también surge la inquietud de determinar lo que ocurriría en sistemas *in vivo*, por exposición aguda y crónica ocupacional.

Además sería conveniente evaluar el efecto de los nitratos de sodio y de potasio, utilizando como biomarcador la técnica de electroforesis unicelular, con el fin de descartar el riesgo de genotoxicidad.

En los últimos años, los estudios sobre la toxicidad de la plata han recobrado interés, se ha publicado que la plata iónica es el agente más tóxico después del mercurio, y es

precisamente en forma de AgNO_3 , una de las más solubles, como presenta mayor capacidad para liberar iones, por lo que también se le considera un contaminante ambiental de alto grado de toxicidad capaz de bioacumularse en órganos, tejidos y de alterar el metabolismo de organismos acuáticos y terrestres (Filov, *et al.*, 1993; Hirasawa, *et al.*, 1994; Falandysz y Danisiewicz, 1995; Dierickx y Bredael-Rozen, 1996; Ratte, 1999). Con nuestros resultados se amplía el conocimiento a los niveles de complejidad celular y molecular, pues como se ha visto, es capaz de alterar la proliferación celular y de causar daño al ADN.

Las normas con las que se han establecido los límites permisibles de la concentración de Ag^+ en suelo, atmósfera y agua, como se citó anteriormente, están basadas en pruebas de toxicología clásicas, por lo que sería recomendable mantenerlas en constante revisión, a la luz de nuevas técnicas como son los ensayos de química ambiental, citogenéticos, de electroforesis unicelular y pruebas moleculares (Filov, *et al.*, 1993; Hayes, 1994; Jansen, *et al.*, 1994; Tamimi, 1998; Aguilar, com. personal) con el fin de que, al establecer los límites, se consideren los efectos que los desechos de plata tienen sobre el ambiente, sobre la estructura y fisiología celular de los organismos, incluido el hombre y, sobre todo, por el uso cada vez más amplio de este ion en diferentes ramas de la industria.

Conclusiones

- De acuerdo con los resultados, el ion Ag^+ es un agente con efecto cito y genotóxico.
- Se observó que a partir de la concentración de 100 μg de AgNO_3/ml disminuye el IM, mientras que a la 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ afecta a la molécula de ADN.
- En esta investigación también se encontró que los iones Na^+ , K^+ y NO_3^- no producen estos efectos.
- Los resultados obtenidos con el ion Ag^+ complementan otras investigaciones realizadas en niveles de complejidad superior, por ejemplo, de individuos, órganos, tejidos y vías metabólicas.
- Con base en nuestras observaciones y a la reciente inclusión de Ag^+ , en la lista de contaminantes ambientales de importancia, así como de la amplia gama de usos que se le dan a este metal, se recomienda la revisión permanente de las normas, a la luz de estos y otros biomarcadores.
- Finalmente, dada la importancia que la plata tiene en México y a la cantidad de personas que están involucradas en los procesos de extracción, purificación e industrialización, así como por la diversidad de usos que tiene, es conveniente que se establezcan estrictas medidas de seguridad en su manejo y se verifiquen las dosis y no se empleen indiscriminadamente los productos que la contienen.

Bibliografía

1. Aguilar, M.A., S. Espinosa, L. Rodríguez y C. Piña. (1999). Biocompatibility *in vitro* tests of Zinalco, *Mutat. Res.* 446:129-34.
2. Aguilar, M.A. Comunicación personal.
3. Albert, L. (1990). Toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS-OMS. Ed. Limusa-Noriega, México.
4. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. (1995). *Molecular biology of the cell*. Garland Publ. Inc. New York, 1294 pp.
5. Arakaki, D.T. y R.S Sparkes. (1963). Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Citogenet.*2:57-60.
6. Aterwill, C. (1995). "Alternative method of assesing toxicity". Chapter 1, en: O'Hare, S. *Methods in molecular Biology*, Vol. 43, *In vitro* toxicity testing protocols, Humana, Press. Inc. N.J. pp. 1-9.
7. Barile, F. (1994). *Introduction to in vitro Cytotoxicology. Mechanisms and methods*, CRC Press Inc., USA.
8. Betancourt, M., R. Ortiz, C. González, P. Pérez, L. Cortés, L. Rodríguez y L. Villaseñor. (1995). Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and

- malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay, *Mutat. Res.* 331:65-67.
9. Budavari, S., M.J. O'Neil, A. Smith, P.E. Heckelman y J.F. Kinneary. (1996). The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12th edition, Merck Research Lab., Merck & Co, USA.
 10. Buttherworth, F., Corkum, L. y Guzmán-Rincón, J. eds. (1995). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change, Plenum Press. 348 pp.
 11. Carson, B., L. M. Ellis. y J. L. McCann. (1986). Toxicology and biological monitoring of metals in humans including feasibility and need. Michigan Lewis Publ. USA.
 12. DeVicenzo, G., C. J. Giordano y L. S. Schriever. Biologic monitoring of workers exposed to silver. *Int. Arch. Occup. Environ Health*, 56:207-215.
 13. Fairbridge, R.W. (1972). The encyclopedia of geochemistry and environmental sciences", Dowden Hutchinson & Ross Inc., Pennsylvania.
 14. Falandysz, J. y D. Danisiewicz. (1995). Bioconcentration Factors (BCF) of Silver in Wild *Agaricus campestris*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55:122-129.
 15. Dierickx, P.J. y E. Bredael-Rozen. (1996). Correlation between the *in vitro* cytotoxicity of inorganic metal compounds to cultured fathead minnow fish cells and the toxicity to *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57:107-110.

16. Filov, V.A. B.A. Ivin y A.L. Bandman. (1993). Elements in groups I-IV of the periodic table and their inorganic compounds. Harmful chemical substances. vol. 1. pp 1-104.
17. Fishbein, L., A. Furst y M.A. Mehlman, eds. (1987) "Genotoxic and Carcinogenic Metals: Vol. XI, Advances in Modern Environmental Toxicology, Princeton Scientific Publishing, Co. Inc. Princeton, New Jersey, p 255.
18. Gonsebatt, M. E., L. A. Herrera y P. Ostrosky-Wegman. (1995). Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring: label, mitotic and replication indices as biomarkers in environmental monitoring. en: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*, Plenum Press, New York. pp 81-94.
19. Gosden, C.M., C. Davidson y M. Robertson (1992). Lymphocyte culture, en: Rooney, D.E. y B.H. Czepulkowski, *Human Citogenetic, Vol. 1*, Oxford University Press, N. York, pp 31-54.
20. Granati, A. R. Lenzi, G. Poggini y P. Galvan. (1982). Valutazione dell'impatto dell'argento sulla salute dell'uomo. *Dif. Soc.* 61(3):90-112.
21. Green, M.H.L., J.E. Lowe, S.A. Harcourt, P. Akinluy, T. Rowe, J. Cole, A.V. Anstey y C.F. Arlett. (1992). UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. *Mutation Res.* 271:101-113.
22. Hayes, A. W., (1994). Principles and methods of toxicology. Raven Press, New York.

23. Hirasawa, F., M. Sato y Y. Takizawa. (1994). Organ distribution of silver and the effect of silver on copper status in rats. *Toxicology Letters*, 70:193-201.
24. Hsu, T.C. (ed.). (1982). *Cytogenetic assay of environmental mutagens*. Allanheld, Osmun and Co. Publ. USA.
25. INEGI. (1996), *La minería en México*, INEGI, México.
26. INEGI, Base de Datos: <http://www.inegi.gob.mx>.
27. Jansen, B., M. Rinck, P. Wolbring, A. Strohmeier y T. Jahns. (1994). In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy and biocompatibility of a silver-coated central venous catheter. *J. Biomater. Appl.* 9(1):55-70.
28. Landsdown A.B., B. Sampson, P. Laupattarakasem y A. Vuttivirojana. (1997). Silver aids in the sterile skin wound: experimental studies in the laboratory rat. *Br. J. Dermatol.* 137(5):728-35.
29. Lech, T. (1997). Analytical findings in a fatal poisoning with silver compound. *J. Anal. Toxicol.* 21(7):580-3.
30. Lerner, R. A. y F. J. Dixon. (1973). The human lymphocyte as an experimental animal. *Scient. Am.* 228:82-91)
31. Massi, D. y M. Santucci. (1998). Human generalized argyria: a submicroscopic and X-ray spectroscopic study. *Ultrastructural Pathology*, 22(1):47-53.

32. McKelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo y A. Collins. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review, *Mutat. Res.*, 288:47-63.
33. Moorhead, P. S., P.D. Nowell, W.J. Melman, D.,M. Battips y P.S. Hungerford. (1960). Chromosome preparations of leukocyte culture from peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20:613-615.
34. Nakamuro, K. y Y. Sayato. (1986). Studies on the toxicity of silver ion in water filtered through a household water purifier equipped with a silver-coated charcoal filter, *Eisei Kagaku*, 32(1):28-33.
35. Natarajan, A. T. y G. Obe,. (1982). Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays, en: Heddle, J. (ed.) *Mutagenicity. New horizons in genetic toxicology.* Academic Press. USA.
36. Obe, G. (1994). *Advances in mutagenesis research 5*, Berlín, Heidelberg, Singer-Verleg. New York. p 193.
37. Ostrosky-Wegman, P., R. Montero y L. López. (1990). Paradoxical effects of low doses on cell proliferation of lymphocytes, *Env. and Mol. Mut.*:15-46.
38. Ostrosky-Wegman, P., M.E. Gonsebatt, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, G. García-Vargas, L.M. del Razo y M. Cebrián, (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot on individuals cronicly exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Res.* 250:477.

39. Ostrosky-Wegman, P. (1993). El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. *Gaceta Médica de México*, 130(6):432-437.
40. Preston, J., J.R. San Sebastian y A.F. McFee. (1987). The in vitro lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutat. Res.* 189:175-83.
41. Ramakrishna, R. S., P. Muthuthamby, R.R. Brooks y D.E. Ryan. (1982). Blood lead levels in Sri Lankan families recovering gold and silver from jeweller's waste, *Archives of Environmental Health*, 37(2):118-20.
42. Ratte, H.T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(1):89-108.
43. Robinson, S.H. y M. Costa. (1982). The induction of DNA strand breakage by nickel compound in cultured CHO cells. *Cancer Lett.* 15:35.
44. Rojas, E., R. Montero, L.A. Herrera, M. Sordo, M.E. Gonsebatt, R. Rodríguez y P. Ostrosky-Wegman. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing?, *Mutat. Res.* 282:283-86.
45. Rojas, E., *et al.* (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs*, 4: 637-40.
46. Sharma, A. y G. Talukder. (1987). Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Env. Mutagenesis* 9:191-226.

47. Singh, N.P., M. McCoy, R. Tice y E. Schneider. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175:184-91.
48. Srivastava, R.C.; M.M., Husain; S.K. Srivastava; S.K. Hasan y A. Lal. (1995). Effect of pre-exposure to cadmium and silver on nickel induced toxic manifestations in mice: possible role of ceruloplasmin and metallothionein, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54:751-59.
49. Sullivan, J. y G. Krieger. (1992). *Hazardous materials toxicology: clinical principles of environmental health*, William & wilkins, USA.
50. Tamimi, S.O., S.M. Zmeili, M.N. Gharaibeh, M.S. Shubair y A.S. Salhab. (1998). Toxicity of a new antismoking mouthwash 881010 in rats and rabbits, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53(1):47-60.
51. Thurberg, F. P., A. Calabrese y M.A. Dawson. (1974). Effects of silver on oxygen consumption of bivalves at various salinities, en: Vernberg, F. y Verberg, W. (eds.), *Pollution and physiology of marine organisms*. Academic Press, USA, pp 67-78.
52. Tice, R. y M.S. Andrews. (1993). Protocol for the applications of the alkanin single cell (SCG) assay to the detection of DNA damage in eukaryote cells. Integrated Laboratory Systems, 7 pp.

53. Tice, R. (1995). Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants, en: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*, Plenum Press, New York. pp 69-77.
54. Tweden, K.S., J.D. Cameron, A.J. Razzouk, R.W. Holmberg, R.J. Bricault, J.E. Barry y E. Tobin. (1997). Silver modification of polyethylene terephthalate textiles for antimicrobial protection. *ASAIO J.* 43(5):475-81.
55. U.S. Geological Survey, *Mineral Commodity Summaries*; <http://www.usgs.gov>.
56. WHO, 1985. Environmental Health Criteria 46. , World Health Organization, Geneva, pp. 29-43.
57. Zglinicki, V.T., C. Edwall, E. Ostlund, B. Lind, M. Nordberg, N.R. Ringertz y J. Wroblewski. (1992). Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *Journ. of Cell Science*, 103:1073-81.