



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

Estudio de la genotoxicidad de nanopartículas
de plata en fase almidón en un ensayo agudo
y subcrónico en ratones CD1.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
GUADALUPE AGUSTINA NIETO GATICA

ASESORES:

M. EN C. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS
DR. GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex. 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 en el año 2010, bajo la dirección de la M. en C. Maritere Domínguez Rojas.

AGRADECIMIENTOS

La felicidad no es una estación a la que se llega, sino una forma de viajar.

A la M. en C. **Maritere Domínguez Rojas** por haber confiado en mí, por la paciencia y por la dirección de este trabajo.

A la Dra. **Sandra Díaz Barriga Arceo** y **Rosalba Bonilla Sánchez** por su apoyo, paciencia en la revisión del trabajo.

Al Dr. **Guillermo Pérez Ishiwara** y al Dr. **Guillermo San** Martín por el apoyo en la dirección de este trabajo.

A los sinodales QFB. **Pedro Mijangos** y Dr. **Roberto Díaz** por su paciencia en la revisión de este trabajo.

A mis **Padres** por su amor, esfuerzo y sacrificio.

A mi hermana **Xochitl** por acompañarme en mis desvelos, por su comprensión y amistad.

A **Carlos, Jacqueline, Luz, Osvi** y **Pepe**, por su apoyo incondicional en el trabajo realizado.

A mi **Universidad Nacional Autónoma de México** por la oportunidad de brindarme conocimientos y formarme como profesionista. Orgullosamente UNAM...

A las **profesoras del P. T. de Genética** que hicieron que me enamorara del mundo de la genética.

Al **personal del Laboratorio de Citogenética L521** de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por su disponibilidad y ayuda.

A la Dra. **Adriana Díaz Anzaldúa** y **Octavio Hernández** por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su comprensión y amistad.

Gracias a todos los **profesores** que participaron en mi desarrollo profesional durante la carrera, por su ayuda y conocimientos.

Al M. en C. **Abelardo Quintero Quintana** por su sabiduría y apoyo en este trabajo.

A la **Familia Sánchez Ávila**, por abrirme las puertas de su casa y quererme como una hija.

A la **Sra. Rosario y María Luisa**, por cobijarme en su hogar, por sus consejos, por su apoyo incondicional.

DEDICATORIAS

A mis Padres

Que me dieron la vida y por su amor, la oportunidad de crecer, de amar, triunfar, de valerme por mi misma, por su gran corazón y capacidad de entrega, sin ustedes no habría podido alcanzar esta meta, no tengo las palabras exactas para decirles todo el amor que siento por ustedes. Para ustedes siempre...

A mi Abue (t)

Por su sabiduría e inteligencia, por esas historias, por su fortaleza, gracias angelito...

A mis hermanas

Que a pesar de todo han estado conmigo y me han brindado su comprensión y consejos, por crecer conmigo e ir juntas de la mano...

A mis sobrinos

Por esas sonrisas y travesuras, que han hecho que valore los días en familia.

A mis padrinos, tíos, primos....

Por esas alegrías, por la confianza, por su amor, por brindarme porras al estar lejos de la familia.

A mis amigos de toda la vida

Andrés, César, Dane, David, Gizz, Irma, Jare, Jorge, Miguel, Rox, Sergio, Tere, Vane, Vania, Xime por esas etapas de la vida que hemos compartido infancia, adolescencia, juventud y por las que nos faltan por vivir, por sus risas, consejos, tristezas, amor, desveladas, porras, por estar en esos momentos inestables y estables de la vida, por su amistad incondicional... Gracias.

A mis amigos de la Facu

Carlos, Jacque, Lu, Lula, Sara, que aunque son contados con los dedos de la mano me brindaron su corazón y me dejaron entrar en sus vidas, por su apoyo, coraje, inteligencia, admiración, amor, alegrías, tristeza, por su amistad incondicional... gracias

Jacque

Si, tienes un apartado especial, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, gracias por salvarme y cobijarme, por protegerme, por estos cinco años que hemos compartido, porque a pesar de no conocerme confiaste en mi, ya lo sabes eres incondicional, sigue siendo esa chica a la que todos queremos, las cosas siempre pasan por algo, hay que aprender y sobrellevar la vida...

Lu y Lula

Ustedes también, doy gracias por no haber sido incorporada a la UNAM, de haber sido así creo que no seríamos tan amigas, gracias mi argentina, gracias Lu por salvarme...

A Ser

Por esos momentos de alegría, por tus consejos, tus sonrisas, tus chistes, porque me has enseñado que solo se vive una vez...

Abel

Es complicado, pero principalmente por estos casi seis años que hemos compartido, no tengo palabras para describir lo que me haces sentir, gracias por abrirme las puertas de tu corazón, por esas charlas, alegrías, tristezas, por tu comprensión, por tu sinceridad y amor...Eres tu amor, mis ganas de reír, el adiós que no sabré decir, porque nunca podré vivir sin ti... Hay amores que se vuelven resistentes a los daños como el vino que mejora con los años así crece lo que siento yo por ti...

A todas las personas que cumplieron como estaciones formando parte de este trabajo...

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	3
Índice de figuras.....	4
Índice de tablas.....	5
Índice de gráficas	6
Resumen	7
Introducción	
Capítulo 1. Nanotecnología.....	8
Capítulo 2. Nanopartículas	11
2.1 Usos de las nanopartículas	11
2.2. Nanopartículas en medicina.....	12
2.3. Nanopartículas de plata.....	13
Capítulo 3. Nanopartículas y toxicidad	15
3.1. Vías de exposición a las nanopartículas	16
3.2. Depósito en órganos.....	17
3.3. Genética toxicológica.....	18
3.3.1. Definición	18
3.3.2. Aplicaciones	18
3.3.3. Genotoxicidad	18
3.3.4. Pruebas de genotoxicidad	19
3.3.5. Mecanismos de daño al ADN por nanopartículas.....	19

Capítulo 4. Micronúcleos.....	22
4.1. Definición.....	22
4.2. Historia de micronúcleos.....	22
4.3. Fundamento de la técnica.....	23
4.4. Tipos de ensayo.....	24
4.5. Ventajas <i>in vivo</i>	25
4.6. Estudio agudo.....	25
4.7. Estudio subcrónico.....	26
4.8. Eritropoyesis.....	26
5. Justificación.....	29
6. Hipótesis.....	30
7. Objetivos.....	30
8. Materiales y métodos.....	31
9. Diseño experimental.....	35
10. Resultados.....	37
11. Discusión.....	46
12. Conclusiones.....	51
13 Referencias.....	52

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleíco.

AgNP: Nanopartículas de plata.

ATP: Adenosin trifosfato.

CBMN: Cytokinesis-black micronucleus.

CD1: Cluster of designation 1.

ENC: Eritrocito normocrómico.

ENCMN: Eritrocito normocrómico micronucleado.

EPC: Eritrocito policromático.

EPCMN: Eritrocito policromático micronucleado.

H⁺: Ión hidrógeno.

M: Metal.

MN: Micronúcleos.

Nanopartícula = nanomaterial.

NP: Nanopartículas.

OH: Hidroxilo.

R: Residuo.

Redox: Óxido-reducción.

RNA: Ácido ribonucleíco.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RPBI: Residuo peligroso biológico e infeccioso.

TiO₂: Dióxido de titanio.

TNF: Factor de necrosis tisular.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Elementos comercialmente disponibles como nanopartículas.....	8
Figura 2.	Modelo por ordenador de una funda de nanoengranaje.....	10
Figura 3.	Ejemplo de aplicación de nanopartículas de plata (25nm) en calcetines producidos por la empresa AgActive	12
Figura 4.	Nanopartículas de plata usadas como antiherpético.....	14
Figura 5.	Esquema para ilustrar los posibles mecanismos de captación de las nanopartículas incluyendo la difusión pasiva y la endocitosis..	20
Figura 6.	Mecanismos indirectos que pueden conducir a la genotoxicidad.....	21
Figura 7.	Mecanismo de formación de micronúcleos.....	24
Figura 8.	(a) Proceso de eritropoyesis <i>in vivo</i> , (b) mecanismo de formación de micronúcleo.....	28
Figura 9.	a) Eritrocito normocrómico, b) Eritrocito policromático c) Eritrocito policromático micronucleado.....	45
Figura 10.	Eritrocito normocrómico micronucleado.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Frecuencia de EPC en 1000 ENC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo agudo.....	37
TABLA 2.	Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo agudo.....	39
TABLA 3.	Frecuencia de EPC en 1000 ENC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo subcrónico.....	40
TABLA 4.	Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo subcrónico.....	42
TABLA 5.	Frecuencia de ENCMN en 1000 ENC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo subcrónico.....	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1. Relación de EPC/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio agudo de las nanopartículas de plata en fase almidón.....38
- Gráfica 2. Relación de EPCMN/EPC en 1000 eritrocitos en el estudio agudo de las nanopartículas de plata en fase almidón.....39
- Gráfica 3. Relación de EPC/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio subcrónico de las nanopartículas de plata en fase almidón.....41
- Gráfica 4. Relación de EPCMN/EPC en 1000 eritrocitos en el estudio subcrónico de las nanopartículas de plata en fase almidón.....42
- Gráfica 5. Relación de ENCMN/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio subcrónico de las nanopartículas de plata en fase almidón.....44

RESUMEN

La nanotecnología es la manipulación de la materia a partir de elementos de la Tabla Periódica a escala de nanómetros [nm], lo que llevaría a la posibilidad de fabricar materiales y/o máquinas a partir del reordenamiento de átomos y moléculas. Por medio de la nanotecnología se obtienen las nanopartículas de plata, su importancia de estudio está dada por su uso en la nanomedicina, electrodomésticos e industria textil.

En la actualidad no se tienen estudios suficientes para comprobar que las nanopartículas de plata provoquen o no daño por lo que es necesario realizar estudios que permitan conocer los efectos que éstas van a tener tanto en el hombre (daño celular como genotoxicidad y citotoxicidad) como en el medio ambiente.

En este trabajo se pretendió estudiar sí las nanopartículas de plata en fase almidón podrían tener un efecto citotóxico y/o genotóxico mediante la técnica de micronúcleos a partir de un ensayo agudo (tiempo de exposición 72 hrs) y en un estudio subcrónico (exposición durante 10 días) en un modelo de ratón CD1.

Se trabajaron con nanopartículas de plata a diferentes concentraciones que fueron la solución A (0.01 M) para un ensayo agudo; solución A, solución B (1:5) y solución C (1:25) en un estudio subcrónico, además se utilizó el almidón como vehículo que fue evaluado de manera individual.

Los resultados obtenidos por la técnica de micronúcleos arrojaron que las nanopartículas de plata en fase almidón, no presentaron genotoxicidad ni citotoxicidad en ratones CD1.

1. NANOTECNOLOGÍA

La **nanotecnología** es la manipulación de la materia a partir de elementos de la Tabla Periódica (Ver Fig. 1) a escala de nanómetros [nm], es decir, un milésimo de un millonésimo de un metro [Vyvyan, 2003], lo que llevaría a la posibilidad de fabricar materiales y/o máquinas a partir del reordenamiento de átomos y moléculas. [Goodsell, 2004]

Cuando se manipula la materia a una escala tan minúscula de átomos y moléculas, se observan fenómenos y propiedades totalmente nuevas. [Goodsell, 2004]

La nanotecnología (incluyendo la nanobiotecnología) ha sido señalada y promocionada por la industria y los gobiernos como la revolución industrial, que hará aparecer los anteriores logros tecnológicos como pequeños pasos. [Vyvyan, 2003]

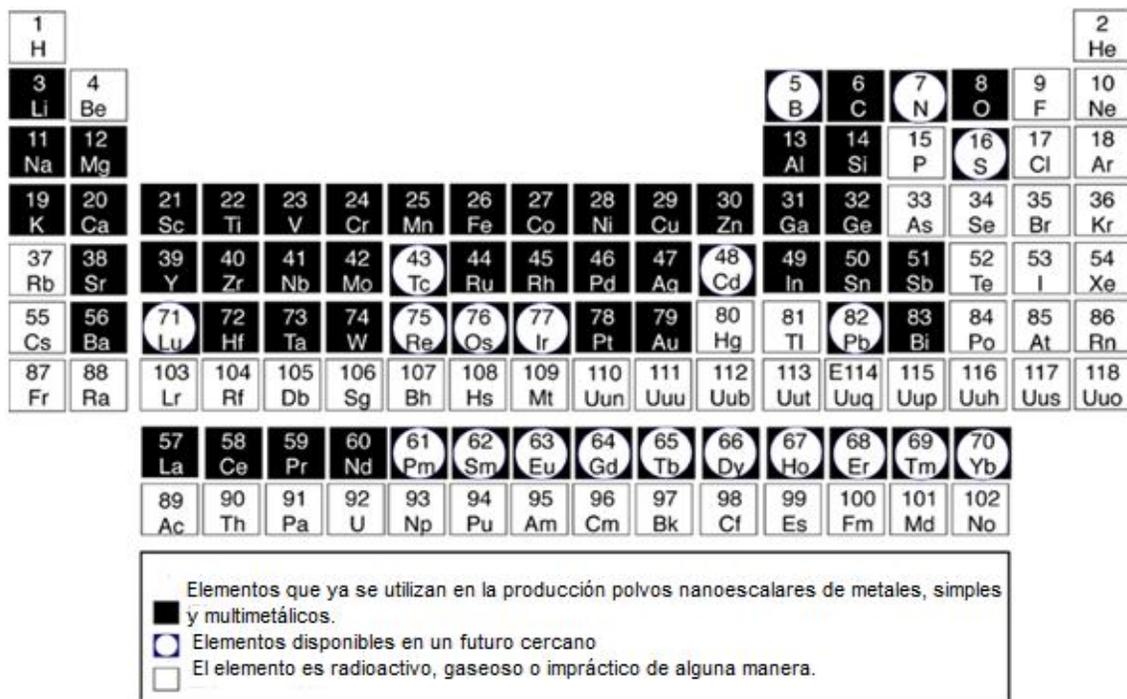


Fig. 1 Elementos comercialmente disponibles como nanopartículas (Composiciones simples y complejas disponibles comercialmente) [Vyvyan, 2003]

La Fundación Nacional de la Ciencia (NSF por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos predice que dentro de diez años toda la industria de los semiconductores y la mitad de la industria farmacéutica dependerán de la nanotecnología, y que para el 2015, el mercado global de nanotecnología será de 1 billón de dólares. [Mihail y Bainbridge, 2001]

La NSF (2001), en el documento "Societal Implications of Nanoscience and Nanotechnology" estima, que en los siguientes 10 a 15 años, el mercado mundial de productos y servicios nanotecnológicos se encontrará por el trillón de dólares anuales. Ejemplos de esta proyección de miles de millones de dólares anuales, incluyen:

i) Manufactura: se estima que los procesos y materiales nanoestructurados incrementen su impacto en el mercado en cerca de 340 mil millones.

ii) Electrónica: la proyección es alrededor de los 300 mil millones para la industria de los semiconductores y la misma cantidad en la venta global de circuitos integrados.

iii) Farmacéutica: cerca de la mitad de toda la producción puede depender de la nanotecnología, superando los 180 mil millones. [Vyvyan, 2003]

iv) Plantas químicas: los catalizadores nanoestructurados con aplicaciones en el petróleo y en los procesos de la industria química; se estima un impacto anual de 100 mil millones.

v) Transportación: los nanomateriales y dispositivos nanoelectrónicos (Ver Fig. 2) producirán vehículos ligeros, rápidos y seguros, y a un menor costo, más durables y confiables carreteras, puentes, autopistas, cañerías y sistemas de rieles; en

donde sólo los productos aeroespaciales tienen un mercado proyectado de cerca de 70 mil millones.

vi) Sustentabilidad: puede mejorar la producción agrícola para una población incrementada, proveerá filtros y desalinización del agua más económicos, posibilitará fuentes de energía renovables, tal como la conversión altamente eficiente de la energía solar; en donde las proyecciones indican que avances en iluminación basados en nanotecnología tienen el potencial para reducir el consumo global de energía en más del 10%, ahorrando 100 mil millones de dólares por año, con una correspondiente reducción de emisión de 200 millones de toneladas de carbón. [Vyvyan, 2003]

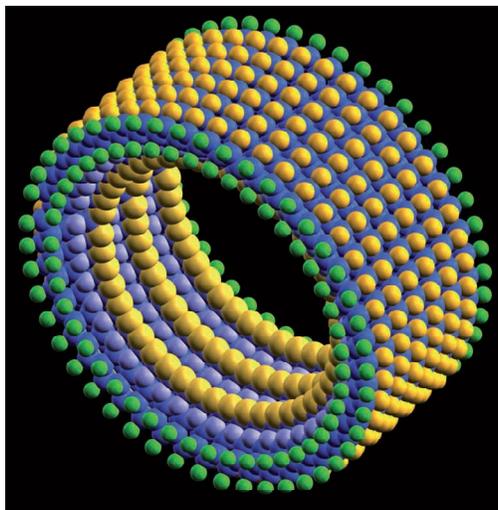


Fig. 2 Modelo por ordenador de una funda de nanoengranaje, un ejemplo de nanotecnología.

[Lang y Nava, 2009]

2. NANOPARTÍCULAS

Una nanopartícula tiene el tamaño de 1-50 nm, y sus propiedades tanto físicas como químicas son diferentes a las que presenta el material en la escala de los centímetros. [Quintana, et al 2008]

Hoy en día las nanopartículas son ampliamente usadas debido a sus propiedades deseables en la industria médica y cosmética. Totsuka, Higuchi y colaboradores en el 2009 manejan que las nanopartículas pueden estar dentro de tres grupos:

- **Clase natural:** por ejemplo son producidas durante incendios forestales o erupciones volcánicas.
- **Clase antropogénica:** son muy a menudo subproductos de actividades industriales como soldadura o pulido, los productos de escape de diesel conocidos también como nanopartículas de combustión.
- **Clase artificial:** incluye la ingeniería nanomaterial, entre estas partículas las derivadas de diesel ya se tienen bien documentadas entre ellos su toxicología en general, su mutagenicidad y carcinogenicidad. [Totsuka, et al 2009]

2.1. Usos de las nanopartículas

El uso de las nanopartículas puede ser importante para:

- Estudio de propiedades ópticas, magnéticas, catalíticas y electrocatalíticas.
- Industria textil (Ver Fig. 3).
- Catalizadores (dispersados y soportados) para baterías, pilas de combustible, electrodos de difusión de gas, etc.
- Materiales cerámicos.
- Pigmentos.
- Aplicaciones médicas y biológicas. [Vyvyan, 2003]



Fig. 3 Ejemplo de aplicación de nanopartículas de plata (25nm) en calcetines producidos por la empresa AgActive [Laboratorios AgActive, 2010]

2.2. Nanopartículas en medicina

Nanomedicina se define como la aplicación de la nanotecnología para lograr avances en la asistencia sanitaria. Aprovechando las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales a escala nanométrica. La Nanomedicina permite la detección temprana, profilaxis, mejoría del diagnóstico, tratamiento y seguimiento de enfermedades. [Chen, et al 2006; Tomellin, et al 2006]

Cada vez hay más inversión en nuevas técnicas para utilizar las nanopartículas y así dirigir los fármacos a los órganos diana. Sin embargo, el problema ha sido que tales partículas son de tamaño similar a los virus y bacterias, y el organismo ha desarrollado mecanismos eficaces para destruirlas. [Tomellin, et al 2006; Varadan, et al 2008]

Un equipo de investigadores de la Universidad de Michigan ha logrado crear el equivalente nanotecnológico del Caballo de Troya, para transportar un tratamiento de quimioterapia muy potente dentro de células de un tumor, aumentando así la capacidad del medicamento para matar las células cancerígenas y reduciendo los efectos secundarios tóxicos. [Pobojewski, 2005]

Romain Quidant, premio Fresnel 2009 reciente, ha presentado su investigación sobre la detección y tratamiento del cáncer por medio de nanopartículas de oro iluminadas con láser. [Suschem, 2010]

El prof. SS Davis de la Universidad de Nottingham estudió microesferas de albúmina desnaturalizada con GM1-monosialogangliósido incorporado, usándolas en fármacos de acción prolongada para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. [Salx. Nano, 2000]

2.3. Nanopartículas de plata

La plata es un elemento químico, que se encuentra en la naturaleza formando parte de distintos minerales (generalmente en forma de sulfuro o como plata libre). La mayor parte de su producción se obtiene como subproducto del tratamiento de las minas de cobre, zinc, plomo y oro. [González, 2010]

La plata ha sido históricamente utilizada para eliminar bacterias y evitar los efectos derivados de las mismas, ya sea la putrefacción de alimentos (conocido ya en la antigua Grecia), la infección de heridas, o el olor proveniente de la transpiración. [Proyecto Nano-SME, 2010]

La plata en forma de nanopartículas tiene gran utilidad en prevención y tratamiento de quemaduras y úlceras. [Villegas, 2010] Las nanopartículas de plata son de color amarillo en un nanotamaño, y al estar en forma de nanopartículas presentan cambios fisicoquímicos que muestran un mayor efecto antibacterial. [Kyungeun, et al 2008]

Entre los 580 productos basados en la nanotecnología, el material más comúnmente mencionado en la descripción del producto son las nanopartículas de plata. [Hyuck, et al 2009]

Por su actividad antimicrobiana se ha incorporado su uso generalizado en productos de consumo, tales como desinfectantes, desodorantes, aerosoles, polvos de antimicrobianos, camas, lavadoras, purificación de agua, pasta dental, champú, enjuague, chupones, biberones, telas, filtros, utensilios de cocina; entre otros. [Hyuck, et al 2009; Global information, 2007; Maynard y Michelson, 2007]

José Yacamán, investigador de la Universidad de Texas, analizó el uso de nanopartículas de plata para el tratamiento de VIH-Sida, las cuales pueden “apagar” el virus. Encontró que estas nanopartículas atacan al virus en sitios específicos, y se pegan a la proteína gp120, que es esencial para el acoplamiento con el exterior de ciertas células previo a su invasión. [Torres. Crónica, 2009]

La compañía Blue Cross Bio-Medical ofrece un condón hecho de espuma con nanopartículas de plata, funcionando tanto como un espermicida así como un lubricante antiséptico que ayuda a prevenir enfermedades de transmisión sexual. [Blue Cross, 2010]

Los laboratorios Argenol ha elaborado productos a base de nanopartículas de plata teniendo en el mercado productos como vendajes bactericidas y apósitos de plata útiles para quemaduras, productos de higiene femenina y cremas. [Laboratorios Argenol, 2010]

La compañía Samsung, creó aparatos electrodomésticos que emiten nanopartículas de plata llamados silvercare lavadoras dando como resultado ropa limpia y libre de bacterias. [Samsung, 2010]

Villegas en el 2010, estudió nanopartículas de plata en fase almidón (ver Fig. 4), aplicándolas como antiherpético en ratones y encontró que tienen un efecto terapéutico al observar que la carga viral disminuía. [Villegas, 2010]

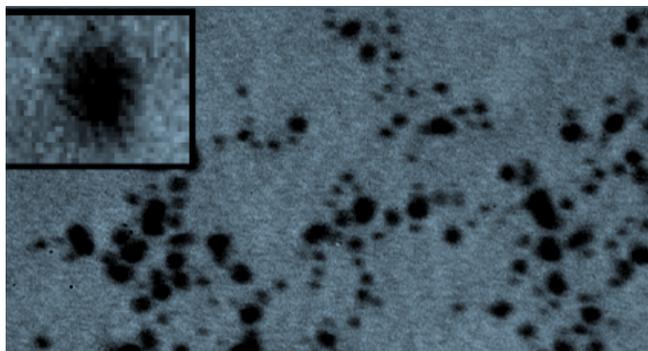


Fig. 4 Nanopartículas de plata usadas como antiherpético [Villegas, 2010]

3. NANOPARTÍCULAS Y TOXICIDAD

La Nanotoxicología es un campo de investigación emergente en la intersección de la ciencia de materiales, la medicina y toxicología. [Bastian, et al 2003] El hombre y el medio ambiente siempre han estado expuestos a nanopartículas, ya que éstas se producen de forma natural durante las erupciones volcánicas, incendios forestales, etc. [Gutiérrez, et al 2009]

El desarrollo de la nanotecnología se convertirá probablemente en una nueva fuente de inhalación, ingestión, absorción cutánea e inyección de nanopartículas artificiales. [Foladori e Invernizzi, 2008] Sin embargo, a pesar de esta mayor exposición a nanopartículas, hay poca información disponible sobre la toxicidad de las nanopartículas hacia los animales, incluso los seres humanos. [Kyungeun, et al 2008]

La característica fundamental de los nanomateriales es su tamaño, que puede modificar sus propiedades fisicoquímicas, permitiendo una mayor absorción e interacción con los tejidos biológicos, y generar efectos biológicos adversos en las células que no sería posible con el mismo material en forma soluble. [Bastian, et al 2003]

Generalmente, entre más pequeñas sean las partículas, son más reactivas y su efecto es más tóxico. [Colvin, 2003]

La mayoría de los datos de toxicología de nanomateriales artificiales se derivan de los estudios de inhalación concentrándose en la lesión pulmonar y la evaluación de los parámetros inflamatorios. [Limbach, et al 2007]

El desarrollo de la nanotecnología, no obstante, tiene que ir acompañado de estudios que permitan conocer los efectos que estas nanopartículas van a tener tanto en el hombre como en el medio ambiente. [Gutiérrez-Praena, et al 2009]

3.1. Vías de exposición a las nanopartículas

La exposición humana a nanopartículas puede tener lugar a través del agua, el aire y los alimentos, entre otros, por lo que las vías oral, respiratoria y dérmica son las más relevantes. [Lang y Navas, 2009]

Piel. Estudios realizados por Tincke y colaboradores en el 2003 han demostrado que las partículas de más de un μm de diámetro pueden llegar tan profundo en la piel que las absorba el sistema linfático, mientras que a las nanopartículas más grandes no. La implicación es que las partículas ultrafinas pueden y serán asimiladas en el cuerpo a través de la piel. [Vyvyan, 2003] Más estudios realizados, encontraron que se pueden absorber a través de la piel, encontrándose que algunas de ellas (TiO_2 esferas de poliestireno) no pueden atravesar el estrato córneo, aunque en algunos casos se ha observado acumulación en los folículos pilosos. [Gutiérrez, et al 2009]

Oral. La exposición oral a nanopartículas también puede ser una ruta relevante tanto a nivel ocupacional como ambiental resultante de la ingestión de comida y agua contaminada, la deglución de las partículas inhaladas o su transferencia mano-boca. [Gutiérrez, et al 2009]

Respiratoria. En el aire no sólo existen nanopartículas manufacturadas sino también de origen natural o derivadas de actividades antropogénicas. El hombre, por ende, está expuesto simultáneamente a una variedad de materiales que tienen distinto tamaño, tanto partículas individuales o agregadas. [Gutiérrez, et al 2009] Existe evidencia considerable que muestra que las partículas ultrafinas inhaladas pueden tener acceso al torrente sanguíneo y por lo tanto ser distribuidas hacia otros órganos en el cuerpo. [Vyvyan, 2003]

La exposición primaria a las nanopartículas puede producirse a través de los pulmones, de la piel o del intestino, pero su desplazamiento hacia otros órganos puede hacer que actúen distintos mecanismos de toxicidad según el órgano de destino. [Lang y Navas, 2009]

3.2. Depósito en órganos

El **pulmón** es un punto de entrada de las nanopartículas por lo que es necesario conocer los mecanismos por los cuales actúan las NP, se ha propuesto que los radicales libres o la actividad oxidativa de las NP han resultado ser un factor predominante en la capacidad de producir inflamación pulmonar, [Lang y Navas, 2009; Renwick, 2004] además de que las características de las NP, como el área y la reactividad de su superficie, son los parámetros en los que se basa el estrés oxidativo para provocar inflamación pulmonar. [Duffin, et al 2008]

Por lo que respecta a las partículas que viajan en la sangre, las células fagocíticas de Kupffer siguen siendo un sistema de limpieza esencial, con el consiguiente potencial de acumulación en el **hígado** siendo sensible al estrés oxidativo, y se ha observado que las células de hígado de rata tratadas con diversas NP sufren estrés oxidativo y lesiones. [Lang y Navas, 2009; Hussain, et al 2005]

El **riñón** recibe el 20% del flujo sanguíneo que sale del corazón. Cuando las partículas entran en la sangre se recibe una dosis elevada cuando se compara con los otros órganos. [Lang y Navas, 2009]

3.3. Genética toxicológica

3.3.1. Definición

Disciplina científica que identifica y analiza la acción de grupos de agentes tóxicos que son capaces de interactuar con el material genético de los organismos. Su objetivo principal es investigar las bases moleculares de la respuesta al daño celular. [Horvathová, 2008]

3.3.2. Aplicaciones

Establece la correlación que existe entre la exposición de agentes xenobióticos y la inducción de alteraciones genéticas tanto en células germinales como en células somáticas de los organismos.

Una importante aplicación de la genética toxicológica es la biomonitorización de poblaciones en riesgo. [Guachalla y Ascarrunz, 2003]

3.3.3. Genotoxicidad

Capacidad de algunos elementos (físicos, químicos o biológicos) de producir alteración en el material genético por cambios en el ADN o en las estructuras intracelulares vinculadas al funcionamiento o propiedades de los cromosomas.

[Fairbairn, et al 1995]

Las pruebas de genotoxicidad pueden predecir:

- ✓ La probabilidad de que una sustancia sea un carcinógeno.
- ✓ El mecanismo de la actividad cancerígena de diferentes sustancias.

[Horvathová, 2008; Guachalla y Ascarrunz, 2003]

3.3.4. Pruebas de genotoxicidad

→ 3.3.4a. Ensayo cometa

Método sensible y rápido para la detección de ruptura-cadena de ADN en las células individuales. [Fairbairn, et al 1995] Su uso se ha incrementado en diferentes áreas, aplicaciones clínicas, biología de la radiación, toxicología genética, ecotoxicología y principalmente en el área de toxicología ambiental, puede evaluarse tanto *in vivo* como *in vitro*. [Cotelle y Ferard, 1999; Darragh, et al 2009]

→ 3.3.4b. ICH (Intercambio de Cromátides Hermanas)

Son intercambios de segmentos simétricos y equivalentes entre las cromátides de un mismo cromosoma, se basa en la tinción diferencial con 5-Bromo-desoxiuridina permitiendo identificar los ciclos de replicación de las células en metafase y las variaciones que presentan en circunstancias ambientales. [Hernández, M., 1999]

→ 3.3.4c. Micronúcleos ver página # 22

3.3.5. Mecanismos de daño al ADN por nanopartículas.

Si los nanomateriales son capaces de entrar en el cuerpo a través de la piel, boca y nariz, hay una serie de mecanismos directos e indirectos que, posteriormente, pueden promover el daño del ADN. Los nanomateriales pueden ser capaces de penetrar en la célula a través de una serie de mecanismos como difusión pasiva y endocitosis. (Ver Fig. 5) [Sing, et al 2009; Aillon, et al 2009]

El daño al ADN puede surgir a través de mecanismos indirectos donde las nanopartículas no se relacionan físicamente con la molécula de ADN, pero sí con otras proteínas celulares, como las involucradas en el proceso de división celular; además, pueden inducir a otras respuestas celulares que conducen a su vez a la

genotoxicidad, como: el estrés oxidativo, la inflamación (Ver Fig. 6) y respuestas erróneas de señalización. [Sing, et al 2009; Aillon, et al 2009]

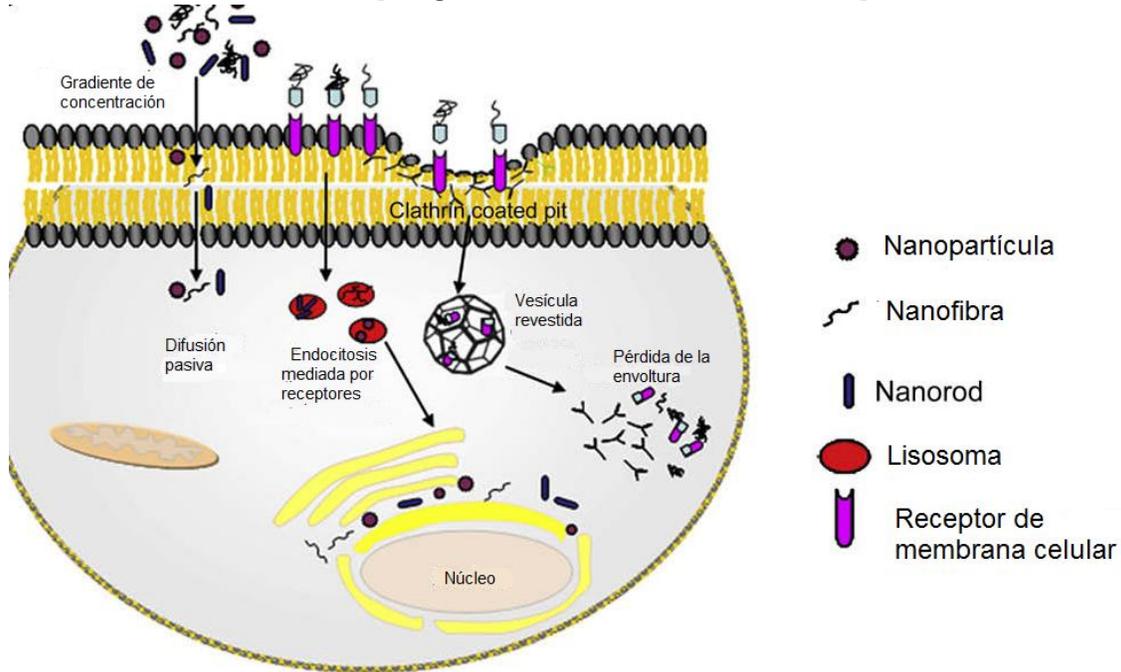


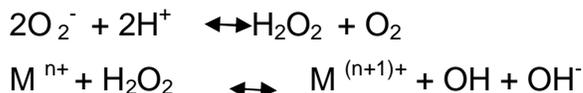
Fig. 5. Esquema para ilustrar los posibles mecanismos de captación de las nanopartículas incluyendo la difusión pasiva y la endocitosis. [Singh, et al 2009]

→ 3.3.5a. Estrés oxidativo

Se refiere a un desbalance redox en las células por lo general como resultado de aumento de especies reactivas del oxígeno intracelular (ROS) y la disminución de antioxidantes. ROS son moléculas altamente reactivas que pueden perturbar la homeostasis del medio intracelular al reaccionar desfavorablemente con macromoléculas celulares como el ADN, las proteínas y los lípidos.

Las especies reactivas del oxígeno se definen como primaria o secundaria. ROS primaria (por ejemplo, el superóxido, O_2^-) se puede generar a través de procesos metabólicos o mediante la activación de oxígeno, la formación de una molécula reactiva nucleofílica del anión superóxido de oxígeno puede interactuar con otras moléculas tales como los metales de transición redox

activos (por ejemplo, hierro) o enzimas que resulta en la producción de ROS secundaria (por ejemplo, OH radical), que son los mediadores del daño al ADN. Llevando a cabo la siguiente reacción: [Singh, et al 2009]



→ **3.3.5b. Inflamación**

Es un proceso fisiológico en respuesta a una lesión tisular y es mediada por células inflamatorias que segregan una gran variedad de factores solubles, como citocinas (por ejemplo, las interleucinas) y factor de necrosis tumoral (TNF). Aunque estos factores son importantes para la protección contra infecciones y/o lesión de los tejidos, también pueden promover el daño en el ADN en forma de fragmentación de los cromosomas, mutaciones puntuales y la formación de aductos de ADN, además, inhibir la reparación del ADN e inducir patrones de metilación aberrante que lleva a modificar los perfiles de expresión génica. [Singh, et al 2009; Aillon et al 2009]

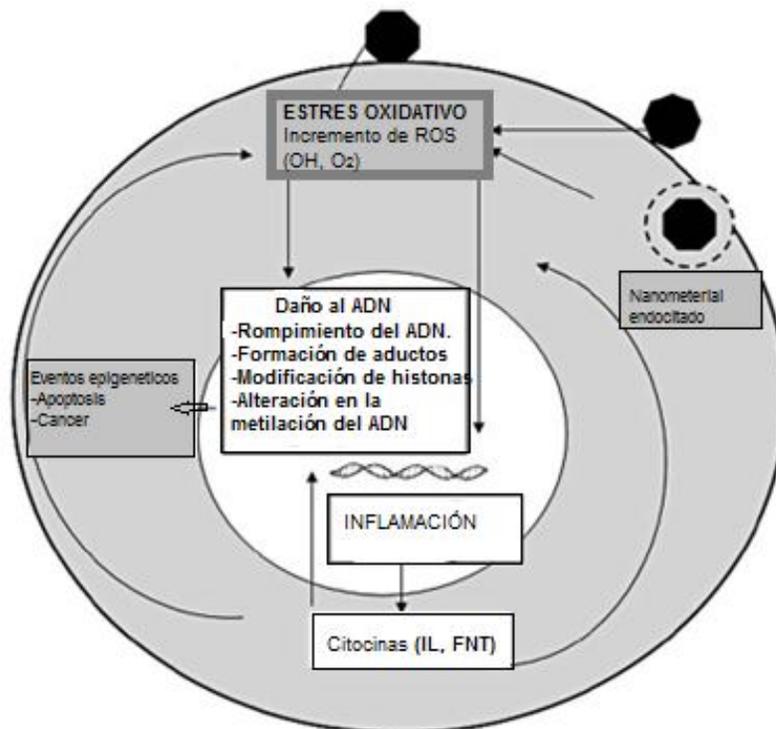


Fig. 6. Mecanismos indirectos que pueden conducir a la genotoxicidad. Las NP pueden producir estrés oxidativo, respuesta inflamatoria que a su vez tienen el potencial de daño en el ADN. [Singh, et al 2009]

AshaRani y colaboradores (2009) realizaron un estudio de citotoxicidad y genotoxicidad en nanopartículas de plata y proponen un posible mecanismo que implica la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial llevando a la producción de ROS e interrupción de la síntesis de ATP. [AshaRani, et al 2009]

4. MICRONÚCLEOS

4.1. Definición

Los micronúcleos son fragmentos intracitoplasmáticos de cromatina que se encuentran separados del núcleo principal y que se forman a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos acéntricos o bien por aquellos cromosomas que sufren rezago anafásico, lo cual traduce en la aparición de un pequeño núcleo en células anucleadas como los eritrocitos o bien en el citoplasma de células nucleadas como linfocitos o espermatogonias. [Domínguez, 2005]

4.2. Historia de micronúcleos

La existencia de micronúcleos ya ha sido reconocida durante muchos años, su asociación con daño cromosómico fue estudiada en trabajos del campo de la radiación en donde se menciona su frecuencia. [Miller, 1973]

En 1959, Evans usó la frecuencia de micronúcleos como marcador de daño genético inducido por neutrones rápidos y rayos gamma con presencia y ausencia de oxígeno; encontrando fragmentos acéntricos en mitosis que eran excluidos de su núcleo principal, entre 1966 y 1970 Schroeder recomendó el uso de frotis de médula ósea para detectar daño *in vivo* de mutágenos químicos, demostrando la presencia de micronúcleos en las células de dicha médula en relación con daño citogenético. [Medina, 1998]

Aproximadamente a principios de 1970, Schmid y Heddle iniciaron estudios para determinar que parámetros podían servir como los más útiles indicadores de daño

citogenético en la médula ósea *in vivo*. Este trabajo condujo a la conclusión de que la incidencia de EPC micronucleados era particularmente un índice de daño citogenético de médula ósea *in vivo*. [Medina, 1998; Schmid, 1975]

En el año de 1980 MacGregor y colaboradores, realizaron experimentos para observar la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de roedores y probar que ésta podría ser utilizada como un indicador de daño citogenético en eritroblastos, demostrando que la incidencia de MN en sangre periférica es igual que la observada en médula ósea. [Calderón y Ramírez, 1992]

Más tarde, en 1985, el ensayo fue mejorado por Fenech y Morley, consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: cytokinesis-block micronucleus) cuyo fundamento es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B la cual impide la citocinesis celular. Esta técnica ha sido reconocida a nivel mundial como un biomarcador efectivo de daño al ADN. [Zalacain, et al 2005]

4.3. Fundamento de la técnica

La prueba se basa en la formación de "micronúcleos" (Ver Fig. 7) material de cromatina que, por la ruptura de cromosomas o rezago anafásico, no migran hacia los polos opuestos celulares durante la anafase y no se incorporan en el núcleo durante la telofase, permaneciendo en el citoplasma y formando un pequeño núcleo que puede ser bien distinguido. [Miller, 1973]

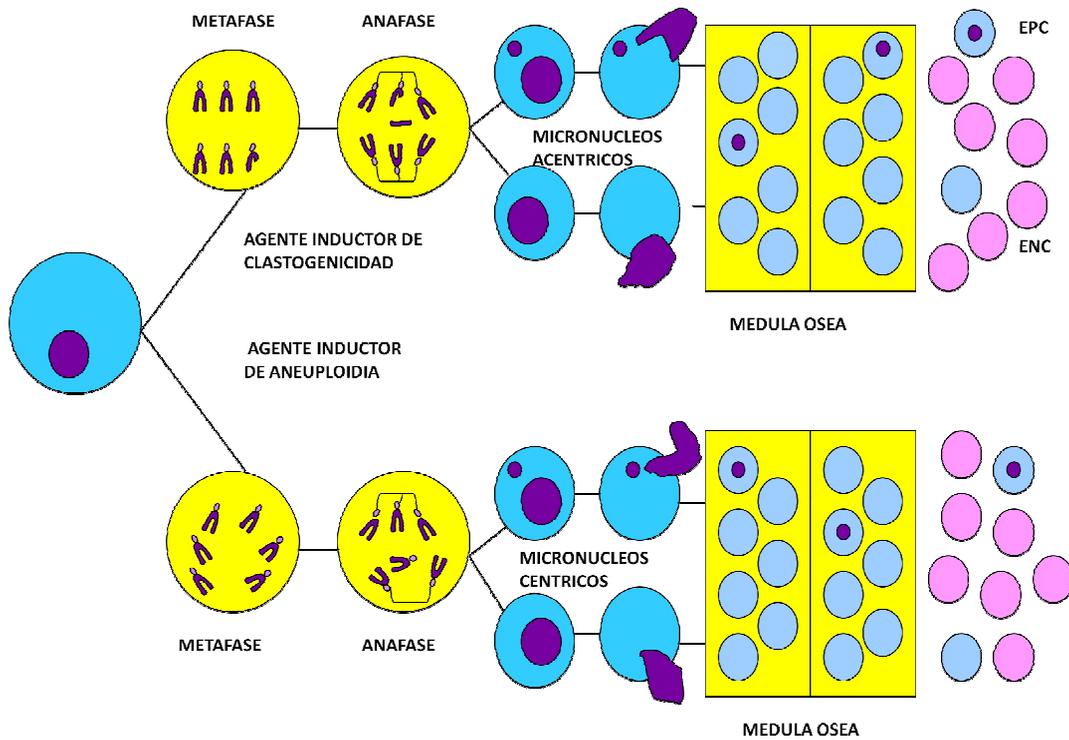


Fig. 7. Mecanismo de formación de micronúcleos. [Dominguez, 2005]

4.4. Tipos de ensayo

Esta prueba se puede realizar en una gran variedad de células tanto:

- ✓ **in vivo** como médula ósea, sangre periférica y células fetales de hígado.
- ✓ **in vitro** utilizando células tanto de animales como humanas por ejemplo, se ha reportado esta prueba en hepatocitos de rata, en células de hámster chino V79 e incluso linfocitos humanos y queratinocitos. [Hernández C., 1996]

4.5. Ventajas *in vivo*

Su uso proviene de ventajas principales como:

- ✓ Velocidad de análisis.
- ✓ Simplicidad.
- ✓ Los micronúcleos pueden ser observados durante todo el ciclo celular.
- ✓ El número de células contables es relativamente ilimitado.
- ✓ Los micronúcleos son fácilmente reconocibles.
- ✓ No se requiere de otro agente químico más que el que está bajo la prueba.
- ✓ Con una pequeña gota de sangre periférica proporciona miles de células contables.
- ✓ Se pueden obtener muestras repetidas fácilmente de un mismo animal.
- ✓ Solo se requiere de un frotis sanguíneo. [Schmid, 1975; Hernández C., 1996]

4.6. Estudio agudo

Se realiza mediante la administración de la sustancia de prueba en una sola ocasión, extrayendo muestra ya sea de médula ósea o sangre periférica. [Domínguez, 2005]

El estudio agudo se monitorea por la presencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos debido a que éstas son células expuestas al compuesto de estudio además de que son células jóvenes recientemente liberadas a la circulación teniendo una coloración mezclada de basofilia y eosinofilia por lo que presentan un tinte azulado violáceo, proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización del protoplasma sea completa. [Domínguez, 2005]

La coloración azulada de los EPC se debe a la presencia de RNA en el momento de su diapedesis hacia circulación y por la falta del contenido final de hemoglobina, por lo que aún conservan parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y constituir de ésta manera una célula madura. [Hernández C, 1996]

De acuerdo a Mac Gregor 1980, el tiempo de vida de un eritrocito en ratón es de 30 días y considera que el ciclo celular es de 10 a 20 horas. El lapso que transcurre de la división a la enucleación es de 6 horas y el tiempo de los EPC en médula ósea es de 24 horas. [Hernández C., 1996]

4.7. Estudio subcrónico

Se realiza mediante la administración de la sustancia de prueba en varias dosis durante un determinado tiempo, extrayendo la muestra. [Domínguez, 2005]

Los eritrocitos a analizar son tanto los EPCMN como ENCMN, ya que después de un tiempo los EPC se convierten en ENC en un tiempo aproximado de 1 a 2 días, siendo un buen indicador para un ensayo subcrónico.

4.8. Eritropoyesis

En el roedor adulto, la médula ósea y el bazo son órganos hemapoyéticos, en donde la célula madre constituye la base de la eritropoyesis en la maduración y proliferación.

Durante la proliferación, las células continúan dividiéndose y si en ese momento se administra un agente de ensayo, puede actuar y causar daño a los cromosomas. Estas anomalías (un fragmento o un cromosoma entero) pueden quedarse atrás durante la división celular e integrarse a las células hijas; eventualmente se forman micronúcleos que se pueden ver en el citoplasma. Durante la maduración, cuando un eritroblasto se transforma en eritrocito policromático (EPC, eritrocitos jóvenes, contiene RNA, es basófilo y presentan manchas de color azul claro o azul grisáceo con Giemsa), el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo que se ha formado puede permanecer en el citoplasma.

Se facilita la visualización de micronúcleos en estas células porque carecen de un núcleo principal. Un aumento en la frecuencia de EPC micronucleados (EPCMN) en los animales tratados con un agente de prueba es un indicio de daño

cromosómico inducido. Los EPC con el tiempo, pierden el RNA, contienen principalmente hemoglobina y se convierten en eritrocitos normocrómicos (ENC, eritrocitos maduros [glóbulos rojos], más pequeño que un EPC, acidófilas, de color naranja claro o naranja-rosado con Giemsa). Estos dos tipos de eritrocitos, que se tiñen diferencialmente, se pueden ver en la médula ósea, el bazo y en los compartimentos de la sangre. (Ver Fig. 8)

En el ensayo de micronúcleos, la relación EPC/ENC entre los animales de experimentación tratados con agentes y los animales controles, proporcionan un índice de citotoxicidad. Durante las etapas posteriores de la maduración, estas células se mueven al compartimiento de la sangre periférica. El ensayo de micronúcleos está diseñado principalmente para evaluar la capacidad de los agentes de pruebas para inducir lesiones cromosómicas. [Gopala y Makoto, 2000; Cuenllas, 1992]

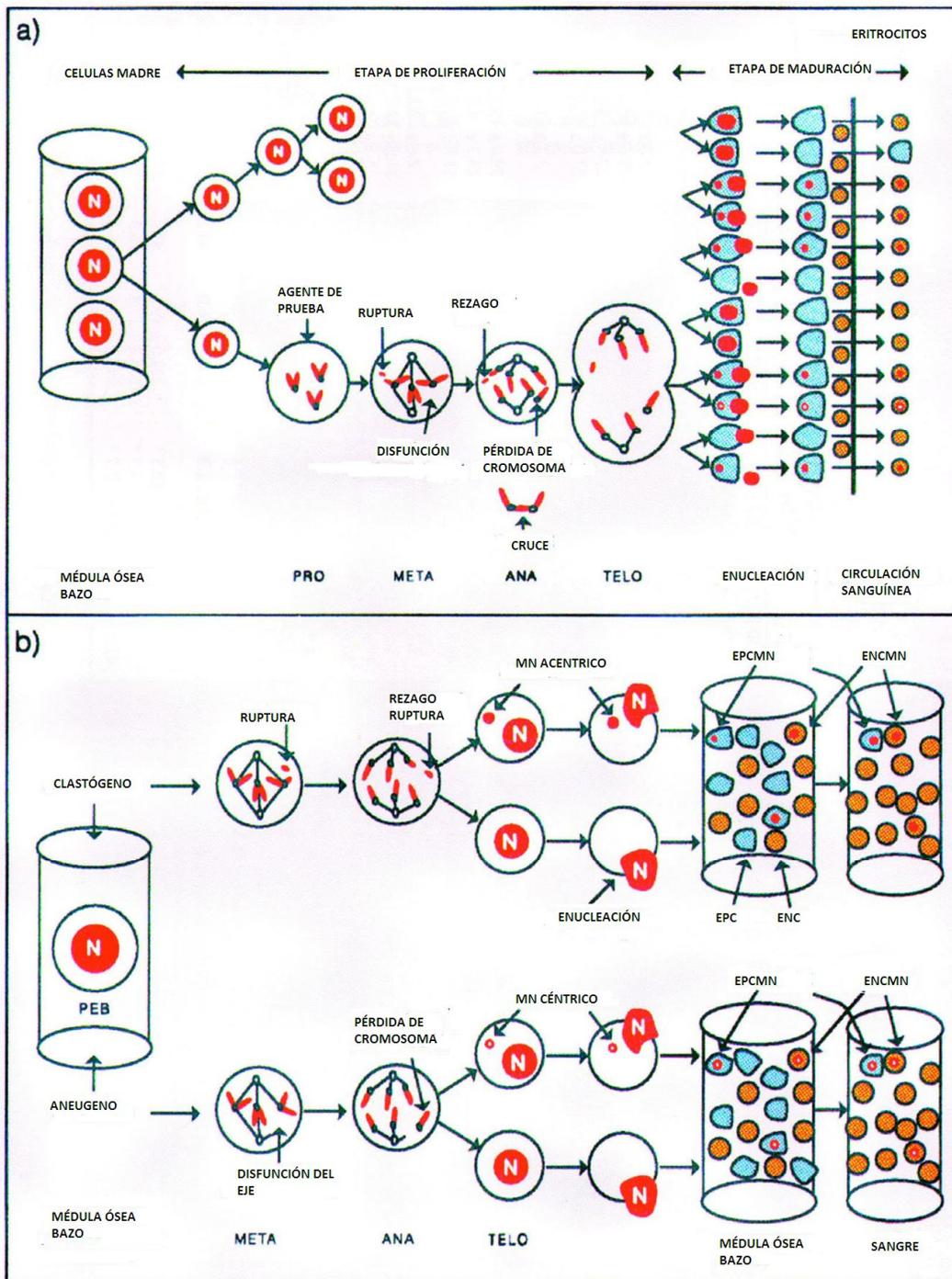


Fig. 8. (a) Proceso de eritropoyesis *in vivo*, b) mecanismo de formación de micronúcleos. [Gopala y Makoto, 2000]

5. JUSTIFICACIÓN

El uso de la nanotecnología hoy en día se ha desarrollado en áreas como la óptica, electrónica, medicina, industria farmacéutica y limpieza; por lo que existe la preocupación de la interacción de las nanopartículas con el hombre y sus efectos en el medio ambiente. Desconociéndose el riesgo de las nanopartículas y por ende los problemas de salud que puedan traer en el personal que trabaja en la fabricación de estos materiales, así como para los consumidores de los productos. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, han manifestado la necesidad de realizar investigaciones sobre los riesgos que representa para la salud humana la exposición proveniente de nanomateriales producidos con técnicas de ingeniería comercial, así como los riesgos que acarrea para los consumidores el uso de productos que contienen nanopartículas.

Por lo anterior en el presente trabajo se pretende estudiar si las nanopartículas de plata en fase almidón podrían tener un efecto citotóxico y/o genotóxico mediante la técnica de micronúcleos a partir de un ensayo agudo y subcrónico en un modelo de ratón CD1.

6. HIPÓTESIS

Sí las nanopartículas de plata en fase almidón son genotóxicas y/o citotóxicas, entonces se verá reflejado en un aumento en la frecuencia de MN en EPC y ENC, así mismo, se alterará el índice de EPC/ENC.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de nanopartículas de plata en fase almidón administradas por vía subcutánea e intraperitoneal en ratones CD1, mediante la técnica de micronúcleos en sangre periférica, para apoyar su posible uso terapéutico.

7.2. Objetivos particulares

- ✓ Determinar la actividad genotóxica y citotóxica de las nanopartículas de plata en fase almidón en un ensayo agudo mediante la frecuencia de EPCMN en ratones CD1 y el índice de EPC/ENC respectivamente.
- ✓ Determinar la actividad genotóxica mediante la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados a diferentes diluciones de las nanopartículas de plata en fase almidón en un ensayo subcrónico y determinar así mismo, la actividad citotóxica por medio del índice de EPC/ENC.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Material biológico

Se trabajó con ratones machos jóvenes cepa CD1 de un peso aproximado de 20-25 g, provenientes del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

8.2. Cristalería y equipo

- Cajas para ratones.
- Bebederos.
- Alimento para ratones.
- Portaobjetos.
- Gasas.
- Marcadores.
- Balanza para animales.
- Jeringas.
- Tijeras.
- Vasos copplin.
- Papel.
- pHmetro.
- Pinzas.
- Microscopio.
- Vaso de precipitado.

8.3. Reactivos

- AgNP:
- Solución A: concentrada 0.01M.
- Solución B: 1:5.
- Solución C: 1:25.
- Almidón (Vehículo Solución D).
- Agua Destilada.
- Alcohol etílico [70%].
- Giemsa.
- Metanol absoluto.
- Buffer de fosfatos (pH 6.8).
- Violeta de genciana.

8.4. Preparación de nanopartículas

Las nanopartículas de plata empleadas para esta investigación fueron sintetizadas y caracterizadas en CICATA Legaria del IPN a cargo del Dr. Eduardo San Martín. Las características estructurales de las nanopartículas de plata son esféricas con un tamaño que va de 3 hasta 5 nm, a una concentración de AgNO_3 de 0.01M.

8.5. Distribución y administración de AgNP

Los ratones fueron pesados inicialmente y distribuidos homogéneamente de acuerdo al método de la "culebra japonesa". Este método distribuye los pesos en orden ascendente y se van haciendo lotes de cinco y cuatro de izquierda a derecha y regresa de derecha a izquierda para una distribución homogénea.

En el ensayo agudo se administró por vía intraperitoneal al lote I 250 μ L de AgNP (Solución A) y al lote II 250 μ L de solución de almidón (Solución D).

En el ensayo subcrónico se administró por vía subcutánea 50 μ L como a continuación se indica:

Lote III Solución A (AgNP concentrada 0.01M).

Lote IV Solución B (AgNP diluida 1:5).

Lote V Solución C (AgNP diluida 1:25).

Lote VI Solución D (Almidón).

8.6. Toma de muestra

Se realizó un corte en la cola del ratón, se obtuvo una gota de sangre periférica y se colocó en el portaobjetos, posteriormente se llevó a cabo la extensión de la gota con la ayuda de otro portaobjetos en un ángulo de 45°; en el ensayo agudo se hizo a las 0 hrs, 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs, mientras que para el ensayo subcrónico la muestra se tomó al día 0, 2, 4, 6, 8, 10, tanto para los lotes de experimentación como para el lote control negativo.

8.7. Fijación de laminillas

Las laminillas se fijaron en metanol absoluto durante 3 minutos y se dejaron secar al aire libre.

8.8. Tinción con Giemsa

Las laminillas se sumergieron en el colorante Giemsa aproximadamente 12-15 minutos. El tiempo varía de acuerdo al grosor del frotis.

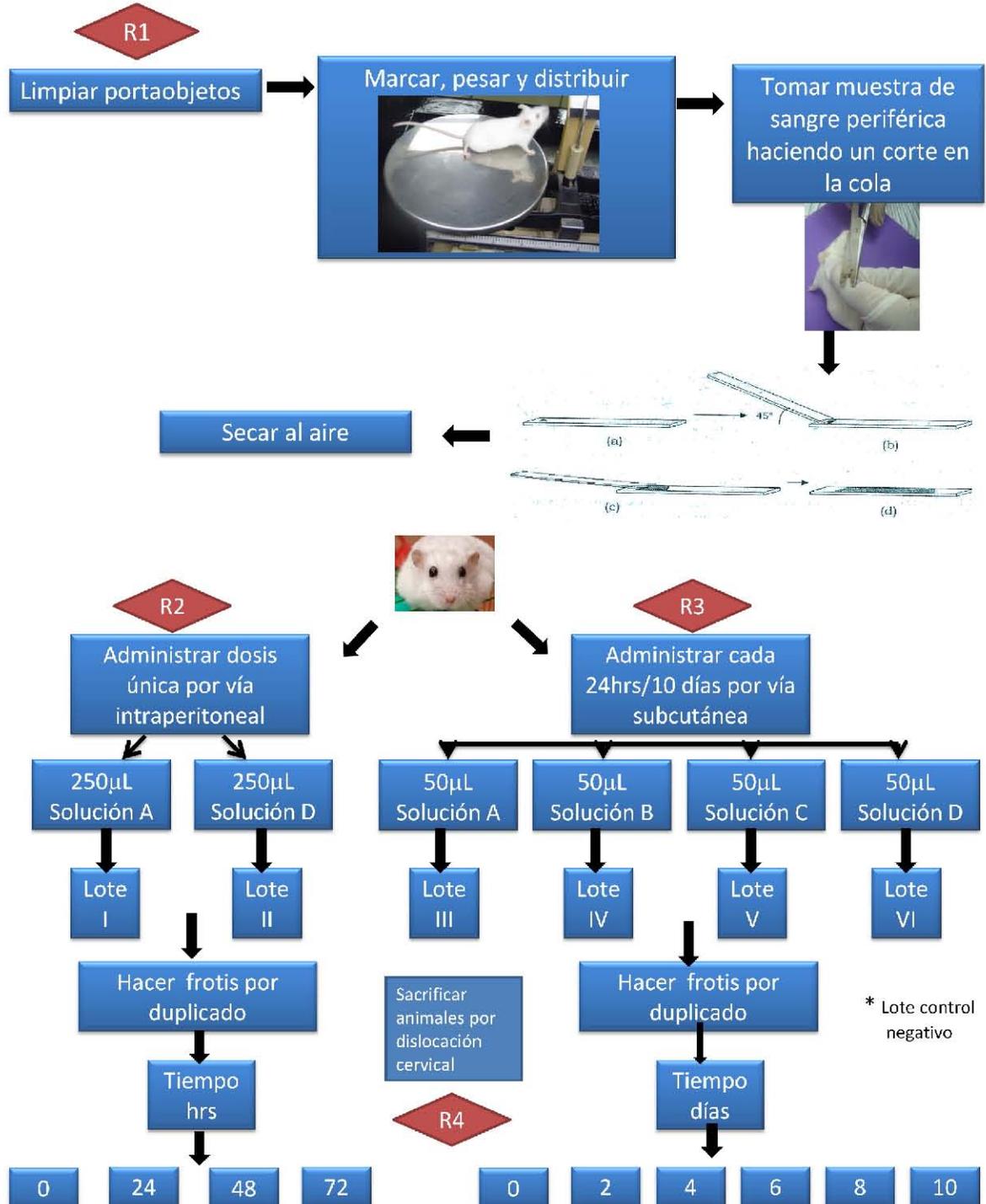
8.9. Observación al microscopio

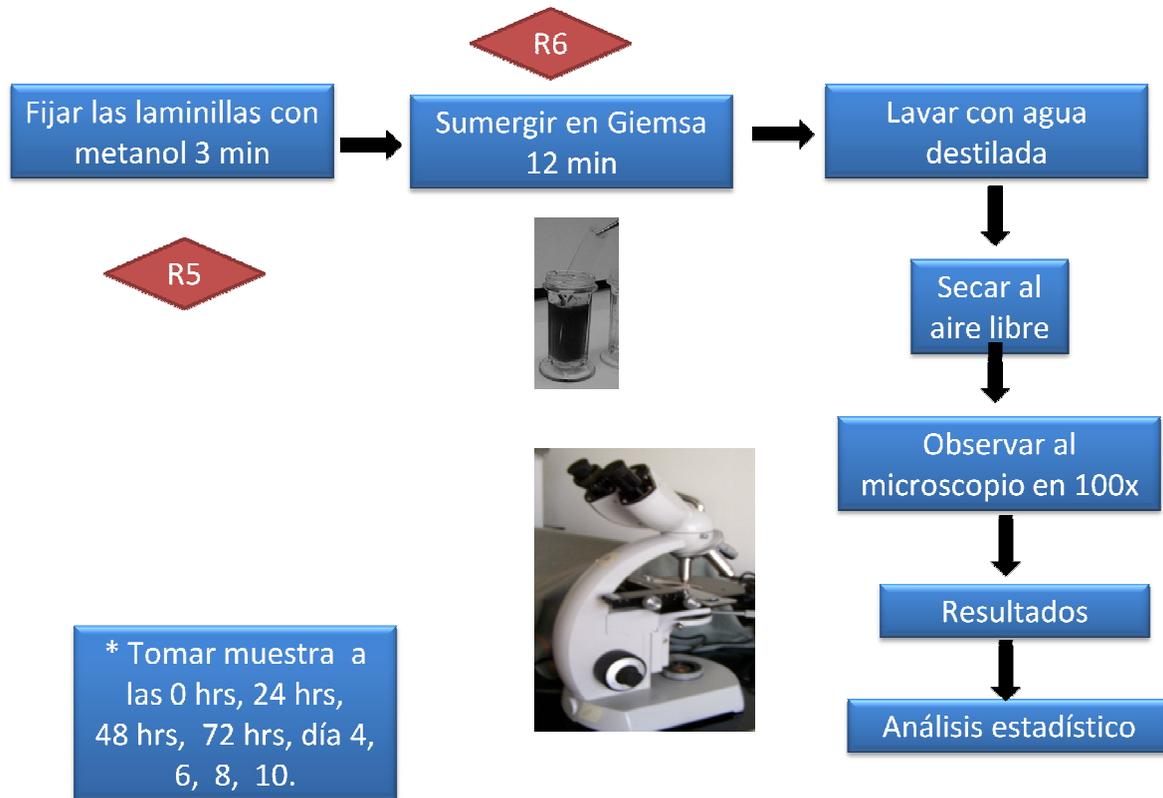
Se utilizó un microscopio marca Zeigen modelo ZB-6000 y con el objetivo de inmersión, se contaron a ciegas 1000 eritrocitos normocrómicos (ENC) y 1000 eritrocitos policromáticos (EPC), así mismo, se observaron los micronúcleos para obtener el índice de genotoxicidad (EPCMN/EPC) e índice de citotoxicidad (EPC/ENC).

8.9.1. Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad instant, con análisis de varianza y la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL





Disposición de residuos

R₁ Las gasas al no contener un residuo peligroso se desecharon en la basura común.

R₂ y R₃ La aguja se colocó en el contenedor rojo RPBI de acuerdo a la Norma oficial mexicana 087. NOM-087-ECOL-SSA1-2001-RPBI.

R₄ Los cadáveres se envolvieron en papel periódico, se colocaron en bolsas amarillas para después incinerarlas.

R₅ Se desechó en contenedor de residuos para metanol indicando su peligrosidad.

R₆ Se desechó en contenedor de residuos para colorante Giemsa indicando sus propiedades.

10. RESULTADOS

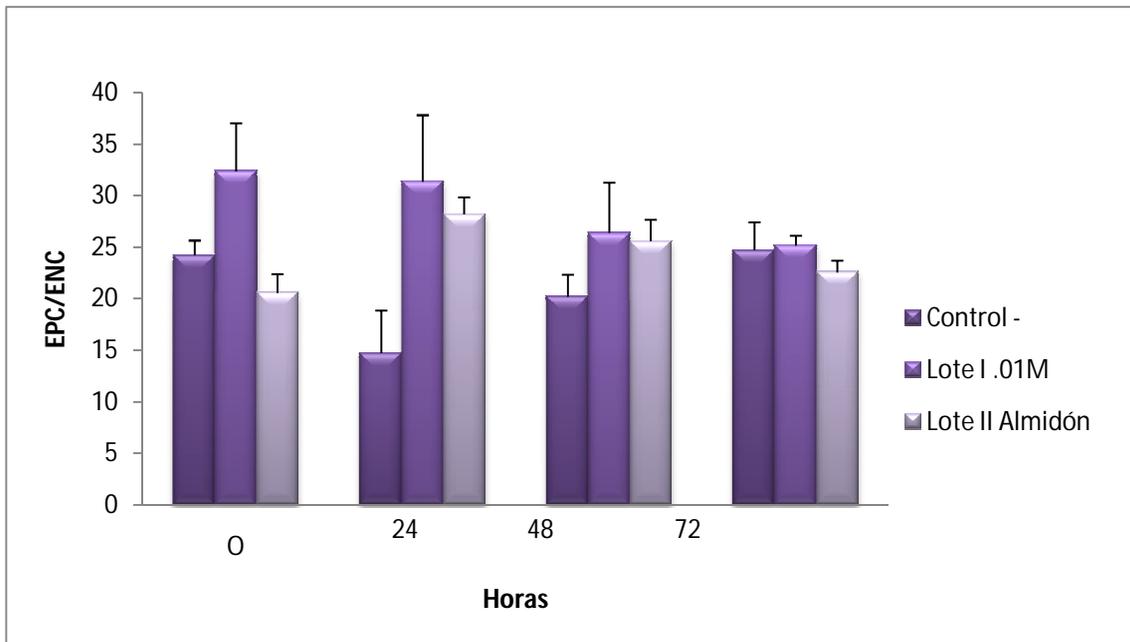
En la tabla 1 y gráfica 1 se muestran los resultados de la frecuencia de EPC en 1000 ENC en sangre periférica de ratón estudiando nanopartículas de plata en fase almidón que corresponde al lote I con una concentración de 0.01M, mientras al lote II se le administró sólo almidón como vehículo.

En el tiempo 0 el lote control negativo y los lotes experimentales se comportaron en un rango de 20.6 a 32.4 de EPC sin presentar alguna diferencia estadísticamente significativa, lo cual indica que los lotes se encontraban en condiciones iguales.

A las 24 hrs, el único lote que disminuyó su índice de EPC/ENC fue el control negativo. A las 48 y 72 hrs todos los lotes se comportaron de manera homogénea.

Tabla 1. Frecuencia de EPC en 1000 ENC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo agudo. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010)

Lote	Media +/- Desviación Estándar	Error estándar
Control (-) 0hrs	24.25 +/- 2.87	1.43
Control (-) 24hrs	14.75 +/- 8.26	4.13
Control (-) 48hrs	20.25 +/- 4.19	2.09
Control (-) 72hrs	24.75 +/- 5.43	2.72
LI 0hrs	32.40 +/- 10.40	4.65
LI 24hrs	31.40 +/- 14.41	6.44
LI 48hrs	26.40 +/- 10.90	4.87
LI 72hrs	25.20 +/- 2.16	0.96
LII 0hrs	20.60 +/- 4.03	1.80
LII 24hrs	28.20 +/- 3.70	1.65
LII 48hrs	25.60 +/- 4.72	2.12
LII 72hrs	22.60 +/- 2.51	1.12



Gráfica 1. Relación de EPC/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio agudo de las nanopartículas de plata en fase almidón. Las barras representan el promedio de EPC/ENC de 5 animales tratados y las líneas representan el error estándar. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010).

No hubo diferencias estadísticamente significativas (ANOVA) $p < 0.05$.

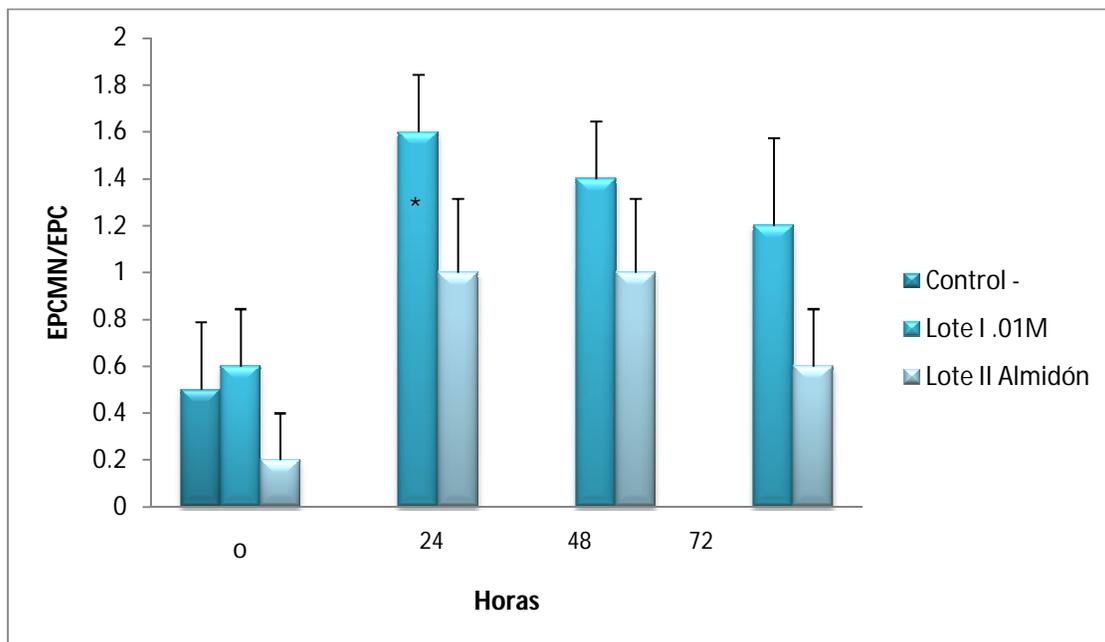
En la tabla 2 y gráfica 2 se muestran los resultados de la frecuencia de EPCMN/EPC en sangre periférica de ratón realizado en un estudio agudo.

Al tiempo 0 el lote control negativo y los lotes experimentales se presentaron en un rango de 0.2 a 0.6 EPCMN sin mostrar diferencias estadísticamente significativas indicando que todos los lotes se encontraban en condiciones iguales.

A las 24 hrs el lote I mostró un incremento de 1.6 MN teniendo una diferencia estadísticamente significativamente comparándolo con el lote control negativo.

Tabla 2. Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo agudo. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010)

Lote	Media +/- Desviación estándar	Error estándar
Control (-)0 hrs	0.50 +/- 0.57	0.28
Control (-)24hrs	0.00 +/- 0.00	0.00
Control (-)48hrs	0.00 +/- 0.00	0.00
Control (-)72hrs	0.00 +/- 0.00	0.00
LI 0hrs	0.60 +/- 0.54	0.24
LI 24hrs	1.60 +/- 0.54	0.24
LI 48hrs	1.40 +/- 0.54	0.24
LI 72hrs	1.20 +/- 0.83	0.37
LII 0hrs	0.20 +/- 0.44	0.20
LII 24hrs	1.00 +/- 0.70	0.31
LII 48hrs	1.00 +/- 0.70	0.31
LII 72hrs	0.60 +/- 0.54	0.24



Gráfica 2. Relación de EPCMN/EPC en 1000 eritrocitos en el estudio agudo de las nanopartículas de plata en fase almidón. Las barras representan el promedio de EPCMN/EPC de 5 animales tratados y las líneas representan el error estándar. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010).

*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo en la prueba de Tukey de comparación múltiple.

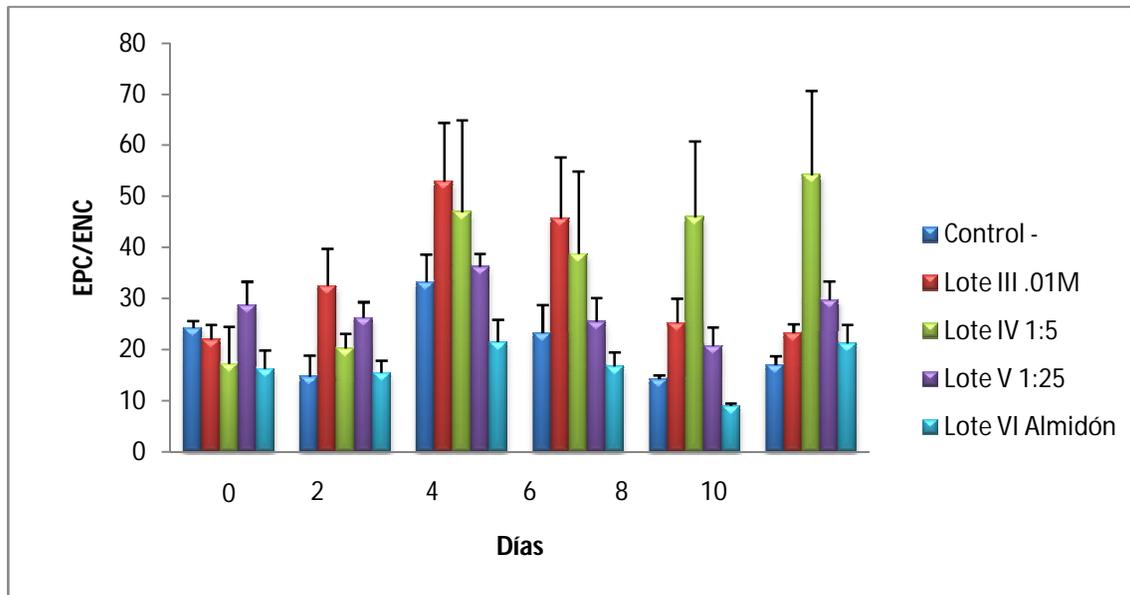
En la tabla 3 y gráfica 3 se muestran los resultados de la frecuencia de EPC en 1000 ENC estudiando nanopartículas de plata en fase almidón a diferentes diluciones en un estudio subcrónico.

Al tiempo 0, todos los lotes se comportaron en iguales condiciones mostrando un rango de 16.25 a 28.75. En el día 2, los resultados fueron muy semejantes al tiempo 0. Para el día 4, se observó un incremento de EPC en todos los lotes, resaltando el lote III (0.01M) y el lote IV (1:5) con un promedio de 53 y 47 EPC respectivamente sin mostrar diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis de varianza.

En el día 6, en los lotes III y IV los EPC se siguen observando elevados; sin embargo disminuyeron con respecto al día 4. En los días 8 y 10 el único lote que presentó un incremento de 46 y 54.25 de EPC fue el lote IV (1:5) sin ver diferencia estadísticamente significativa en comparación con los lotes restantes, que se comportaron como el tiempo 0.

Tabla 3. Frecuencia de EPC en 1000 ENC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo subcrónico. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010).

Lote	Media +/- Desviación estándar	Error estándar	Lote	Media +/- Desviación Estándar	Error estándar
Control - 0	24.25 +/- 2.87	1.43	LIV 6	38.75 +/- 32.42	16.21
Control - 2	14.75 +/- 8.26	4.13	LIV 8	46.00 +/- 29.64	14.82
Control - 4	33.25 +/- 10.90	5.45	LIV 10	54.25 +/- 32.89	16.44
Control - 6	23.25 +/- 11.02	5.51	LV 0	28.75 +/- 9.21	4.60
Control - 8	14.25 +/- 1.50	0.75	LV 2	26.25 +/- 6.23	3.11
Control - 10	17.00 +/- 3.55	1.78	LV 4	36.25 +/- 5.12	2.56
L III 0	22.00 +/- 5.88	2.94	LV 6	25.50 +/- 9.29	4.64
LIII 2	32.50 +/- 14.66	7.33	LV 8	20.75 +/- 7.41	3.7
LIII 4	53.00 +/- 22.84	11.42	LV 10	29.75 +/- 14.75	3.70
L III 6	45.75 +/- 23.93	11.96	LVI 0	16.25 +/- 7.27	3.63
L III 8	25.25 +/- 9.53	4.76	LVI 2	15.50 +/- 4.72	2.36
LIII 10	23.25 +/- 3.59	1.79	LVI 4	21.50 +/- 8.81	4.40
LIV 0	17.25 +/- 14.61	7.30	LVI 6	16.75 +/- 5.56	2.78
LIV 2	20.25 +/- 5.90	2.95	LVI 8	9.00 +/- 1.15	0.57
LIV 4	47.00 +/- 35.91	17.95	LVI 10	21.25 +/- 7.41	3.70



Gráfica 3. Relación de EPC/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio subcrónico de las nanopartículas de plata en fase almidón. Las barras representan el promedio de EPC/ENC de 5 animales tratados y las líneas representan el error estándar. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010)

No hubo diferencias estadísticamente significativas (ANOVA) $p < 0.05$.

En la tabla 4 y gráfica 4 se muestran los resultados de la frecuencia de EPCMN en 1000 EPC estudiando nanopartículas de plata en fase almidón en un estudio subcrónico a diferentes diluciones.

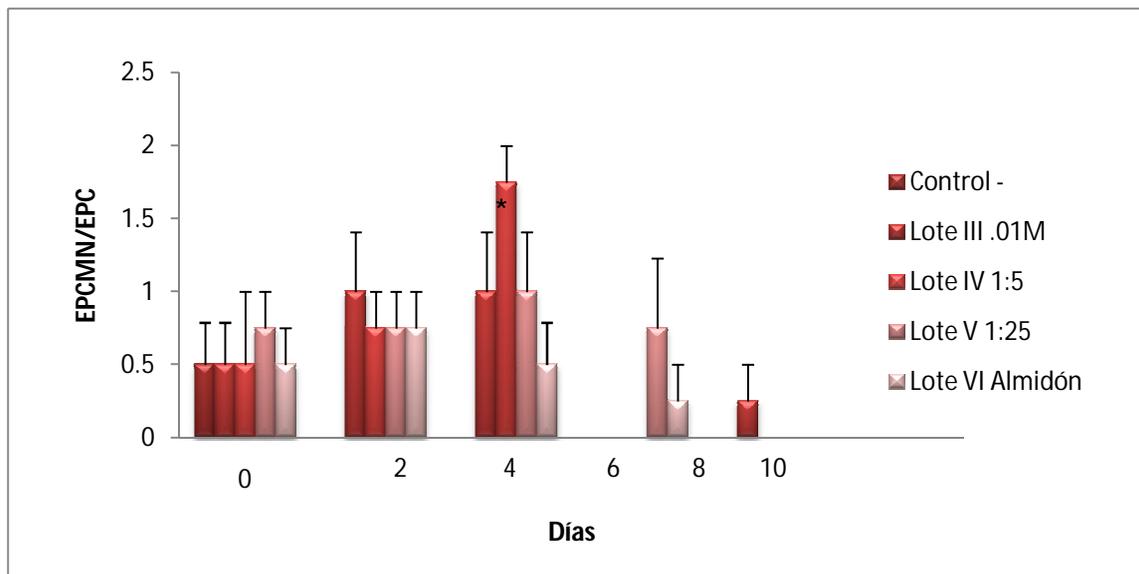
En el tiempo 0, sólo el lote V rebasa el rango de 0.5 EPCMN de los lotes restantes comportándose en condiciones iguales.

En el día 2, el lote III sobresale con un valor de 1.0 EPCMN mientras que los lotes IV, V y VI se mantienen con 0.75 MN y el control negativo no presenta evidencia de micronúcleos.

En el día 4, es notorio el incremento de EPCMN en el lote IV con un valor 1.75 MN, teniendo una diferencia estadísticamente significativa con el lote control negativo y los lotes experimentales, cuyos valores son de 0.5 a 1.0 EPCMN. Para el día 6, hay una disminución de MN en el lote V y VI, para los lotes sobrantes no hay presencia MN. Al día 8, únicamente el lote III muestra un valor de 0.25 MN. Hacia el día 10 no hubo MN en ninguno de los lotes.

Tabla 4. Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo subcrónico. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010).

Lote	Media +/- Desviación estándar	Error estándar	Lote	Media +/- Desviación estándar	Error estándar
Control - 0	0.50 +/- 0.57	0.28	LIV 6	0.00 +/- 0.00	0.00
Control - 2	0.00 +/- 0.00	0.00	LIV 8	0.00 +/- 0.00	0.00
Control - 4	0.00 +/- 0.00	0.00	LIV 10	0.00 +/- 0.00	0.00
Control - 6	0.00 +/- 0.00	0.00	LV 0	0.75 +/- 0.50	0.25
Control - 8	0.00 +/- 0.00	0.00	LV 2	0.75 +/- 0.50	0.25
Control - 10	0.00 +/- 0.00	0.00	LV 4	1.00 +/- 0.81	0.40
LIII 0	0.50 +/- 0.57	0.28	LV 6	0.75 +/- 0.95	0.47
LIII 2	1.00 +/- 0.81	0.40	LV 8	0.00 +/- 0.00	0.00
LIII 4	1.00 +/- 0.81	0.40	LV 10	0.00 +/- 0.00	0.00
LIII 6	0.00 +/- 0.00	0.00	LVI 0	0.50 +/- 0.50	0.25
LIII 8	0.25 +/- 0.50	0.25	LVI 2	0.75 +/- 0.50	0.25
LIII 10	0.00 +/- 0.00	0.00	LVI 4	0.50 +/- 0.57	0.28
LIV 0	0.50 +/- 1.00	0.50	LVI 6	0.25 +/- 0.50	0.25
LIV 2	0.75 +/- 0.50	0.25	LVI 8	0.00 +/- 0.00	0.00
LIV 4	1.75 +/- 0.50	0.25	LVI 10	0.00 +/- 0.00	0.00



Gráfica 4. Relación de EPCMN/EPC en 1000 eritrocitos en el estudio subcrónico de las nanopartículas de plata en fase almidón. Las barras representan el promedio de EPCMN/EPC de 5 animales tratados y las líneas representan el error estándar. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010).

*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo en la prueba de Tukey de comparación múltiple.

En la tabla 5 y gráfica 5 se muestran los resultados de la frecuencia de ENCMN en 1000 ENC estudiando nanopartículas de plata en fase almidón a diferentes diluciones.

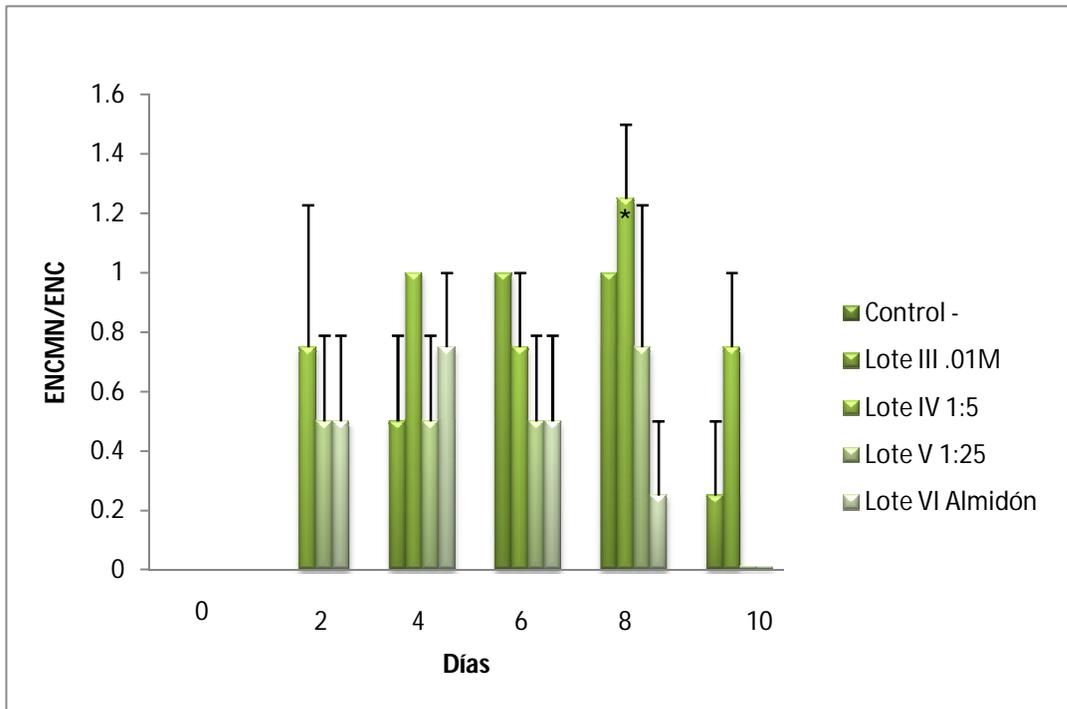
En el tiempo 0, no hay presencia de ENCMN en los lotes estudiados, para el día 2 hay un aumento de MN con un rango de 0.5 a 0.75 para los lotes IV, V y VI.

El lote IV (1:5) en los días 4, 8 y 10 se observa un incremento de MN con un valor de 1.25, en el día 8 hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo.

En los días 6, 8 y 10 los lotes restantes presentan 1.0 MN sin diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 5. Frecuencia de ENCMN en 1000 ENC en los lotes distribuidos a diferentes tiempos en un ensayo subcrónico. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010).

Lote	Media +/- Desviación estándar	Error estándar	Lote	Media +/- Desviación estándar	Error estándar
Control - 0	0.00 +/- 0.00	0.00	LIV 6	0.75 +/- 0.50	0.25
Control - 2	0.00 +/- 0.00	0.00	LIV 8	1.50 +/- 1.00	0.50
Control - 4	0.00 +/- 0.00	0.00	LIV 10	0.75 +/- 0.50	0.25
Control - 6	0.00 +/- 0.00	0.00	LV 0	0.00 +/- 0.00	0.00
Control - 8	0.00 +/- 0.00	0.00	LV 2	0.50 +/- 0.57	0.28
Control - 10	0.00 +/- 0.00	0.00	LV 4	0.50 +/- 0.57	0.28
LIII 0	0.00 +/- 0.00	0.00	LV 6	0.50 +/- 0.57	0.28
LIII 2	0.00 +/- 0.00	0.00	LV 8	0.75 +/- 0.95	0.47
LIII 4	0.50 +/- 0.57	0.28	LV 10	0.00 +/- 0.00	0.00
LIII 6	1.00 +/- 0.00	0.00	LVI 0	0.00 +/- 0.00	0.00
LIII 8	1.00 +/- 0.00	0.00	LVI 2	0.50 +/- 0.57	0.28
LIII 10	0.25 +/- 0.50	0.25	LVI 4	0.75 +/- 0.50	0.25
LIV 0	0.00 +/- 0.00	0.00	LVI 6	0.50 +/- 0.57	0.28
LIV 2	0.75 +/- 0.95	0.47	LVI 8	0.25 +/- 0.50	0.25
LIV 4	1.00 +/- 0.00	0.00	LVI 10	0.00 +/- 0.00	0.00



Gráfica 5. Relación de ENCMN/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio subcrónico de las nanopartículas de plata en fase almidón. Las barras representan el promedio de ENCMN/ENC de 5 animales tratados y las líneas representan el error estándar. (Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010).

*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo en la prueba de Tukey de comparación múltiple.

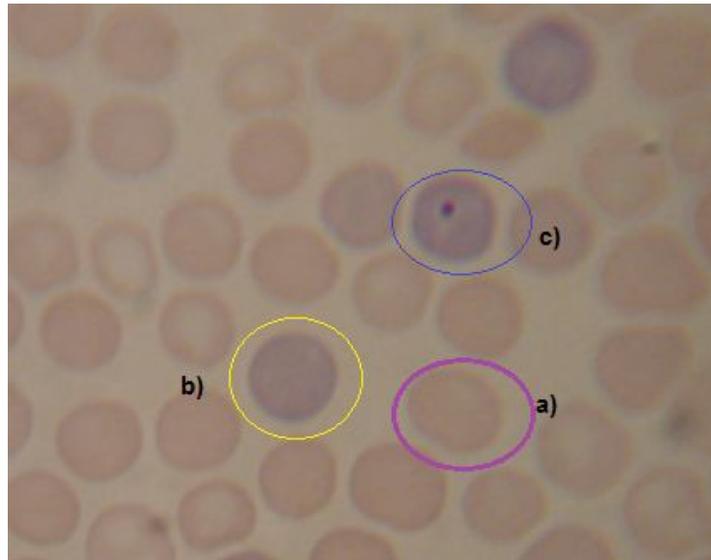


Fig. 9. a) Eritrocito normocrómico, b) Eritrocito policromático, c) Eritrocito policromático micronucleado. (Tinción Giemsa a 100x)
(Fotografía tomada en el Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010)

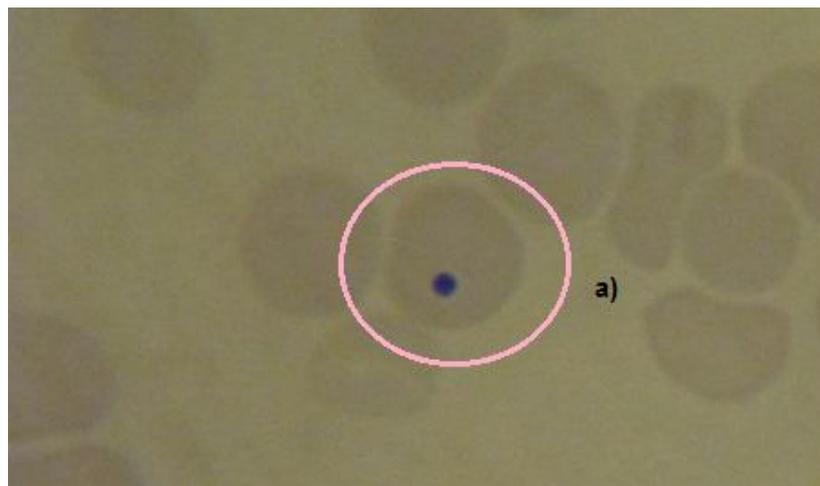


Fig. 10. a) Eritrocito normocrómico micronucleado. (Tinción Giemsa a 100x)
(Fotografía tomada en el Laboratorio L-521, FES-Cuautitlán, 2010)

11. DISCUSIÓN

La importancia del estudio de las nanopartículas de plata está dada por su uso en la nanomedicina (como antibacterial, protector viral, entre otros) y a nivel industrial en pinturas, electrodomésticos y textiles. [Villegas, 2010; AshaRani, et al 2009]

En la actualidad no se tienen estudios suficientes para comprobar que las nanopartículas de plata provoquen o no daño por lo que es necesario realizar estudios que permitan conocer los efectos que éstas van a tener tanto en el hombre (daño celular como genotoxicidad y citotoxicidad) como en el medio ambiente. [Gutiérrez, et al 2009]

Villegas en el 2010, estudió las nanopartículas de plata en fase almidón, dichas nanopartículas tienen un tamaño que va de 3 a 5 nm y con una forma esférica aplicándolas en un modelo de ratón cepa CD1, estos ratones fueron infectados con el virus Herpes simplex tipo 1 y encontró que tienen un efecto terapéutico al observar que la carga viral disminuía. [Villegas, 2010]

Por estas razones, es de suma importancia contribuir en el estudio de toxicidad de dichas nanopartículas. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar, si las nanopartículas de plata en fase almidón presentan un efecto citotóxico y/o genotóxico.

Los resultados emitidos por la técnica de micronúcleos permiten evaluar la capacidad citotóxica y genotóxica de un compuesto, en este caso, de las nanopartículas de plata en fase almidón.

Se trabajaron con nanopartículas de plata a diferentes concentraciones que fueron la solución A (0.01 M), solución B (1:5) y solución C (1:25) en un estudio agudo y subcrónico, además se utilizó el almidón como vehículo que fue evaluado de manera individual.

En el tiempo 0, el lote control negativo y los lotes experimentales tanto del ensayo agudo como subcrónico no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, por lo cual se dice que todos los lotes estaban en las mismas condiciones al inicio del experimento.

En el estudio agudo para el índice genotóxico (EPCMN/1000 EPC) los resultados arrojaron que la solución A a las 24 hrs mostró una diferencia estadísticamente significativa comparándolo con el control negativo, sin embargo, este valor no rebasa la tasa basal de micronúcleos (1-3 MN) para la cepa CD1 [Radic y Lucic, 2007; Rocha, 2009], a las 48 hrs disminuyó el número de micronúcleos, así mismo, a las 72 hrs, por lo que no se muestran indicios de genotoxicidad, ya que se pudo observar, con el paso de las horas que los micronúcleos fueron disminuyendo.

Estos resultados no concuerdan con los estudios realizados por AshaRani y colaboradores en el 2009, quienes concluyeron que las nanopartículas de plata recubiertas en almidón (tamaño de 6 a 20 nm, 100 µg/mL) tienen un efecto genotóxico en células cancerígenas y fibroblastos, el estudio se realizó con el ensayo de micronúcleos *in vitro*. [AshaRani, et al 2009] Recordando que aún no se comprende la toxicocinética de las nanopartículas, cada vez es más evidente que sus características fisicoquímicas juegan un papel importante en el reconocimiento celular y sus consecuencias fisiológicas, existiendo incertidumbre de los parámetros que influyen en la respuesta genotóxica, entre los que se encuentran su tamaño, forma y superficie. [Singh, et al 2009] Por lo tanto las diferencia de los resultados obtenidos pudo deberse a diversas causas entre las cuales se encuentran: la diferencia entre el tamaño de la nanopartícula, concentración, tiempo de exposición y tipo de ensayo. Hay que recordar que nuestro estudio se realizó en un modelo de ratón en donde intervienen diferentes

procesos fisiológicos como la biotransformación y eliminación, situaciones que no existieron en el modelo *in vitro* de los autores mencionados.

Con respecto a la citotoxicidad en el estudio agudo los lotes experimentales se comportaron de manera homogénea refiriéndose al lote control negativo, sin presentar diferencias estadísticamente significativas, que infieran un daño citotóxico.

AshaRani y colaboradores en el 2009 usaron fibroblastos que fueron tratados con nanopartículas de plata cubiertas de almidón a una concentración de 100 µg/mL durante 48 hrs observando una alteración notoria en la forma de la célula de la morfología del cultivo en monocapa, la células tratadas mostraban cambios (“células enfermas”), mientras que el control fue normal, estos resultados no concuerdan con los obtenidos en nuestro experimento, principalmente por la técnica empleada ya que ellos utilizaron cultivos en monocapa, midieron el contenido de ATP en la célula, además influyeron factores como el tamaño de las nanopartículas y la concentración, anteriormente mencionados. [AshaRani, et al 2009]

En el ensayo subcrónico para la genotoxicidad se estudió a los EPCMN y ENCMN observando un incremento de micronúcleos en EPC en el día 4 por el lote IV (solución B), así mismo, los eritrocitos normocrómicos micronucleados se incrementaron para el día 8 en la misma solución B, la relación del aumento en estos dos tipos de eritrocitos se puede explicar, debido a que los eritrocitos policromáticos recién formados tardan en madurar dentro de la circulación a eritrocitos normocrómicos después de 1- 2 días, teniendo una vida media de 30 días, por lo tanto estos nos reflejan exposiciones genotóxicas subcrónicas [Medina, 1998] que, en éste estudio, no se encontraron a pesar de la existencia de una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ya que el aumento fue de 1.75 MN para los EPC y 1.5 MN para ENC; y dicho aumento no rebasó la tasa basal de micronúcleos, comparándolo con los

resultados reportados por Rocha en el 2008, con respecto al control positivo, en el cual usaron ifosfamida a una concentración de 60 mg/Kg de peso teniendo un aumento de 13 micronúcleos en 1000 EPC que representan cuatro veces la tasa basal, [Rocha, 2008] por lo cual se puede afirmar que el incremento presentado por la Solución B no se considera como un efecto genotóxico.

Las soluciones A y C no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, ya que se comportaron de manera similar al control negativo tanto para EPCMN como ENCMN por lo tanto, se puede concluir que no hay indicio de genotoxicidad.

Las tres concentraciones utilizadas a pesar de ser soluciones distintas en cuanto a su concentración, no mostraron un aumento de micronúcleos que evidencien genotoxicidad. Villegas en el 2010 en sus resultados demostró que al utilizar la vía subcutánea estas soluciones presentaron una distribución sistémica [Villegas, 2010], lo que permitiría evidenciar un efecto a nivel de sangre periférica; sin embargo éste no fue el caso.

Para citotoxicidad en el estudio subcrónico hubo cambios en el comportamiento de los lotes, observando que los lotes III (0.01M) y IV (1:5) incrementaron el número de EPC a partir del día 4, manteniéndose hasta el día 10, sin que estas discrepancias nos lleven a pensar en un daño citotóxico.

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Villegas en el 2010, en donde concluye que las nanopartículas de plata no presentan toxicidad a nivel clínico ni histopatológico, a ninguna de las dosis empleadas. [Villegas, 2010]

Al no encontrar cambios evidentes se puede sugerir que las nanopartículas de plata en fase almidón no presentan citotoxicidad en ninguna de las concentraciones utilizadas y no varía con respecto al tiempo de exposición (agudo y subcrónico) ni la vía de administración (subcutánea e intraperitoneal).

Continuando con el estudio de citotoxicidad, la solución A (0.01M) se utilizó en ambos ensayos, observando que en el agudo, al aplicar una sola dosis (250 μ L) los EPC fueron disminuyendo conforme pasó el tiempo, a las 24 hrs 31.4, a las 48 hrs 26.42, mientras que en el subcrónico fueron incrementando debido a la dosis (50 μ L) de exposición constante. (día 2, 32.5 EPC. Sin embargo el día 8 y 10 se comportaron como el día 2). Esto se analizó en las 48 hrs (agudo) que es equivalente al día 2 (subcrónico), por lo que se puede decir que a menor cantidad administrada hay un mayor efecto, lo que muestra congruencia con los resultados obtenidos por Villegas en el 2010, que observa que a menor cantidad administrada se obtiene una mejor biodisponibilidad. [Villegas, 2010]

El almidón que se utilizó como vehículo para las nanopartículas de plata, al administrarlo de manera independiente, no se observó una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con el control negativo, por lo que se puede decir que es inocuo y adecuado para administrarlo de manera concomitante con las nanopartículas de plata; por lo cual los resultados obtenidos fueron producto sólo de las nanopartículas de plata.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se puede decir que las nanopartículas de plata en fase almidón podrían ser útiles en la nanomedicina para favorecer un tratamiento terapéutico en pacientes diagnosticados con Herpes simplex tipo 1, al no mostrar indicios de genotoxicidad y citotoxicidad. Al mismo tiempo se recomienda continuar con los estudios toxicológicos de los nanomateriales que en un futuro serán utilizados a nivel tecnológico ya que existe una amplia gama de materiales no estudiados que pueden ser de gran utilidad para favorecer el desarrollo de nuevos productos que contribuyen al comercio y a la industria.

12. CONCLUSIONES

- ✓ Mediante la técnica de micronúcleos se determinó que las nanopartículas de plata en fase almidón utilizadas a un tamaño de 3-5 nm y de forma esférico no presentan genotoxicidad ni citotoxicidad en ratones CD1.
- ✓ Las nanopartículas de plata en fase almidón en un estudio agudo a una concentración de 0.01M no son genotóxicas ni citotóxicas ya que no se incrementó la frecuencia de EPCMN y no se alteró la relación EPC/ENC.
- ✓ De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio subcrónico se puede concluir que las nanopartículas de plata en fase almidón a una concentración de 0.01M y sus respectivas diluciones de 1:5 y 1:24 no son genotóxicas porque no hubo un incremento de EPCMN y ENCMN; y el índice EPC/ENC no se vio alterado.

13. REFERENCIAS

- Aillon Kristin, Xie Yumei, Nashwa Gendy, Berkland Cory y Forrest M. (2009). Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. (61); 457–466.
- Asha Rani, Low Grace, Prakash Manoor y Valiyaveetil Suresh. (2009). Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *American Chemical Society*. 3(2); 279-290.
- Bastian Susanne, Busch Wibke, Kühnel Dana, Springer Armin, Meißner Tobias, Holke Roland, Scholz Stefan, Iwe Maria, Pompe Wolfgang, Gelinsky Michael, Potthoff Annegret, Richter Volkmar, Ikonomidou Chrysanthy y Schirmer Kristin. (2003). Toxicity of Tungsten Carbide and Cobalt-Doped Tungsten Carbide Nanoparticles in Mammalian Cells in Vitro. *Environmental Health Perspectives*. <http://ehp03.niehs.nih.gov/article/fetchArticle.action?articleURI=info:doi/10.1289/ehp.0800121>.
- Blue Cross Bio-Medical página oficial http://www.bcbmcn.com/products/p_1_02.htm Consultada el día 25 de septiembre de 2010.a las 21:30 hrs.
- Calderón M. y Ramírez L. (1992). Efecto mutagénico inducido por capsaicina sobre eritrocitos policromáticos de sangre periférica detectado mediante la prueba de micronúcleos en un estudio subagudo in vivo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Cheng Cheng, Cuda Giovanni, Bunimovich Yuri, Cheng Mark, Cuda Giovanni, Gaspari Marco, Heath James, Hill Haley, Mirkin Chad, Nijdam Jasper, Terracciano Rosa, Thundat Thomas y Ferrari Mauro. (2006). *Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics*. Ed. Elsevier. Science Direct. 10; 11–19.
- Colvin Vicki. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature biotechnology*. 21(10); 1165-1170.

- Cotellet S. y Ferard J. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 34; 246- 255.
- Cuenllas D. Elvira. (1992). Estudio de la expresión del daño residual radio inducido en la funcionalidad de las células del sistema hematopoyético de ratón (*Mus musculus* L). Mecanismos compensatorios del estroma en la regulación de la hematopoyesis. Tesis profesional, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Darragh McArt, McKerr George, Vyvyan Howard, Saetzlery Kurt y Wasson Gillian. (2009). Modelling the comet assay, *Biochemical Society Transactions*. 37(4); 914-917.
- Domínguez R. Maritere. (2005). Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecilsalicílico aislado de la corteza del cuachalalate y su éster metílico evaluada en la sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Duffin R., Tran CL., Brown DM., Stone V. y Donaldso, K. (2008). Pro-inflammatory effects of nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhalation Toxicology*. (19); 849-856.
- Fairbairn DW., Olive PL. y O'Neill KL. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation research*. 339(1); 37-59.
- Foladori Guillermo e Invernizzi Noela. (2008). Nanotecnologías en la alimentación y agricultura. Universidad de la República Montevideo, <http://estudiosdeldesarrollo.net/relans/page1/files/libro-alimentacion.pdf> Consultada el día 28 agosto de 2010 a las 23:30 hrs.
- Global Information, Inc. All rights reserved. 2007-2010. <http://www.printed-electronics-reports.com/press/205.shtml> Consultada el día 16 de julio de 2010 a las 14:15 hrs.

- González, Moisés. (2010).
<http://ushebtisegipcios.blogia.com/temas/materiales.php> Consultada el día 16 de julio de 2010 a las 22:40 hrs.
- Goodsell S. David. (2004). Nanobiotechnology: Lessons From Nature. Ed. Wiley Liss. 3 -10.
- Gopala Krishna y Makoto Hayashi. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research. (455); 155–166.
- Guachalla I. y Ascarrunz Me. (2003). La Genética Toxicología: Una ciencia en constante desarrollo. Biofarbo. (11); 75-82.
- Gutiérrez-Praena D., Jos A, Pichardo S., Puerto M, Sánchez-Granados E., Grilo A. y Cameán AM. (2009). Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. Revista de Toxicología. 26(2-3); 87-92.
- Hernández C. A. (1996). Efecto anticlastogénico de la clorofilina en contra del nitrito de sodio evaluado en cepa NIH. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Hernández Matilde. (1999). Estudio genotóxico del derivado de 4,4-dihidropiridina en cultivo de linfocitos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Horváthová Eva. (2008). Trends in the Study of Genetic Susceptibility. Interdisciplinary Toxicology. 1(1); 13–14.
- Hussain S. M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T. y Schlager J.J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in Vitro. (19); 975–983.
- Hyuck Sung Jae, Ho Ji Jun , Hyuck Sung Jae, Ho Ji Jun, Duck Park Jung, Uk Yoon Jin, Sung Kim Dae, Soo Jeon Ki, Yong Song Moon, Jeong Jayoung, Seok Han Beom, Hee Han Jeong, Hyun Chung, Yong, Kyung Chang Hee, Hyun Lee Ji, Haing Cho Myung, Kelman Bruce y Yu Je. (2009). Subchronic inhalation toxicity of Silver Nanoparticles. Toxicological sciences. 108(2); 452-461.

- Kyungeun Cha, Hye-Won Hong, Yeon-Gil Choi, Kyungeun Cha, Hye Won Hong, Yeon-Gil Choi, Min Joo Lee, Jong Hoon Park, Hee-Kwon Chae, Gyuha Ryu y Heejoon Myung. (2008). Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. Ed. Biotechnol Lett. 30; 1893–1899.
- Laboratorios Agactive www.agactive.com/socks.html, Consultada el día 22 de junio de 2010, a las 23:30 hrs.
- Laboratorios argenal, página oficial <http://www.laboratorios-argenol.com/qesplatac.htm> Consultada el día 25 de septiembre de 2010 a las 1:13 hrs.
- Lang Tran y Navas Jose Ma. (2009). Las NA y la salud: La nanotoxicología y la evaluación del riesgo de las nanopartículas artificiales. Seguridad y Medio Ambiente. 114; 6-16.
- Limbach Ludwig K., Wick Peter, Manser Pius, Grass Robert, Bruinink Arie y Stark Wendelin. (2007). Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. Environ. Sci. Technology. 41(11); 4158–416.
- Maynard Andrew y Michelson Evan. (2007). A nanotechnology consumer products inventory. International Center for Scholars. Available from: www.nanotechproject.org/consumerproducts. Consultada el día 01 septiembre de 2010 a las 22:00hrs.
- Medina A. Leonardo. (1998). Estudio del efecto clastogénico de un extracto de pimienta negra en células de sangre periférica de ratones tratados durante seis semanas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Mihail C. Roco y Bainbridge William. (2001). Societal Implications of Nanoscience and Nanotechnology. National Science Foundation. 272.

- Miller C. Robert. (1973). The Micronucleus Test as an in Vivo Cytogenetic Method. *Environmental Health Perspectives*. (6); 166-170.
- Pobjewski Sally. (2005). Nanoparticles transport cancer-killing drug into tumor cells to increase efficacy, lower drug toxicity in mice. Universidad de Michigan Michigan Nanotechnology Institute researchers published additional findings about the potential of dendrimers in cancer treatment. <http://www.med.umich.edu/opm/newspage/2005/nanoparticles.htm>
Consultada el día 23 de marzo de 2010 a las 23:20 hrs.
- Proyecto NANO-SME. Research&Markets: Aplicaciones industriales de la nanotecnología. www.researchandmarkets.com/reports/357297/nanotechnologies_for_sma_and_responsive.pdf Consultada el día 5 de enero de 2010 a las 13:50 hrs
- Quintana Mildred, Hirschbein Luisa y Pérez Elías. (2008). Nanopartículas: principios y aplicaciones. *Revista Ciencia y Desarrollo*. (34)221; 62-67.
- Radić Božica y Lucić Vrdoljak. (2007). Evaluation of HI-6 oxime: potential use in protection of human acetylcholinesterase inhibited by antineoplastic drug irinotecan and its cyto/genotoxicity in vitro. *Acta biochimica polonica*. (54)3, 583–593.
- Reigosa M., Labarta V., Molinarl G. y Bernales D. (2008). Cytocompatibility, cytotoxicity and genotoxicity analyses of dental implants, *Journal of Basic & Applied Genetics*. 19(1); 43-48.
- Renwick L. C., Brown D., Clouter A. y Donaldson K. (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med*. 61; 442–447.
- Rocha E. Yuriana. (2008). Estudio genotóxico mediante la prueba de micronúcleos del compuesto tiomorfolínico LQM 319. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Salx Ottilia. (2000). Nanotechnology and Biomedicine Health and life sciences beyond, story of convergent technologies <http://www.nano.org.uk/members/FreeReports/corpbioedicine.htm>,
Consultada el día 8 de septiembre de 2010 a las 20:15 hrs.

- Samsung página oficial. <http://www.samsung.com/mx> Consultada el día 26 de agosto de 2010 a las 18:50 hrs.
- Schmid W, (1975).The micronucleus test. Mutation research. (31), 9-13.
- Singh Neenu, Manshian Bella, Gareth Jenkins, Griffiths Sioned, Williams Paul, Maffeis Thierry, Wright Chris y Doak Shareen. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials. (30); 3891–3914.
- SusChem página oficial. Boletín SusChem España (14); 8-10. <http://www.suschem-es.org/> Consultada el día 22de agosto de 2010 a las 13:00 hrs.
- Tomellin Renzo, Faure Uta y Panzer Oliver. European technology. (2006). Nanomedicine nanotechnology for health. Strategic research agenda for nanomedicine. 1-39.
- Torres C. Isaac. (2009). Estudian uso de nanopartículas de plata para tratamiento contra SIDA. http://www.cronica.com.mx/nota.php?id_notas=460265 Consultada el día 26 de julio de 2010 a las 14:32 hrs.
- Totsuka Yukari, Higuchi1 Takashi, Imai Toshio, Nishikawa Akiyoshi, Nohmi Takehiko, Kato Tatsuya, Masuda Shuich, Kinase Naohide, Hiyoshi Kyoko, Ogo Sayaka, Kawanishi Masanobu, Yagi Takashi, Ichinose Takamichi, Fukumori Nobutaka, Watanabe Masatoshi, Sugimura Takashi y Wakabayashi Keiji. (2009). Genotoxicity of nano/microparticles *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems. Particle and Fibre Toxicology. 6:23; 1-11.
- Varadan V. K., Linfeng Chen y Jining Xie. (2008). Nanomedicine: design and applications of magnetic nanomaterials, nanosensors and nanosystems, laserwords private, Editorial Wiley John, Sons Gran Bretaña. 467.
- Villegas B. Albino. (2010). Efecto antiviral de nanopartículas de plata en un modelo de virosis herpética mucocutánea en ratón. Tesis de posgrado. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN.

- Vyvyan Howard. (2003). No es poca cosa II: El caso para una moratoria global ¡El tamaño sí importa!. Etc Group. (7); 1-22.
- Zalacain M., Sierrasesúmaga L. y Patiño A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. An. Sist. Sanit. Navar. 28(2); 227-236.