



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**Estudio genotóxico de nanopartículas de
plata en fase proteica en un ensayo agudo
y subcrónico en ratones CD-1.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JOSÉ ARTURO REDONDO OCEGUEDA

ASESORES: M. en C. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

Dr. EDUARDO San MARTIN MARTÍNEZ



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Estudio genotóxico de nanopartículas de plata en fase proteica
en un ensayo agudo y subcrónico en ratones CDI

Que presenta el pasante José Arturo Redondo Ocegueda

Con número de cuenta: 302096901 para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlan Izcalli, Mex. a 7 de marzo de 2011

PRESIDENTE Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

VOCAL QFB. Rosalba Bonilla Sánchez

SECRETARIO MC. Maritere Domínguez Rojas

1er SUPLENTE Dra. Patricia Ramírez Noguera

2º SUPLENTE QFB. Pedro Carlos Mijangos Vargas

[Handwritten signatures of the board members]

Agradecimientos

A Dios por brindarme una familia hermosa, por poner en mi camino a mi novia y por permitirme llegar a estos momentos y darme esa fuerza de voluntad que ha veces me hizo tanta falta.

Agradecer a la grandiosa Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formarme profesionalmente.

A mis maravillosos padres, Reyna Ocegueda y Amado Redondo por siempre apoyar mis decisiones, sus sabios consejos en los momentos cuando los necesitaba, por alentarme, gracias por todo su apoyo sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, los amo mucho.

A la M. en C. Maritere Domínguez Rojas por confiar en mí, por todo su apoyo para la elaboración de esta tesis, por escucharme y apoyarme en esos momentos difíciles de mi vida, gracias profesora.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por su infinito apoyo, dedicación, por su valioso tiempo y consejos para la realización de esta tesis.

A la Q.F.B. Rosalba Bonilla por todo su tiempo dedicado a corregirle las miles y miles de faltas de ortografía y sobre todo sus consejos y por ser una excelente profesora, gracias.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera por su tiempo y valiosos comentarios para la mejora de esta tesis.

Al Q.F.B. Pedro Mijangos Vargas por el tiempo y atenciones para la mejora de este trabajo.

A mis amigos de toda la carrera Uri, Diego, Jhona y Diana por todas esas alegrías que pasamos juntos.

A ti Melina Moreno Martínez por siempre apoyarme durante toda la carrera, ser mi compañera, mi amiga, mi cómplice de tantas cosas, gracias mi amor TE AMO.

Dedicatorias

Este gran logro en mí vida es dedicado a mis Padres Reyna y Amado, gracias a su total apoyo, sus consejos, regaños y sobre todo su cariño, muchas gracias los amo mucho.

A mis hermanos Amado y Erick por todo su apoyo, sus consejos y sobre todo por esa gran unión que nos caracteriza, los amo.

A mi cuñada Lidia por todo su apoyo y consejos, muchas gracias.

A mis sobrinos que tanto quiero Fátima y Cristóbal, por que cuando estoy con ellos se me olvidan mis problemas y regrese a mi infancia.

A toda mi hermosa familia que siempre estuvo ahí, por brindarme sus grandes consejos y su apoyo.

A la Sra. Sara Martínez por abrirme las puertas de su casa, por escucharme, aconsejarme, por todo ese apoyo que siempre me ha brindado, muchas gracias.

A esa persona que me apoyo durante toda la carrera, por todas esas veces donde me levantabas cuando yo caía, por tus consejos, tus regaños, tus sonrisas que hizo esta etapa de mí vida única, se que pasamos momentos dificiles pero demostramos que ante cualquier adversidad podemos salir adelante, TE AMO mi flaquita y nunca pero nunca olvides que tu Meli significas toda mí vida, TE AMO.

Este proyecto se realizó en el laboratorio L521 de Campo 1 de la FES-C bajo la asesoría de la M. en C. Maritere Domínguez Rojas.

Las nanopartículas de plata empleadas para esta investigación fueron producidas y caracterizadas en CICATA Legaria IPN a cargo del Dr. Eduardo San Martín Martínez.

ÍNDICE

Índice.....	6
Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	9
Abreviaturas.....	10
Resumen.....	11
Marco teórico	
Capítulo 1. La Nanotecnología	
1.1 Generalidades de la Nanotecnología.....	12
1.2 La nanotecnología en México.....	13
1.3 Aplicación de la nanotecnología en medicina.....	14
1.4 Tipos de nanopartículas.....	15
1.4.1 Los liposomas.....	15
1.4.2 Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano.....	15
1.4.3 Nanopartículas de cerámica.....	16
1.4.4 Nanopartículas de oro.....	16
Capítulo 2. Nanopartículas de plata.	
2.1 Nanopartículas de plata.....	18
2.2 Utilidad de nanopartículas de plata en medicina.....	18
2.3 Toxicidad de las nanopartículas de plata.....	19
2.4 Biodistribución y los posibles efectos adversos de las nanopartículas de plata en animales.....	22
2.5 Posibles mecanismos de toxicidad inducida por nanopartículas de plata.....	23
2.6 Mecanismos de daño al DNA inducidos por nanopartículas.....	24

Capítulo 3. Micronúcleos	
3.1 Prueba de micronúcleos.....	27
3.2 Sistemas de ensayo.....	28
Justificación.....	35
Objetivos.....	36
Diagrama de flujo experimental.....	37
Materiales y métodos.....	38
Resultados.....	38
Discusión.....	53
Conclusiones.....	58
Referencias.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes de exposición de nanopartículas de plata y sus efectos adversos.	20
Figura 2. Posibles mecanismos de toxicidad inducida por nanopartículas de plata.	24
Figura 3. Posible entrada de nanopartículas a la célula.	25
Figura 4. Mecanismos indirectos que pueden conducir a la genotoxicidad.	26
Figura 5. EPCMN en frotis de sangre periférica de ratón.	29
Figura 6. ENCMN en frotis de sangre periférica de ratón.	30
Figura 7. Eritropoyesis humana	32
Figura 8. Formación de micronúcleos en eritroblastos de médula ósea.....	34
Figura 9. Porcentaje de EPCMN en 1000 EPC en el ensayo subcrónico realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica.	44
Figura 10. Porcentaje de ENCMN en 1000 ENC en el ensayo subcrónico realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica.	45
Figura 11. Porcentaje de EPC / EPC+ENC en el ensayo subcrónico realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica.	47
Figura 12. Porcentaje de EPCMN en el ensayo agudo realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica.	48
Figura 13. Porcentaje de ENCMN en el ensayo agudo realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica.	50
Figura 14. Porcentaje de EPC/EPC+ENC en el ensayo agudo realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica.	51
Figura 15. Frotis sanguíneo de ratón. ENCMN.	52
Figura 16. Frotis sanguíneo de ratón. EPCMN.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Toxicidad <i>in vitro</i> de nanopartículas de plata.....	21
Tabla 2. Toxicidad <i>in vivo</i> de nanopartículas de plata.....	22
Tabla 3. Distribución de los lotes para el ensayo agudo.	39
Tabla 4. Distribución de los lotes para el ensayo subcrónico.	40
Tabla 5. Promedios (x) de EPCMN \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.	43
Tabla 6. Promedios (x) de ENCMN \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.	45
Tabla 7. Promedios (x) de EPC \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.	46
Tabla 8. Promedios (x) de EPCMN \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.	48
Tabla 9. Promedios (x) de ENCMN \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.	49
Tabla 10. Promedios (x) de EPC \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.	51

ABREVIATURAS

(x): Promedio.

CONACYT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

ENC: Eritrocito normocrómico.

ENCMN: Eritrocito normocrómico micronucleado.

EPC: Eritrocito policromático.

EPCMN: Eritrocito policromático micronucleado.

FDA: Food and Drug administration.

HeLa: Células de cáncer de útero.

HIV-1: Virus de inmunodeficiencia humana.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

MN: Micronúcleo.

NP de Ag: Nanopartículas de plata.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RNA: Ácido ribonucleico.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

Resumen

La nanotecnología tiene la capacidad técnica para modificar y manipular la materia con la posibilidad de fabricar materiales y productos a partir del reordenamiento de átomos y moléculas, desarrollar estructuras o dispositivos funcionales a las dimensiones nano. El empleo de la nanotecnología tiene gran interés en medicina, ya que podría modificar la historia natural de las enfermedades ya sea en un sentido terapéutico, curativo, preventivo, o de rehabilitación.

Las nanopartículas de plata se están convirtiendo en una de las categorías de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología por su gran actividad antimicrobiana. Esto ha llevado a un número creciente de aplicaciones médicas de las nanopartículas de plata. Algunos de los productos que ya están disponibles en el mercado incluyen vendajes para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumentos quirúrgicos así como prótesis óseas. A parte de estas aplicaciones, las nanopartículas de plata son utilizadas para la purificación de agua.

Debido al incremento del uso de la nanotecnología, se ha elevado el riesgo asociado con la exposición a las nanopartículas, por eso es necesario ampliar los estudios relacionados con su toxicidad y genotoxicidad. Esta tesis tiene como objetivo evaluar la genotoxicidad de las nanopartículas de plata en fase proteica de tamaño promedio de 3.76 nm y de forma esférica por medio de la técnica de micronúcleos en ratones CD1 y determinar si la exposición puedan estar afectando el ciclo celular (Citotoxicidad) o dañar al DNA (Genotoxicidad) y poder contribuir al conocimiento sobre la toxicidad de éstas.

Los resultados obtenidos demostraron que la forma, el tiempo de exposición, la concentración y el tamaño de nanopartículas de plata en fase proteica que utilizamos para este estudio no resultaron ser genotóxicas ni citotóxicas en los ratones CD1, esto evidenciado con la técnica de micronúcleos en los ensayos agudos y subcrónicos.

Marco teórico

Capítulo 1. La Nanotecnología

1.1 Generalidades de la nanotecnología.

El término “nano” corresponde a un prefijo del Sistema Internacional de Unidades que indica un factor de 10^{-9} , es decir una milmillonésima parte de algo.

Si bien el término “nanotecnología” (del latín *nanus* – enano), es ampliamente utilizado, no existe un consenso que permita delimitarlo como sector. Se entiende por nanotecnología a la capacidad técnica para modificar y manipular la materia con la posibilidad de fabricar materiales y productos a partir del reordenamiento de átomos y moléculas, desarrollar estructuras o dispositivos funcionales a las dimensiones nano (Boletín estadístico y tecnológico, 2009). El empleo de la nanotecnología tiene gran interés en medicina, ya que podría modificar la historia natural de las enfermedades ya sea en un sentido terapéutico, curativo, preventivo o de rehabilitación (Salata, 2004).

De acuerdo a la necesidad que existe actualmente para el desarrollo de nuevos medicamentos y teniendo en cuenta las funciones inherentes a nanoescala de algunos componentes biológicos de las células vivas; la nanotecnología se ha aplicado a diversos campos de la medicina como la oncología, la medicina cardiovascular, entre otras. De hecho, la nanotecnología es útil para la mejora de biomarcadores, diagnóstico molecular, descubrimiento de fármacos y administración de estos, que podrían ser de mayor utilidad para nuevos tratamientos alternativos (Salata, 2004).

En la actualidad en Estados Unidos se introdujo el término de nanomedicina para describir las aplicaciones de la nanotecnología en las enfermedades humanas (Medina et. al., 2007).

1.2 La nanotecnología en México.

En América Latina, los países que cuentan con avances en el desarrollo de la nanotecnología son Brasil, Argentina y México. A diferencia de México, los dos primeros cuentan con iniciativas del gobierno o programas dedicados a la investigación, desarrollo e innovación de la nanotecnología (Boletín estadístico y tecnológico, 2009).

En México no se cuenta con un plan, programa o iniciativa nacional en nanotecnología, a pesar de que desde el 2002, la investigación en nanotecnología pasa a ser reconocida como un área de investigación estratégica (Diagnóstico y prospectiva de la nanotecnología en México, 2010).

En nuestro país se identificaron 56 instituciones que desarrollan actividades de investigación y/o docencia relacionadas con la nanotecnología, las cuales albergan a 449 investigadores relacionados con la temática, de los cuales el 29% pertenece a programas CONACYT, el 18% a la Universidad Nacional Autónoma de México, el 15% al Instituto Mexicano del Petróleo, el 8% al Instituto Politécnico Nacional y el 30% restante a otras 20 instituciones ubicadas en distintos estados del país (Diagnóstico y prospectiva de la nanotecnología en México, 2010).

Con relación a los países líderes, México se ubica muy por debajo en términos de publicaciones y patentes relacionados con la nanotecnología. Así, se observa que Estados Unidos publica 39 veces más que México, China 27, Japón casi 18, Alemania 14 e incluso Brasil duplican dicha producción. Sin embargo, mientras Estados Unidos cuenta con un millón 260 mil investigadores y Brasil con 117 mil investigadores, México apenas alcanza los 35 mil (Boletín estadístico y tecnológico, 2009)

1.3 Aplicación de la nanotecnología en medicina.

La nanotecnología se está aplicando a la formación de biomarcadores y tecnologías basadas en la genómica. Un ejemplo de ello es la utilización de nanopartículas recubiertas en su superficie con un sencillo “código de barras” que son fragmentos de DNA capaces de amplificar las señales de las pequeñas biomoléculas. Esta amplificación es comparable con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este análisis permitirá a los médicos diagnosticar correctamente las enfermedades en fases tempranas y empezar el tratamiento antes de que los daños celulares sean graves, mejorando el pronóstico del paciente (Medina et. al., 2007).

En la actualidad en el diagnóstico molecular por imágenes no sólo se limita a una descripción macroscópica de las estructuras anatómicas, si no que puede implicar imagen de la señalización celular.

Las nanopartículas se están probando actualmente para imágenes moleculares con el fin de lograr un diagnóstico más preciso con imágenes de alta calidad. De hecho los agentes de contraste se han cargado con las nanopartículas para mejorar imágenes donde se localizan tumores. Las características fisicoquímicas de las nanopartículas (tamaño de las partículas, su carga de superficie, revestimiento de superficie y la estabilidad) permiten la redirección y la concentración del marcador en el lugar de interés. (Lanza et. al., 2005)

Con el uso de la nanotecnología se ha mejorado la transportación de fármacos y con esto su efecto terapéutico, lo que reduce el efecto de los fármacos en otros sitios y aumenta al máximo el efecto terapéutico. Este objetivo se logra principalmente por el tamaño pequeño de éstas nanopartículas, que pueden penetrar a través de barreras fisiológicas. Las nanopartículas pueden atrapar o encapsular el principio activo, mejorando la solubilidad, la estabilidad y la absorción, así como evitar la inactivación prematura de éste durante su transporte.

Entre todas las nanopartículas las más utilizadas como sistemas de administración de fármacos son los liposomas y nanopartículas a base de polímero, ya que dichos componentes son generalmente biodegradables, no se acumulan en el organismo y posiblemente, estar libres de riesgo. (Saker et. al., 2005).

Tipos de nanopartículas

1.4.1 Los liposomas.

Son nanopartículas con una bicapa lipídica, es decir son vesículas compuestas de una o varias membranas de fosfolípidos cerradas sobre sí mismas. Dentro del liposoma está encapsulado un volumen pequeño del medio en el cual han sido preparados. De esta manera, su morfología les permite encapsular compuestos solubles en agua en su volumen interno, de modo que actúan como vectores de medicamentos. Dependiendo de su composición estos agregados pueden ser químicamente estables en tiempos de horas o quizá hasta años. La estabilidad física de los liposomas depende de la concentración de éste y de las interacciones entre partículas (Medina et. al., 2007).

1.4.2 Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano.

Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como conferir estructura, almacenar energía y otras funciones mucho más especializadas, tales como de reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras. El quitosano es un aminopolisacárido obtenido a escala industrial por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos (Goycoolea et. al., 2007).

Teniendo en cuenta sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, el quitosano se ha utilizado en investigación farmacéutica centrada en el desarrollo de vehículos innovadores. En este sentido, es de destacar en estos sistemas, tanto la capacidad para proteger macromoléculas bioactivas frente a la degradación, como la habilidad para transportarlas a través de las barreras de las mucosas. En consecuencia, su aplicación se ha enfocado al desarrollo de nanovehículos aptos para la administración por vías no invasivas, tales como las mucosas ocular, nasal y oral. (Agnihotri et. al., 2004).

1.4.3 Nanopartículas de cerámica.

Las nanopartículas de cerámica son sistemas inorgánicos con características porosas que han surgido recientemente como vehículos de drogas. Estos vehículos son biocompatibles, como las nanopartículas de cerámica de sílice, alúmina y titanio que pueden ser utilizados en la terapia del cáncer. Sin embargo, una de las principales preocupaciones es que estas nanopartículas no son biodegradables, ya que pueden acumularse en el cuerpo, causando así efectos no deseados. (Cherian y Rana, 2000).

1.4.4 Nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de oro son una nueva categoría de nanopartículas esféricas que consisten en un núcleo cubierto por una capa fina metálica, que es oro. Estas partículas poseen propiedades ópticas y químicas altamente favorables para la proyección de imágenes biomédicas (Medina et. al., 2007). Destacan especialmente sus peculiares e inesperadas propiedades fototérmicas, por las que al ser activadas en presencia de luz láser, desprenden calor, actuando como auténticos «nano-calefactores». Las nanopartículas de oro presentan un extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos en el tratamiento del cáncer, así como para la elaboración de nanoestructuras útiles para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos, macromoléculas terapéuticas y en terapia génica (vehículos para plásmidos, DNA, RNA, etc.).

También destaca la utilidad de las nanopartículas de oro en la elaboración de “sistemas de transporte inteligentes” que permiten controlar, en el espacio y tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya que ésta es desencadenada por un estímulo biológico interno (por ejemplo una variación en la concentración de glutatión entre el exterior y el interior de la célula) o por activación de un estímulo externo (por ejemplo luz láser) (Al-Qadi et. al., 2000).

Capítulo 2. Nanopartículas de plata.

2.1 Nanopartículas de plata

La plata ha sido históricamente utilizada para eliminar bacterias y evitar los efectos derivados de las mismas, ya sea la putrefacción de alimentos, la infección de heridas o el olor proveniente de la sudoración. El mecanismo de acción antimicrobiano de la plata consiste en la generación de iones de plata sobre la superficie cuando ésta entra en contacto con agua, por ejemplo durante la transpiración. Posteriormente estos iones son transportados por las moléculas de agua hasta las bacterias donde quedan fijados como consecuencia del llamado efecto oligodinámico de la plata, produciendo su precipitación e inactivación (Arora et. al., 2009).

Las nanopartículas de plata se están convirtiendo en una de las categorías de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología por su gran actividad antimicrobiana. Esto ha llevado a un número creciente de aplicaciones médicas de las nanopartículas de plata. Algunos de los productos que ya están disponibles en el mercado incluyen vendajes para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumentos quirúrgicos así como prótesis óseas. A parte de estas aplicaciones, las nanopartículas de plata son utilizadas para la purificación de agua (Ahamed et al., 2010).

2.2 Utilidad de nanopartículas de plata en medicina.

Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata:

Agente bactericida: se ha observado que las nanopartículas de plata poseen un efecto bactericida en contra de *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Li et. al., 2006). Este efecto bactericida ayuda a elaborar nueva instrumentación médica (catéteres, implantes, etc.) y así evitar la contaminación por microorganismos.

Anti-retroviral: Las nanopartículas de plata se han comenzado a estudiar como alternativas de tratamiento ante agentes virales, entre los estudios más destacados está sobre el virus HIV-1; las nanopartículas de plata interactúan con la proteína 120 del virus, con lo cual se inhibe la interacción viral con la célula huésped inhibiendo de esta manera la infección (Chen et. al., 2008). Es importante mencionar que estos efectos antivirales de las nanopartículas de plata solo se han demostrado *in vitro*.

2.3 Toxicidad de las nanopartículas de plata.

Varios estudios han demostrado que la toxicidad de las nanopartículas de plata está asociada al tamaño de éstas, la forma que presentan, el tiempo de exposición en los organismos, la vía de administración y la concentración en la que son administradas, pero hay una falta de información sobre su potencial genotóxico. Las fuentes de exposición y los efectos adversos están resumidos en la figura 1. En estudios *in vitro* se observa que las nanopartículas de plata causaron daños severos al DNA de células embrionarias y fibroblastos de ratón, indicados por el aumento en la expresión de proteínas de reparación, como p53 y de fosforilación H2AX (Singh et. al., 2009). Lo que indica que la exposición a las nanopartículas de plata puede dar lugar a aberraciones genéticas.

Arora y colaboradores en el 2008 encontraron que las nanopartículas de plata inducen muerte celular y estrés oxidativo en células humanas de fibrosarcoma y carcinoma de células de la piel.

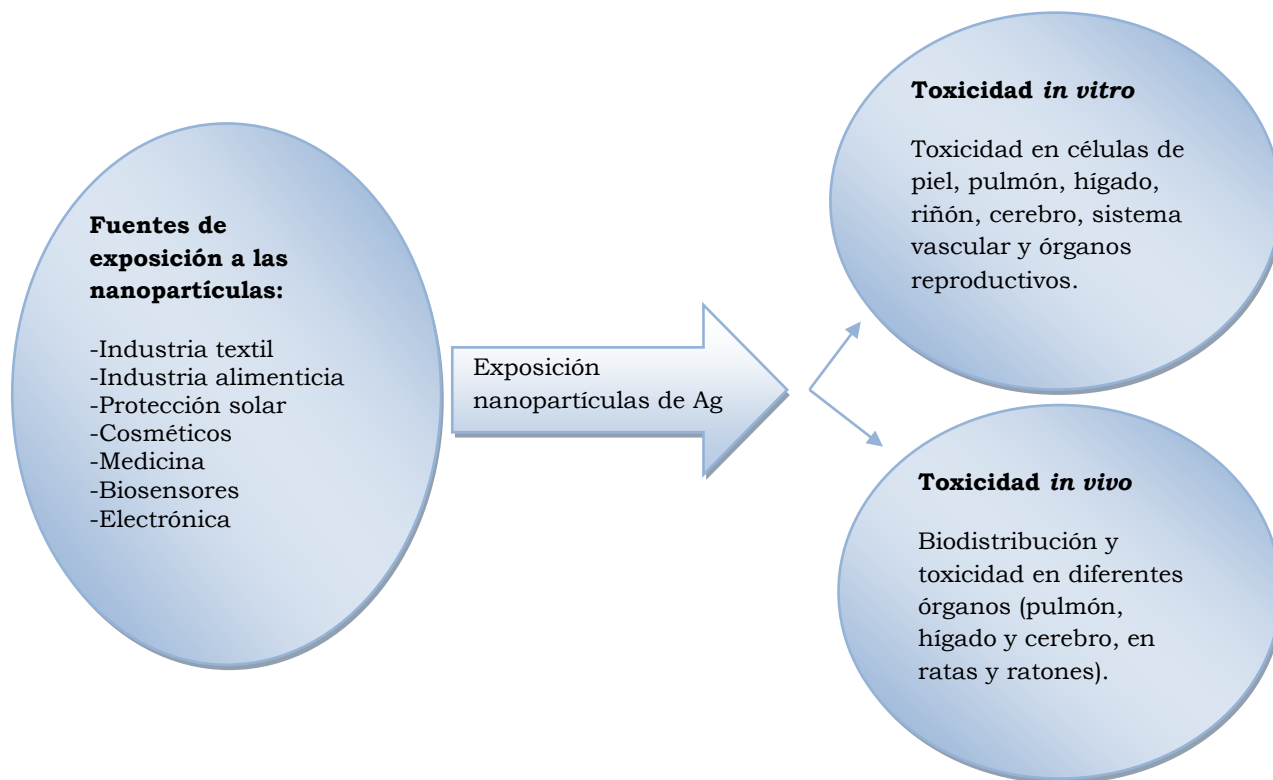


Figura 1. Fuentes de exposición de nanopartículas de plata y órganos blanco (Ahamed et. al., 2010).

Hsin y colaboradores en el 2008 propusieron el mecanismo de toxicidad de las nanopartículas de plata en los fibroblastos, en este estudio se encontró que las nanopartículas de plata inducen especies reactivas del oxígeno (ROS) y con esto la liberación del citocromo C en el citoplasma y la translocación de la proteína Bax. Estas observaciones indican que la apoptosis mediada por las nanopartículas de plata fue dependiente de las mitocondrias en los fibroblastos. Además sugirieron que las nanopartículas de plata inducían la vía apoptótica mediada por p53 a través de la cual la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos disparan la apoptosis.

Estudios de exposición de nanopartículas de plata por inhalación sugirieron que el pulmón es un blanco fácil para las nanopartículas y que las partículas inhaladas pueden llegar al cerebro a través del sistema nasofaríngeo. Sin embargo, hay información limitada sobre la toxicidad *in vitro* de nanopartículas de plata en las células del pulmón. Se informa que las nanopartículas de plata reducen la viabilidad celular de los macrófagos alveolares y las células epiteliales de pulmón (Ahamed et. al., 2010).

Es importante mencionar que hay muy pocos estudios de genotoxicidad en relación a las nanopartículas de plata. En la siguiente tabla se muestra la toxicidad *in vitro* de las nanopartículas de plata de acuerdo al tamaño, dosis y tiempo de exposición.

Tabla 1. Toxicidad *in vitro* de nanopartículas de plata (Ahamed et. al., 2010).

Tamaño de Ag NP	Línea celular de mamífero	Dosis	Tiempo de exposición	Observaciones
15 nm	Células madre de espermatogonias de ratón.	5-10µg/ml	24 hrs.	Disminución de la función mitocondrial, aumento de LDH y apoptosis.
7-20 nm	Carcinoma de piel y fibrosarcoma en humanos.	6.25-50 µg/ml	24 horas	Reducción de la viabilidad celular, estrés oxidativo, fragmentación del DNA y mayor actividad de la caspasa 3.
7-20 nm	Fibroblastos y células hepáticas de ratón.	10-200 µg/ml	24 horas	Reducción de la viabilidad celular, estrés oxidativo y apoptosis.
7-10 nm	Células de hepátoma de humano	0.1-0.3 µg/ml	24 horas	Dosis no citotóxica.
5-10 nm	Células de hepátoma de humano	1.0-10 µg/ml	24 horas	Citotoxicidad y estrés oxidativo.
2-5 nm	Células HeLa	92 µg/ml	24 horas	Citotoxicidad y apoptosis.

Tabla 2. Toxicidad *in vivo* de nanopartículas de plata (Ahamed et. al., 2010).

Tamaño de Ag NP	Modelo de animal	Dosis	Tiempo y vía de administración	Observaciones
18 nm	Rata Sprague-Dawley	1.73×10 ⁴ /cm ³ , 1.27×10 ⁵ /cm ³ , 1.32×10 ⁶ particles/cm ³	Inhalación, 6 hr al día, 5 a la semana, por 28 días	No hay cambios significativos.
18 nm	Rata Sprague-Dawley	1.73×10 ⁴ /cm ³ , 1.27×10 ⁵ /cm ³ , 1.32×10 ⁶ particles/cm ³	Inhalación, 6 hr al día, 5 a la semana, por 90 días	Inflamación alveolar y del hígado, aumento de la hiperplasia del conducto biliar.
29 nm	Ratón C57BL/6N	100mg/kg 500mh/kg	Vía intraperitoneal Cada 24 horas.	Estrés oxidativo.

2.4 Biodistribución y los posibles efectos adversos de las nanopartículas de plata en animales.

La exposición humana a los nanomateriales se puede producir a través de diversas vías, entre ellos la inhalación, contacto dérmico y la ingestión. La administración sistémica es también otra posible vía de entrada. La distribución pulmonar y sistémica por inhalación mostró que el contenido de partículas en pulmón disminuye rápidamente con el tiempo después de la inhalación. Posteriormente se detectaron partículas en la sangre y otros órganos, como hígado, riñón y cerebro. También se ha examinado la distribución y la toxicidad de las nanopartículas de plata en ratas después de una inyección subcutánea y se encontró que estas partículas pasan a torrente sanguíneo distribuyéndose a los órganos diana que son los riñones, hígado, bazo, cerebro y pulmón. Las nanopartículas de plata provocaron la destrucción de la barrera hematoencefálica y la degeneración neuronal. La hepatotoxicidad de las nanopartículas de plata después de la exposición oral de 3 días de duración en ratones a una dosis de 100 mg /Kg, reveló que el hígado mostró infiltración linfocítica y expresión de genes relacionados con la apoptosis y la inflamación (Tang et. al., 2009).

2.5 Posibles mecanismos de acción asociados con la toxicidad de las nanopartículas de plata.

La generación de ROS y el estrés oxidativo parecen ser dos probables mecanismos de toxicidad de las nanopartículas de plata. El estrés oxidativo se produce cuando la generación de ROS excede la capacidad de los mecanismos de defensa antioxidante, provocando una gran variedad de eventos celulares y fisiológicos como el estrés, la inflamación, el daño al DNA y la apoptosis. La citotoxicidad, daño en el DNA y la apoptosis inducida por las nanopartículas de plata, fue mediada por estrés oxidativo (Hsin Y., 2008).

Las mitocondrias parecen ser los orgánulos más sensibles a la toxicidad nanopartículas de plata. Hsin y colaboradores en el 2008 sugirieron que la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial causada por la exposición de nanopartículas de plata aumenta la producción de ROS y la interrupción de la síntesis de ATP, lo que conduce al daño del DNA. La interacción de las nanopartículas de plata con el DNA condujo a la interrupción del ciclo celular en G2 de la fase M. Park y colaboradores en el 2010 demostraron que las nanopartículas de plata provocan el arresto celular en G1 y el bloqueo total de la fase S con la inducción de la apoptosis. Los mecanismos de acción asociados con la toxicidad de las nanopartículas de plata describen en la figura 2.

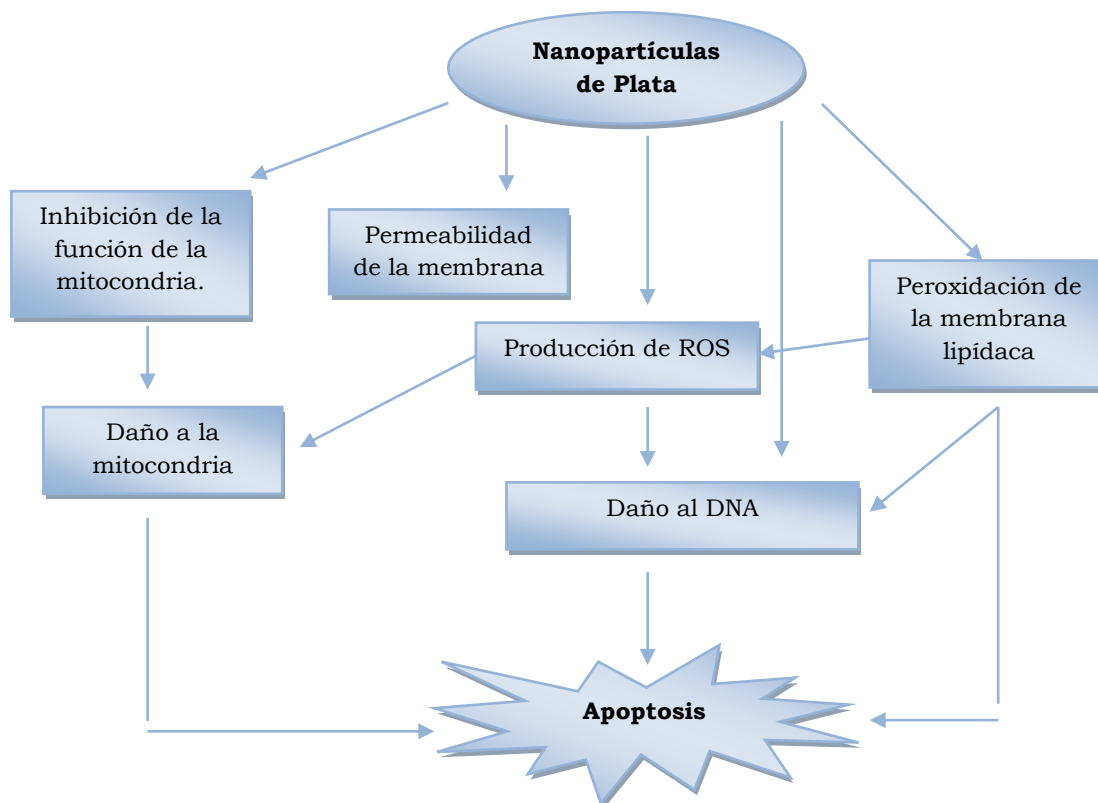


Figura 2. Mecanismos de acción asociados con la toxicidad de las nanopartículas (Ahamed et. al., 2010).

2.6 Mecanismos de daño al DNA inducidos por nanopartículas.

Las nanopartículas pueden ser capaces de penetrar en la célula a través de una serie de mecanismos (Figura 3) y posteriormente al núcleo ya sea mediante la difusión a través de la membrana nuclear (sí son lo suficientemente pequeños), a través de los complejos de poro nuclear, o que pueda llegar a ser encerrado en el núcleo después de la mitosis cuando la membrana nuclear se desensambla durante la división celular y luego se vuelve a ensamblar en cada célula hija. Si las nanopartículas se ubican en el núcleo, entonces la interacción directa entre ellas y la molécula de DNA o proteínas relacionadas con el DNA puede conducir a daño físico al material genético, como puede ser metilación del DNA, modificación de proteínas histonas (Singh et. al., 2009).

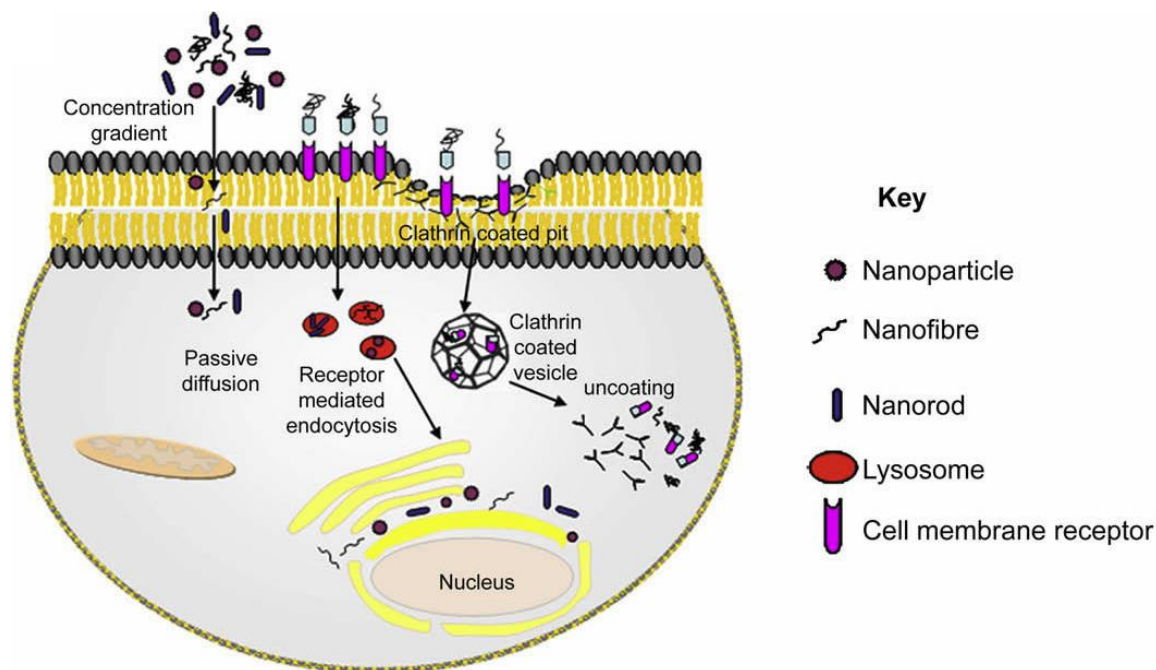


Figura 3. Posible entrada de nanopartículas a la célula (Singh et. al., 2009).

Los daños en el DNA se pueden dar a través de mecanismos indirectos, es decir, cuando las nanopartículas no se relacionan físicamente con la molécula del DNA, pero con otras proteínas celulares tales como las implicadas en el proceso de división celular. Además, pueden inducir a otras respuestas celulares que a su vez, conducen a la genotoxicidad, tales como el estrés oxidativo o la inflamación (figura 4) (Singh et. al., 2009).

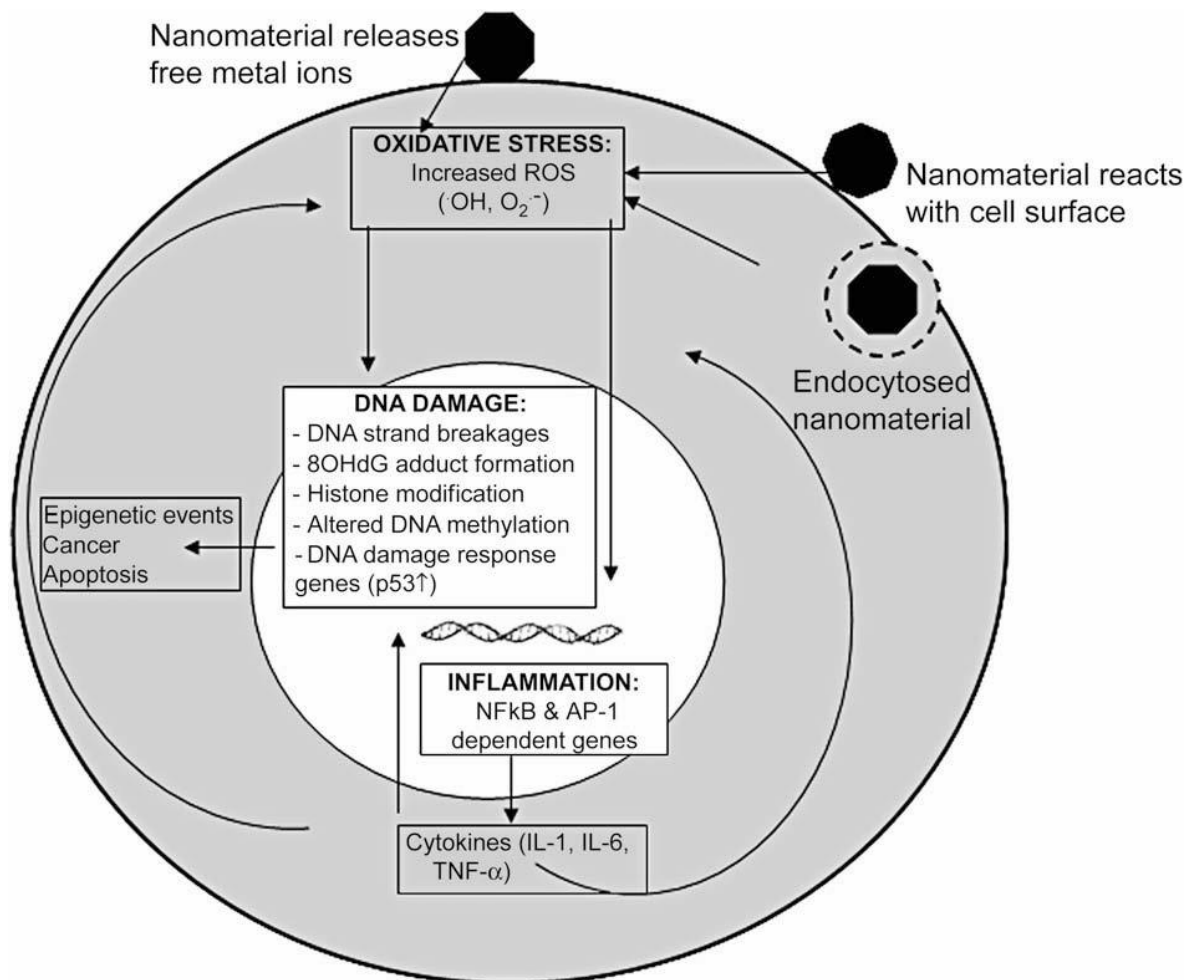


Figura 4. Mecanismos indirectos que pueden conducir a la genotoxicidad (Singh et. al., 2009).

La presencia de nanopartículas puede generar estrés oxidativo, con esto el daño al DNA de forma indirecta a través de roturas de la hebra de DNA, formación de aductos, modificación de proteínas como histonas, metilación del DNA así como el aumento de la expresión de proteínas como p53.

Capítulo 3. Micronúcleos

3.1 Prueba de micronúcleos.

Los micronúcleos (MN), también conocidos como cuerpos de Howell-Jolly en hematología, son restos de cromatina que se encuentran separados del núcleo principal y que se forman a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos o bien por aquellos cromosomas que sufren un rezago anafásico, los cuales son característicos por ser de forma redonda de un diámetro de 0.4-0.6 μ . Estos micronúcleos en condiciones patológicas aumentan en número, lo cual se puede asociar a un daño cromosómico.

En la década de los 70s el término de ensayo de micronúcleos fue sugerido por primera vez por Bolle, Schmidt y Heddle, quienes demostraron que esta prueba es un método simple para detectar el potencial genotóxico de los mutágenos después de la exposición *in vivo* en los animales, utilizando eritrocitos de la médula ósea. Años más tarde se demostró por Countryman y Heddle que se pueden utilizar linfocitos de sangre periférica para el ensayo de micronúcleo (Kirsch-Volders, 2006).

El uso de la técnica de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesta por primera vez por Countryman y Heddle en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica.

El año 1999 fue crucial para el ensayo de MN, ya que la técnica fue validada a nivel mundial y considerada como un biomarcador efectivo de daño al DNA. Para la validación se creó un programa internacional de micronúcleos humanos (*HUMN: HUMAN MicroNucleus Project*), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo (Zalacain et. al., 2005).

En los últimos años la prueba de micronúcleos *in vitro* se ha convertido en una herramienta atractiva para las pruebas de genotoxicidad debido a su simplicidad de puntuación y una amplia aplicación en diferentes tipos de células. Puesto que los dos mecanismos básicos que conducen a la formación de micronúcleos son roturas cromosómicas y las alteraciones de los mecanismos de segregación de los cromosomas, la inducción de micronúcleos requiere una división mitótica o meiótica y la evaluación de la división celular es primordial en presencia de la sustancia problema (Kirsch-Volders, 2006).

Actualmente la técnica se ha estandarizado en una gran variedad de tejidos y especies, realizándose en diferentes tipos de células como son: cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos policromáticos (EPC), células de la mucosa bucal y hepatocitos de rata, entre otros (Fenech et. al., 2000).

3.2 Sistemas de ensayo.

El ensayo *in vivo* es especialmente relevante para evaluar el riesgo de genotoxicidad, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo *in vivo*, la farmacocinética y los procesos de reparación del DNA, también es de suma importancia para el seguimiento de los efectos mutagénicos detectados mediante las pruebas de genotoxicidad *in vitro*. La evaluación de la frecuencia de micronúcleos *in vivo* es la principal prueba en un conjunto de pruebas de genotoxicidad y está recomendada por las agencias reguladoras en todo el mundo para llevar a cabo como parte de la evaluación de la seguridad del producto a comercializar. El ensayo *in vivo* cuando se realiza adecuadamente, puede detectar clastogenicidad (roturas cromosómicas) y aneugenicidad (retraso cromosómico) (Krishna y Hayashi, 2000).

El proceso de eritropoyesis y de mecanismo de formación de micronúcleos *in vivo* se estudia en los roedores, en órganos hematopoyéticos como son la médula ósea y el bazo. Durante la proliferación, las células continúan dividiéndose y si son administradas sustancias de estudio pueden actuar y causar daño a los cromosomas. Estas anomalías (fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros) pueden retardarse en la división celular y no pueden integrarse en los núcleos hijos, quedándose en el citoplasma en forma de micronúcleos (Krishna y Hayashi, 2000).

Durante la maduración, cuando un eritroblasto se transforma en un eritrocito policromático (EPC), (EPC, son eritrocitos jóvenes que contiene RNA, son basófilos y de color azul claro o azul grisáceo cuando son teñidos con Giemsa), el núcleo principal es expulsado, de esta forma estos eritrocitos quedan anucleados (Fenech et. al, 2000).

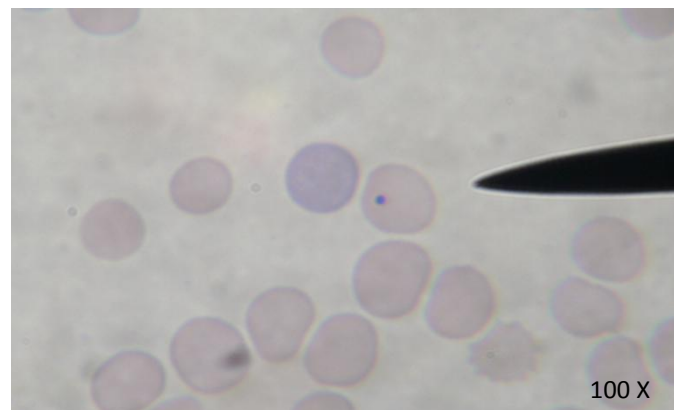


Figura 5. EPCMN en frotis de sangre periférica de ratón (Tinción con Giemsa). La flecha indica micronúcleos en eritrocitos policromáticos (Imagen tomada en el laboratorio de Citogenética de la FESC, 2010).

La visualización de los micronúcleos en eritrocitos es más práctica, pues estas carecen de núcleo principal. Un aumento en la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EPCMN) (Figura 5) en los animales de experimentación, tratados con xenobióticos es una sospecha de lesiones cromosómicas. Los EPCs, con el tiempo, pierden el RNA y contiene principalmente hemoglobina y se convierten en eritrocitos normocromáticos (ENC) (ENC, eritrocitos maduros, son más pequeños que los EPC, son acidófilos y se tiñen de color naranja claro o color naranja-rosado con Giemsa, figura 6). Estos dos tipos de eritrocitos, que se tiñen diferencialmente, se pueden ver en la médula ósea, el bazo y sangre periférica. (Krishna y Hayashi, 2000).

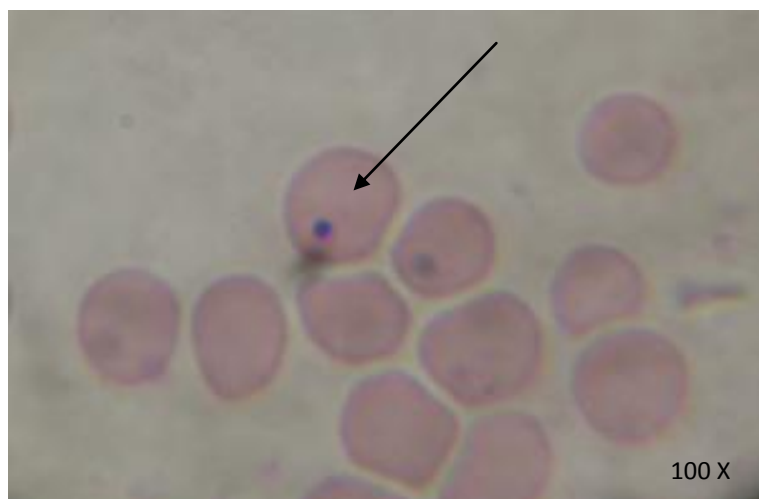


Figura 6. ENCMN en frotis de sangre periférica de ratón (Tinción con Giemsa). La flecha indica micronúcleo en eritrocito normocromático (Imagen tomada en el laboratorio de Citogenética de la FESC, 2010).

El estudio de micronúcleos se puede realizar utilizando eritrocitos jóvenes (EPC) obtenidos de sangre periférica, los cuales son considerados los más convenientes para dicho estudio, ya que facilitan la identificación del micronúcleo debido a que permanecen jóvenes de 24 a 48 horas (Domínguez M., 2005).

El ensayo de micronúcleos *in vivo* está diseñado principalmente para evaluar la capacidad de las sustancias de prueba para inducir lesiones cromosómicas. Estos daños están asociados con la aparición y/o progresión de tumores, y con resultados reproductivos adversos y de desarrollo (Krishna et. al., 2000).

El ensayo se puede realizar de dos formas:

- 1) Administración de la sustancia de prueba a los animales en una sola ocasión. Se extraen muestras de la médula ósea o de sangre periférica al menos dos veces.
- 2) Si efectúan varias administraciones en intervalos de 24 horas, la toma de muestra se harán cada 24 horas durante el tiempo de exposición (Domínguez M., 2005).

En la eritropoyesis en humanos (Figura 7), se da la formación de micronúcleos en médula ósea, la cual constituye un desarrollo continuo iniciando con la célula totipotencial seguida de la progresión normoblástica hasta llegar al eritrocito maduro. La vida media del eritrocito es aproximadamente de 120 días.

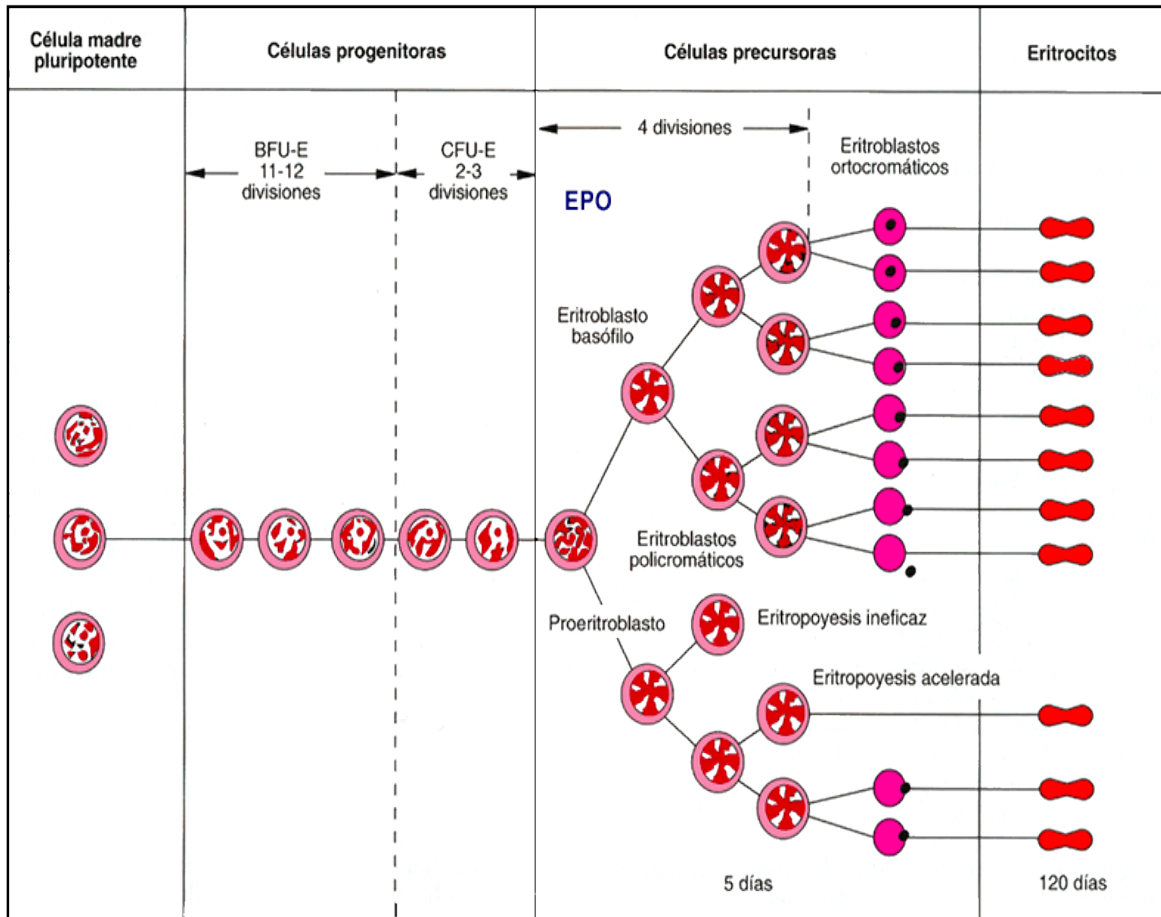


Figura 7. Eritropoyesis. (Imagen tomada de www.iqb.es/hematologia/atlas/eritropoyesis.htm, 2010)

El tiempo de vida de un eritrocito en ratón es de 30 días y se 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 aproximadamente 24 horas (Domínguez M., 2005).

El mecanismo de formación de micronúcleos en EPC (figura 8) se fundamenta de la siguiente forma: en anafase del ciclo celular, cualquier fragmento cromosómico que no tenga centrómero no podrá ser incorporado a un nuevo núcleo por no poder ser orientado hacia los polos de la célula por las fibras del huso acromático. En telofase, los cromosomas normales y los fragmentos que poseen centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas, los fragmentos de cromosomas rezagados (efecto clastogénico) o cromosomas completos (efecto aneuploidógeno) quedan rodeados del citoplasma de las células hijas formando núcleos secundarios conocidos como micronúcleos (Rocha Y., 2008).

La FDA recomienda para determinar genotoxicidad en el ensayo de micronúcleos, se analice 200 EPC en médula ósea y 1000 EPC en sangre periférica por cada animal. Para determinar la citotoxicidad se determine la relación entre los EPC y el total de eritrocitos (EPC + ENC) en un recuento de al menos 1000 eritrocitos si se trata de sangre periférica. (Rocha Y., 2008).

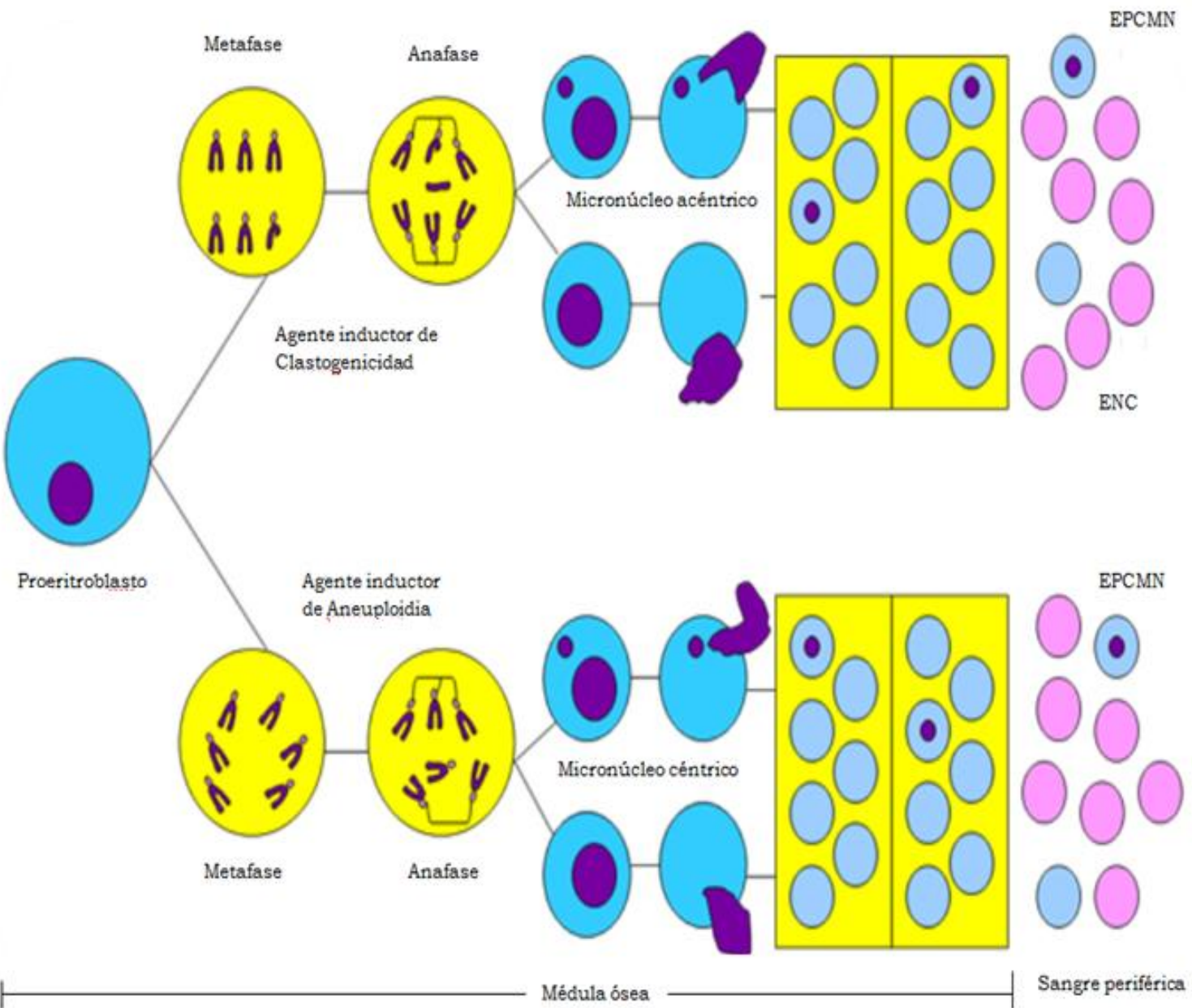


Figura 8. Formación de micronúcleos en eritroblastos de médula ósea. (Modificado de Domínguez M., 2005).

Antecedentes

Las diversas actividades biológicas encontradas en las nanopartículas de plata de acuerdo a su tamaño, tiempo de exposición y dosis en las que han sido administradas han sido estudiadas a nivel mundial en modelos en *in vivo* como en *in vitro* entre estas actividades se encuentra el efecto antiviral que han mostrado poseer.

En el 2010 el grupo del Dr. Pérez Ishiwara y del Dr. San Martín Martínez demuestran que las nanopartículas de plata de tamaño promedio de 3.75 nm poseen un efecto antiviral, esto demostrado a nivel clínico e histopatológico. La evaluación de este efecto se llevo a cabo en cepas de ratones CD1 y Balb/c; demostrando en el estudio que las nanopartículas de plata confieren un efecto protector parcial ante la virosis herpética, clínicamente los animales muestran menor severidad, las lesiones histopatológicas son menores mostrando una disminución en el proceso inflamatorio asociado a la lesión herpética y la carga determinada por PCR, aparentemente es menor en los tejidos de animales tratados con nanopartículas de plata a diferencia del control.

Justificación

Debido al incremento del uso de la nanotecnología, se ha elevado el riesgo asociado con la exposición a las nanopartículas, por eso es necesario ampliar los estudios relacionados con su toxicidad y genotoxicidad, ya que las nanopartículas de acuerdo a su tamaño son capaces de entrar en el cuerpo a través de la piel, pulmones o intestino, depositándose en varios órganos, causando reacciones biológicas adversas mediante la modificación de las propiedades físico-químicas a nanonivel de la materia viva.

Las nanopartículas de plata se han vuelto una parte importante para el tratamiento de diversas enfermedades las cuales requieren el mantenimiento de la concentración del fármaco en circulación o que están dirigidas a células u órganos específicos. Esta tesis tiene como objetivo evaluar si las nanopartículas de plata en fase proteica de tamaño promedio de 3.76 nm y de forma esférica puedan estar afectando el ciclo celular (Citotoxicidad) o dañar al DNA (Genotoxicidad) y poder contribuir al conocimiento sobre la toxicidad de éstas.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la actividad genotóxica de nanopartículas de plata en fase proteica a diferentes concentraciones en un ensayo *in vivo* en ratones CD1 con la prueba de micronúcleos con la finalidad de apoyar su uso terapéutico.

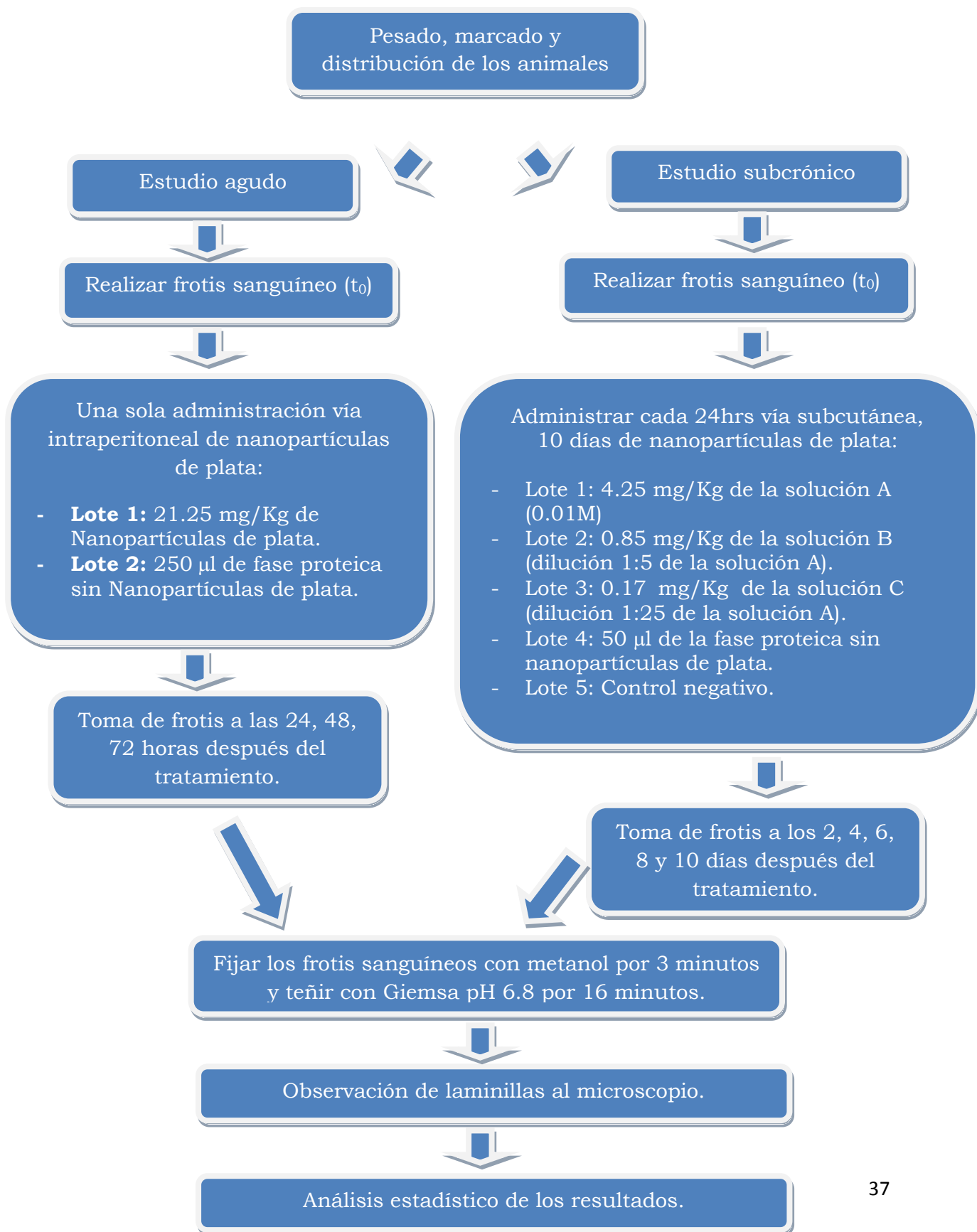
Objetivos particulares

Determinar la actividad genotóxica en un estudio agudo mediante la determinación de la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados a diferentes concentraciones con nanopartículas de plata en fase proteica y determinar la actividad citotóxica de éstas por medio del índice de EPC/ENC.

Determinar la actividad genotóxica en un estudio subcrónico mediante la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados a diferentes concentraciones de nanopartículas con plata en fase proteica y determinar la actividad citotóxica de éstas por medio del índice de EPC/ENC.

Determinar la actividad genotóxica en un estudio agudo y subcrónico mediante la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados con la fase proteica sin nanopartículas de plata y determinar la actividad citotóxica de esta fase por medio del índice de EPC/ENC.

Diagrama de flujo experimental



Material y métodos

Las nanopartículas de plata empleadas para esta investigación fueron producidas y caracterizadas en el laboratorio de tecnología avanzada de CICATA Legaria del IPN a cargo del Dr. Eduardo San Martín Martínez bajo el siguiente procedimiento:

Se prepararon soluciones de nitrato de plata a 0.01M, en agua desionizada. Se adicionaron 270 ml de la suspensión de proteína, previamente calentada, posteriormente se agregaron 4.50 ml de AgNO_3 (0.01M) y se adicionó D-Glucosa (agente reductor). Después se procedió a ajustar el pH de la solución de síntesis con solución de hidróxido de sodio al 12%. Las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas en cuanto a su forma y tamaño con un microscopio de transmisión [Marca: JEM. Modelo 1010 (100kv)].

Para los ensayos de genotoxicidad, se prepararon las siguientes diluciones: la solución de nanopartículas de plata inicial (AgNO_3 0.01M) a la cual se le denominó solución A (4.25 mg/kg); una dilución 1:5 de la anterior denominada B (0.17 mg/Kg) y la dilución 1:25, la cual se denominó C (0.17 mg/Kg). La fase proteica no lleva nanopartículas de plata.

Se utilizó como material biológico a 30 ratones macho del bioterio de Facultad de Estudios Superiores Iztacala de 17 a 23 gramos, de la cepa CD1, los cuales se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales (temperatura, luz) con agua y alimento ilimitado durante el desarrollo experimental.

Procedimiento para el estudio de micronúcleos en el ensayo agudo.

Se utilizaron 10 ratones de la cepa CD1, los cuales fueron pesados, marcados, distribuidos y administrados por vía intramuscular, la distribución de los lotes se hizo de la siguiente forma:

Tabla 3. Distribución de los lotes para el ensayo agudo.

Lote	Ratones utilizados	Dosis administrada
Lote 1	5 ratones	21.25 mg/Kg de peso de nanopartículas de plata dosis única.
Lote 2	5 ratones	250 µl de la fase proteica sin nanopartículas de plata dosis única.

Antes de ser administrados, a todos los animales se les tomó una muestra de sangre para realizar el frotis sanguíneo (t_0), la cual servirá como la basal de micronúcleos. Esto se realizó de la siguiente forma:

Se toma una gota de sangre periférica de ratón obtenida por un corte de la porción terminal de la cola, se deposita en un portaobjetos previamente rotulado, desengrasado y limpio, se realiza la extensión con ayuda de otro portaobjetos. Se deja secar al aire. Se realizan frotis sanguíneos después de la administración a cada ratón por duplicado a las 24, 48 y 72 horas.

Procedimiento para el estudio de micronúcleos en el ensayo subcrónico.

El ensayo subcrónico se llevó a cabo durante 10 días, con administraciones diarias por vía subcutánea. Se utilizaron 20 ratones de la cepa CD1, los cuales fueron pesados, marcados y distribuidos de la siguiente forma.

Tabla 4. Distribución de los lotes para el ensayo subcrónico.

Lote	Ratones utilizados	Dosis administrada
Lote 1	4 ratones	4.25 mg/Kg de peso de nanopartículas de plata.
Lote 2	4 ratones	0.85 mg/Kg de peso de nanopartículas de plata.
Lote 3	4 ratones	0.17 mg/Kg de peso de nanopartículas de plata.
Lote 4	4 ratones	50 µl de la fase proteica sin nanopartículas de plata.
Lote 5	4 ratones	Control negativo. No se administró.

Antes de ser administrados, a todos los animales se les tomó una muestra de sangre para realizar el frotis sanguíneo (t_0), la cual será tomada como la basal de micronúcleos. Se realizaron frotis sanguíneos después de la administración a cada ratón por duplicado a los días 2, 4, 6, 8 y 10 de estudio.

Las laminillas obtenidas de los estudios agudo y subcrónico se fijaron con metanol absoluto durante 3 minutos y se dejaron secar al aire. Posteriormente se realizó la tinción empleando el colorante de Giemsa, en buffer de fosfatos pH 6.8. Las laminillas se tiñeron por inmersión en un vaso Copplin, pasado el tiempo de exposición al colorante, las laminillas se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire.

Se analizaron las laminillas al microscopio, primero con el objetivo de 40X, en busca de regiones donde las células se encuentran separadas, intactas y perfectamente teñidas. Posteriormente se observaron con el objetivo de inmersión, donde los eritrocitos normocrómicos (maduros) se visualizan de un color rojo a rosa y de color azul para los eritrocitos policromáticos (inmaduros). Los micronúcleos se observan de forma redonda, de diámetro aproximado de 1/20 a 1/15 del eritrocito, son de color azul-violeta y son no refringentes.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico consistió en la evaluación de los siguientes parámetros:

- Evaluación genotóxica: Se determinó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC). También se llevo a cabo la determinación de la frecuencia de eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) en 1000 eritrocitos normocrómicos.
- Evaluación citotóxica: Se realizó la determinación de la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos totales (EPC + ENC).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo por medio del programa estadístico Graph Pad InStat versión 3.0, utilizó la prueba de ANOVA y la de comparación múltiple de Tukey-Kramer con una $p > 0.05$.

Resultados

Frecuencia de EPCMN en ensayo subcrónico.

En la figura 9 se presentan los resultados de los EPCMN en sangre periférica de ratón para las nanopartículas de plata en fase proteica. Se observa que al día 0, tanto el control negativo así como los grupos experimentales se mantienen en un rango estrecho entre 0.5 y 2.5, este valor se encuentra dentro de la basal de micronúcleos para la cepa de ratones CD-1 que es de 1 a 3 MN, el análisis estadístico indica que no hubo diferencias estadísticamente significativas y que los animales se encontraban en iguales condiciones al iniciar la experimentación. Al día 2 se observa un aumento en los lotes experimentales pero no muestran diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control negativo. Durante el día 4 y 6 se observa una disminución de la frecuencia de micronúcleos a comparación del día 2, pero siguen sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con el control negativo. En el día 8 y 10 se observa una elevación de la frecuencia de micronúcleos, el análisis estadístico indica que en estos días no hay diferencias estadísticamente significativas en comparación al control negativo.

Tabla 5. Promedios (x) de EPCMN \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.

Tiempo (días)	4.25 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	0.85 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	0.17 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	Fase proteica. (x) \pm (e.e)	Control negativo. (x) \pm (e.e)
Día 0	2.5 \pm (0.50)	1.5 \pm (0.29)	1.7 \pm (0.48)	0.5 \pm (0.29)	1.7 \pm (0.48)
Día 2	3.5 \pm (0.65)	4.0 \pm (0.70)	3.5 \pm (0.29)	5.0 \pm (0.70)	2.0 \pm (0.40)
Día 4	4.7 \pm (0.94)	2.7 \pm (1.45)	4.0 \pm (0.40)	2.5 \pm (0.50)	2.0 \pm (0.40)
Día 6	1.5 \pm (0.86)	3.5 \pm (0.95)	3.0 \pm (1.08)	2.5 \pm (0.28)	2.0 \pm (0.40)
Día 8	1.5 \pm (0.28)	3.5 \pm (1.04)	3.5 \pm (1.04)	5.2 \pm (0.25)	2.2 \pm (0.47)
Día 10	3.2 \pm (0.85)	5.0 \pm (1.22)	4.7 \pm (0.85)	4.2 \pm (0.75)	1.7 \pm (0.47)

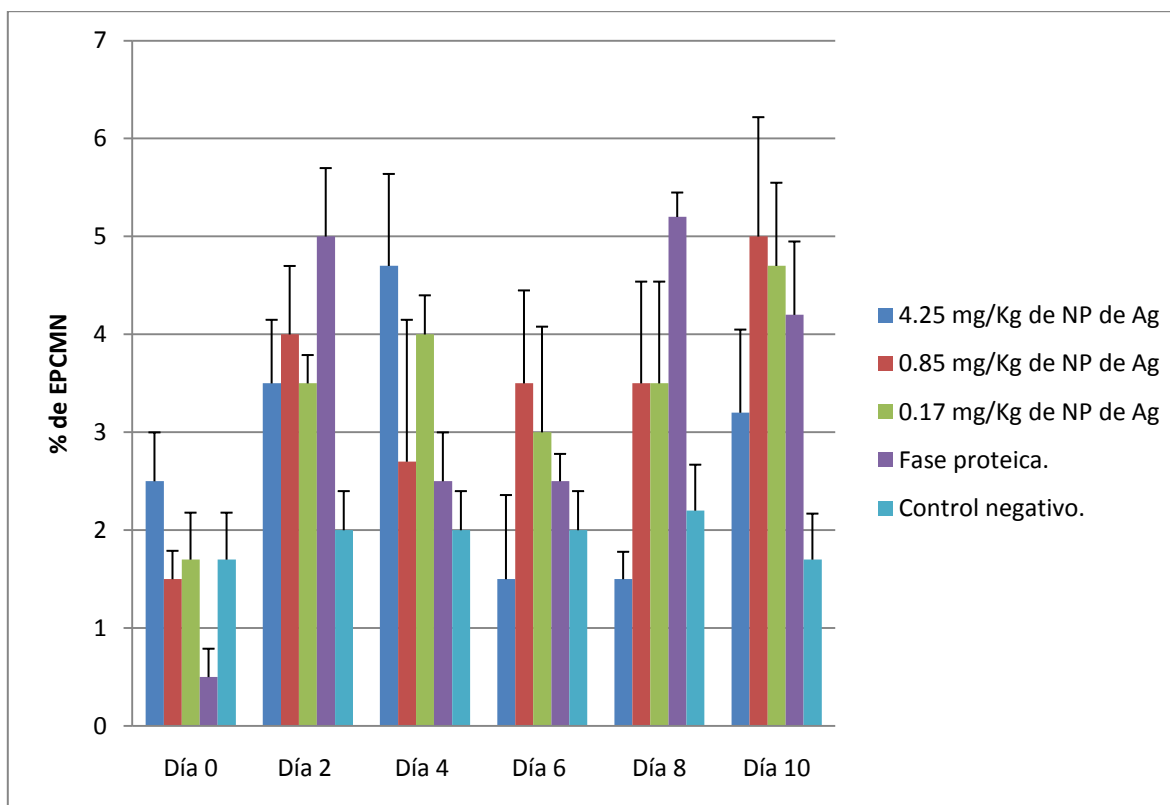


Figura 9. Porcentaje de frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en el ensayo subcrónico realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica. Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA, prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple $p > 0.05$.

Frecuencia de ENCMN en ensayo subcrónico.

En la figura 10 se muestran los resultados de la frecuencia de ENCMN en sangre periférica de ratón para las nanopartículas de plata en fase proteica. Se observa en el gráfico que al día 0 muestran una frecuencia de entre 3.5 y 7.25, el análisis estadístico indica que no hay diferencias estadísticamente significativas y con esto se puede decir que los animales se encontraban en iguales condiciones.

Al realizar las pruebas estadísticas para los días 2, 4, 6, 8 y 10 con el análisis de varianza y la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni entre el tiempo ni la dosis con respecto al control negativo.

Tabla 6. Promedios (x) de ENCMN \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.

Tiempo (días)	4.25 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	0.85 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	0.17 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	Fase proteica. (x) \pm (e.e)	Control negativo. (x) \pm (e.e)
Día 0	5.25 \pm (1.10)	5.75 \pm (0.62)	7.25 \pm (0.85)	6.0 \pm (2.04)	3.75 \pm (0.48)
Día 2	5.25 \pm (0.85)	5.25 \pm (0.47)	5.0 \pm (0.29)	6.5 \pm (1.75)	4.5 \pm (0.64)
Día 4	6.25 \pm (1.03)	6.5 \pm (0.28)	5.5 \pm (0.64)	5.25 \pm (0.75)	3.0 \pm (0.57)
Día 6	7.5 \pm (1.70)	4.25 \pm (1.03)	5.5 \pm (1.55)	4.25 \pm (1.43)	2.75 \pm (0.47)
Día 8	4.5 \pm (0.64)	4.75 \pm (1.10)	5.25 \pm (1.10)	5.5 \pm (1.55)	4.0 \pm (0.40)
Día 10	4.25 \pm (0.25)	6.25 \pm (1.49)	6.75 \pm (1.03)	4.25 \pm (0.62)	3.75 \pm (0.47)

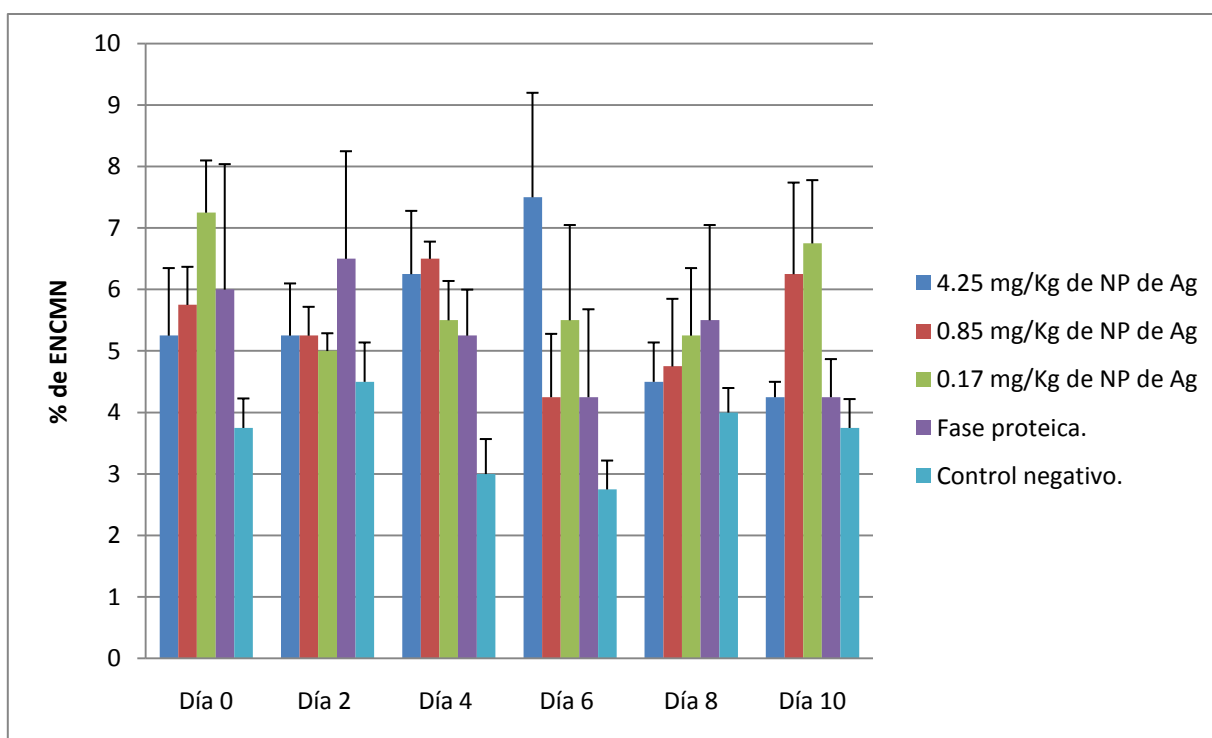


Figura 10. Porcentaje de frecuencia de ENCMN en 1000 ENC en el ensayo subcrónico realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica. Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA, prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple $p > 0.05$.

Frecuencia de EPC en ensayo subcrónico.

En la figura 11 se muestran los resultados de la relación de EPC con respecto a ENC en sangre periférica de ratón para las nanopartículas de plata en fase proteica. Se muestra en el gráfico que al día 0 los lotes experimentales se mantienen en un rango de 39 y 58.25 lo cual indica que no hubo diferencias estadísticamente significativas y que los animales se encontraban en iguales condiciones.

Para el día 2 se muestra una pequeña elevación de la frecuencia aunque no es estadísticamente significativa. Los demás días de estudio no muestran diferencias estadísticas respecto al control negativo.

Tabla 7. Promedios (x) de EPC \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.

Tiempo (días)	4.25 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	0.85 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	0.17 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	Fase proteica. (x) \pm (e.e)	Control negativo. (x) \pm (e.e)
Día 0	58.25 \pm (8.10)	45.0 \pm (14.1)	39.0 \pm (10.6)	46.75 \pm (7.7)	51.75 \pm (1.25)
Día 2	73.25 \pm (9.75)	60.0 \pm (7.15)	52.0 \pm (4.12)	83.5 \pm (9.52)	66.75 \pm (7.2)
Día 4	103 \pm (8.39)	70.7 \pm (1.54)	70.0 \pm (11.43)	52.0 \pm (4.08)	56.50 \pm (3.92)
Día 6	52.75 \pm (5.49)	52.2 \pm (7.43)	51.25 \pm (8.29)	55.2 \pm (3.66)	57.25 \pm (4.49)
Día 8	52.7 \pm (4.49)	41.2 \pm (4.55)	31.0 \pm (5.59)	55.5 \pm (10.3)	56.0 \pm (3.71)
Día 10	65.5 \pm (14.0)	56.5 \pm (2.42)	46.0 \pm (5.93)	49.7 \pm (3.44)	46.75 \pm (1.75)

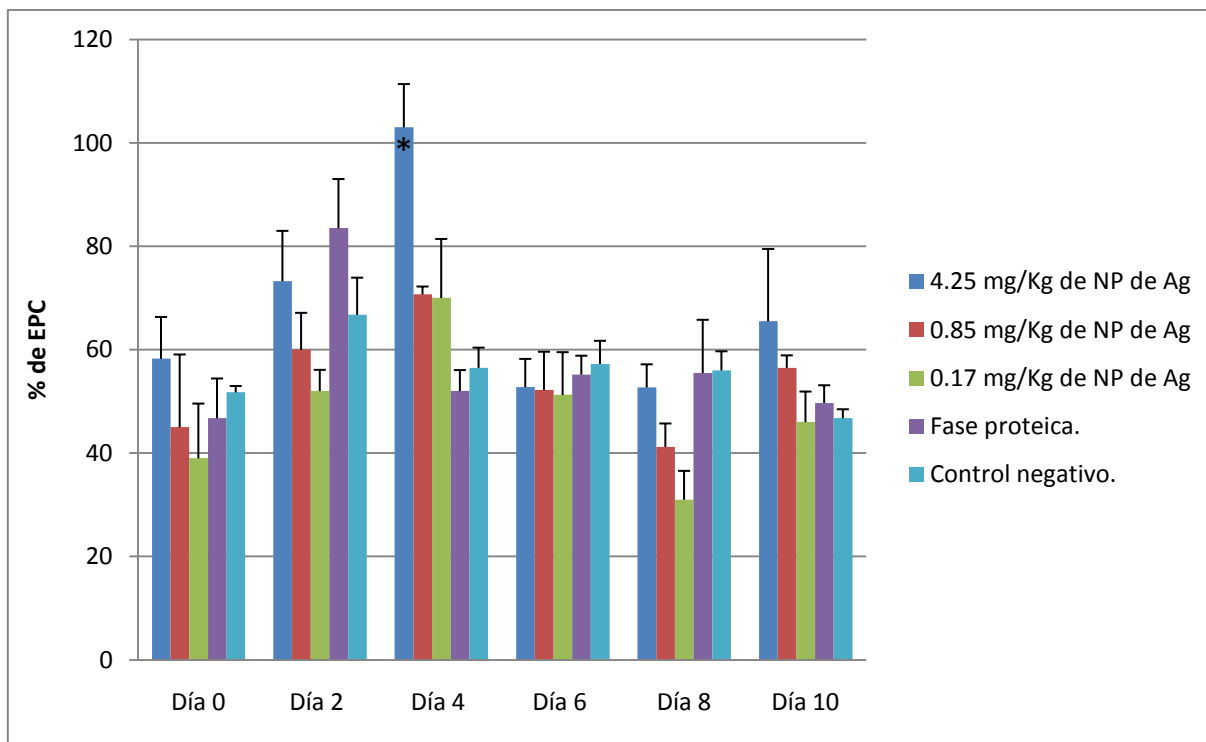


Figura 11. Porcentaje de frecuencia de EPC / EPC+ENC en el ensayo subcrónico realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica. Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA, prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple $p > 0.05$. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al t(0) del mismo lote $p > 0.05$.

Frecuencia de EPCMN en ensayo agudo.

En la figura 12 se presentan los resultados de los EPCMN en sangre periférica de ratón para las nanopartículas de plata en fase proteica. Se observa que en el tiempo 0, tanto el control negativo así como los grupos experimentales se mantiene en un rango estrecho entre 1.2 a 1.6 lo cual indica que no hubo diferencias estadísticamente significativas y que los animales se encontraban en iguales condiciones.

A las 24 y 48 horas se observa un aumentado en la frecuencia de micronúcleos en los lotes experimentales pero no muestran diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control negativo. En el tiempo de 72 horas se observa una disminución de la frecuencia de micronúcleos a comparación al tiempo de 48 horas, pero siguen sin mostrar diferencias estadísticas respecto al control negativo.

Tabla 8. Promedios (\bar{x}) de EPCMN \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.

Tiempo (hrs)	21.25 mg/Kg de NP de Ag (\bar{x}) \pm (e.e)	Fase proteica. (\bar{x}) \pm (e.e)	Control negativo. (\bar{x}) \pm (e.e)
0 horas	1.6 \pm (0.24)	1.2 \pm (0.20)	1.60 \pm (0.24)
24 horas	2.0 \pm (0.31)	1.8 \pm (0.37)	2.0 \pm (0.48)
48 horas	3.0 \pm (0.70)	3.6 \pm (0.50)	2.0 \pm (0.48)
72 horas	1.8 \pm (0.37)	2.0 \pm (0.31)	2.2 \pm (0.47)

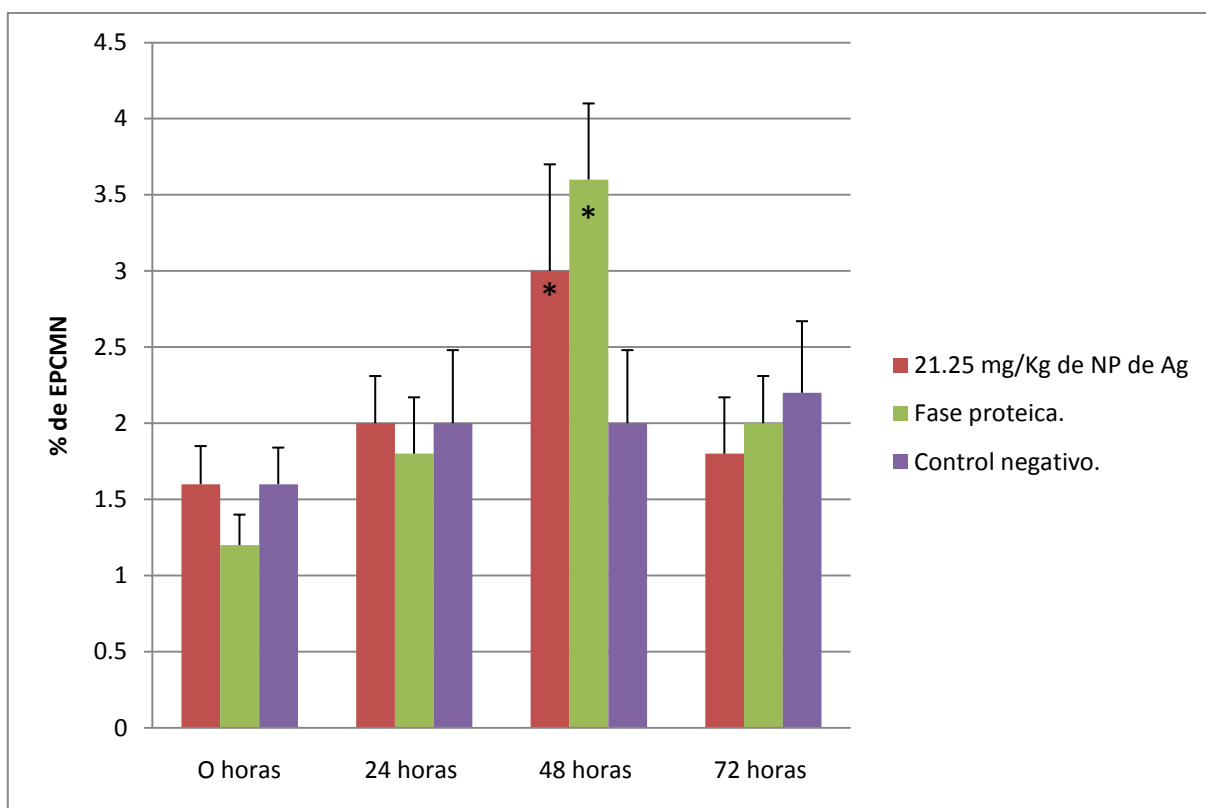


Figura 12. Porcentaje de frecuencia de EPCMN en el ensayo agudo realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica. Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA, prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple $p > 0.05$.

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al t(0) del mismo lote $p > 0.05$.

Frecuencia de ENCMN en ensayo agudo.

En la figura 13 se muestran los resultados de la frecuencia de ENCMN en sangre periférica de ratón para las nanopartículas de plata en fase proteica. Se observa en el gráfico que al tiempo 0 muestran una frecuencia de entre 1.8 y 3.7, el análisis estadístico indica que no hay diferencias estadísticamente significativas y con esto se puede decir que los animales estaban en iguales condiciones.

Al realizar las pruebas estadísticas para los tiempos de 24, 48 y 72 horas con el análisis de varianza y la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple, no se encontró diferencias estadísticamente significativas ni entre el tiempo ni la dosis con respecto al control negativo.

Tabla 9. Promedios (x) de ENCMN \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.

Tiempo (hrs)	21.25 mg/Kg de NP de Ag (x) \pm (e.e)	Fase proteica. (x) \pm (e.e)	Control negativo. (x) \pm (e.e)
0 horas	2.4 \pm (0.97)	1.8 \pm (0.37)	3.7 \pm (0.48)
24 horas	6.0 \pm (0.70)	5.6 \pm (0.92)	4.5 \pm (0.64)
48 horas	5.2 \pm (0.73)	4.4 \pm (0.50)	3.0 \pm (0.57)
72 horas	3.0 \pm (0.44)	4.0 \pm (0.44)	2.75 \pm (0.47)

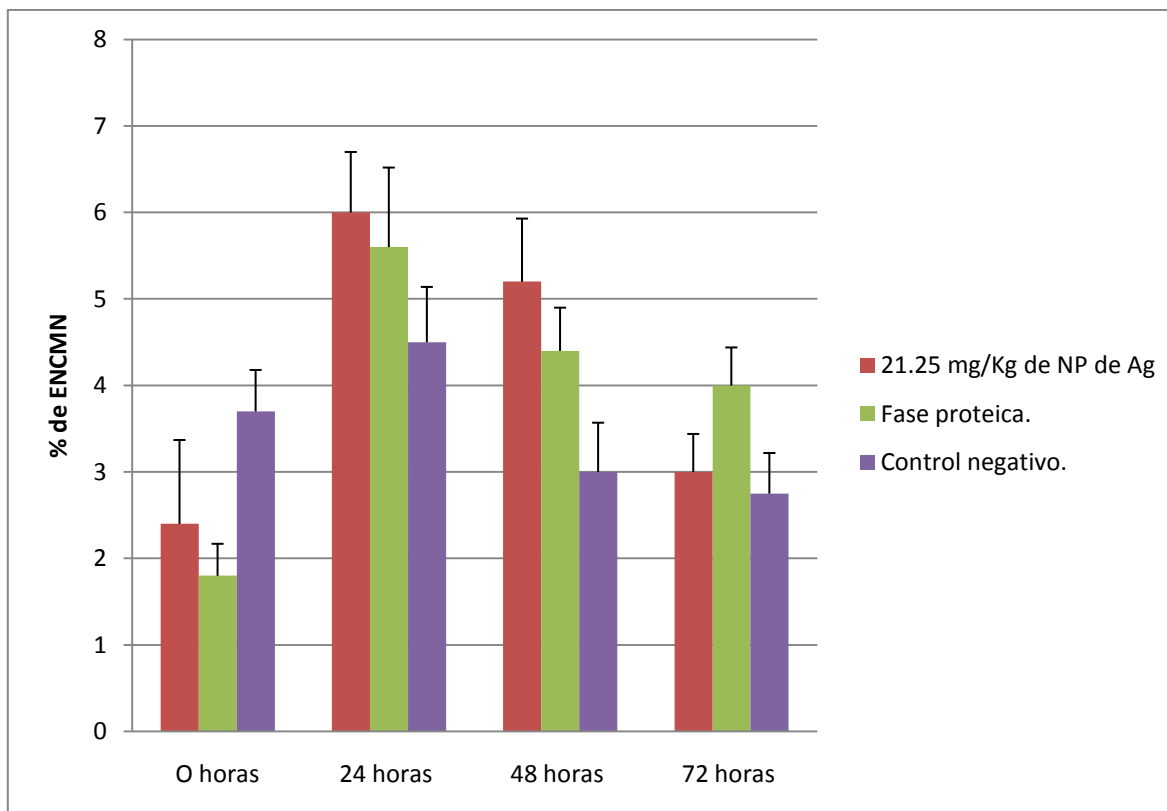


Figura 13. Porcentaje de frecuencia de ENCMN en el ensayo agudo realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica. Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA, prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple $p > 0.05$.

Frecuencia de EPC en ensayo agudo.

En la figura 14 se muestran los resultados de la relación de EPC con respecto a ENC en sangre periférica de ratón para las nanopartículas de plata en fase proteica. Se muestra en el gráfico que a tiempo 0 los lotes experimentales se mantienen en un rango de 45 y 51.75 lo cual indica que no hubo diferencias estadísticamente significativas y por lo tanto los animales se encontraban en iguales condiciones.

Al realizar las pruebas estadísticas para los tiempos de 24, 48 y 72 horas con el análisis de varianza y la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni entre el tiempo ni la dosis con respecto al control negativo.

Tabla 10. Promedios (\bar{x}) de EPC \pm error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos en las diferentes concentraciones de Nanopartículas de Ag en fase proteica.

Tiempo (hrs)	21.25 mg/Kg de NP de Ag (\bar{x}) \pm (e.e)	Fase proteica. (\bar{x}) \pm (e.e)	Control negativo. (\bar{x}) \pm (e.e)
0 horas	46.6 \pm (2.65)	45 \pm (3.54)	51.75 \pm (1.25)
24 horas	44.6 \pm (2.48)	49.2 \pm (1.88)	66.75 \pm (7.2)
48 horas	53.2 \pm (4.07)	57.0 \pm (3.05)	56.50 \pm (3.92)
72 horas	49.4 \pm (2.97)	48.4 \pm (2.61)	57.25 \pm (4.49)

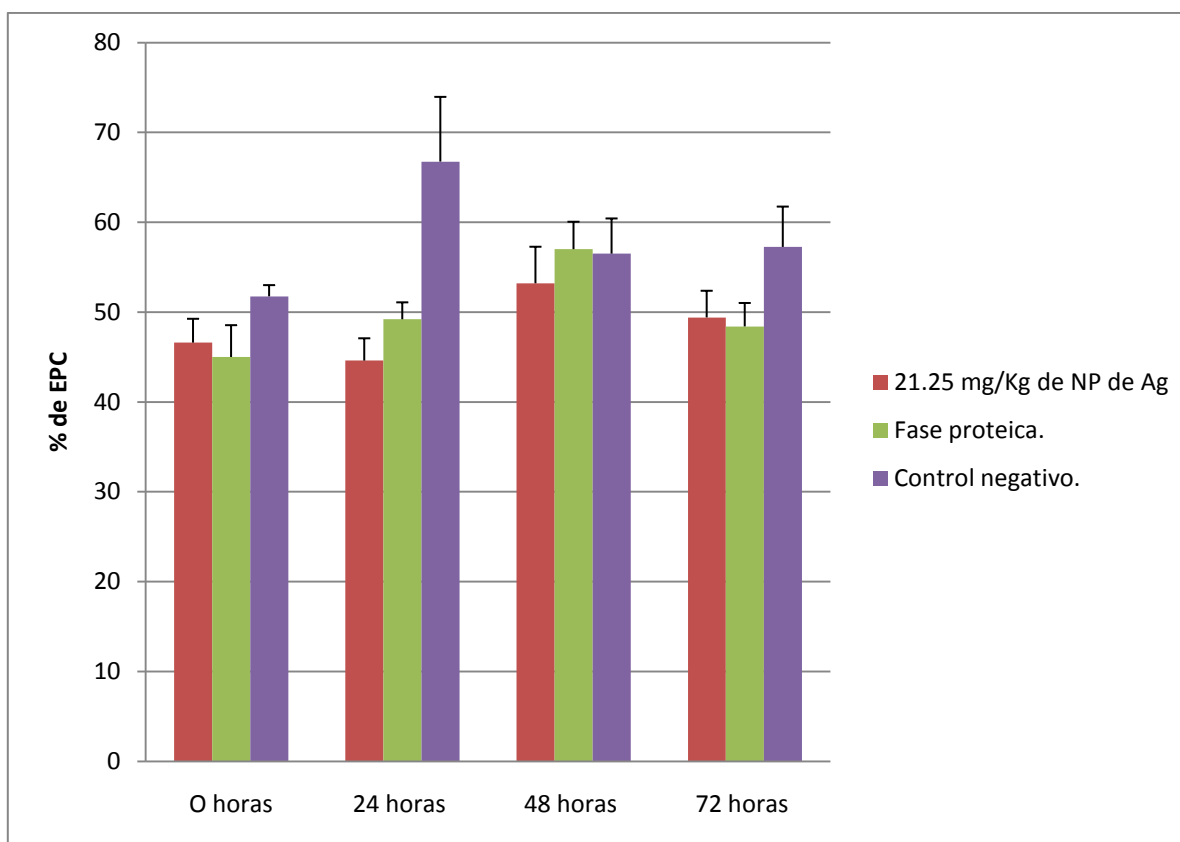


Figura 14. Porcentaje de frecuencia de EPC/EPC+ENC en el ensayo agudo realizado a las Nanopartículas de Ag en fase proteica. Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA, prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple $p > 0.05$.

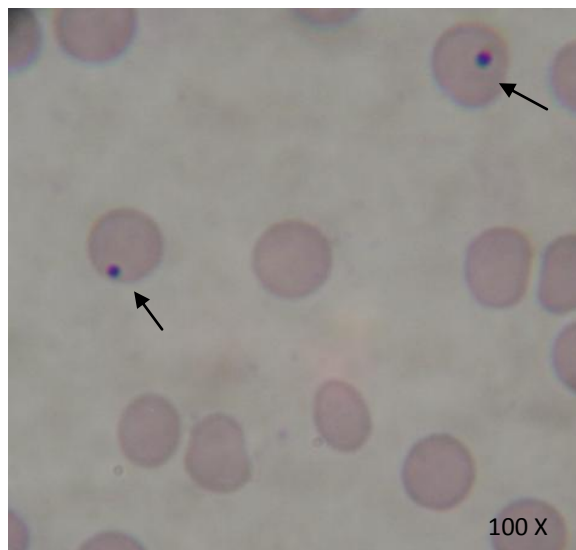


Figura 15. Frotis sanguíneo de ratón (Tinción con Giemsa). Las flechas indican eritrocito normocrómico micronucleado. (Imagen tomada en el laboratorio de Citogenética de la FESC, 2010).

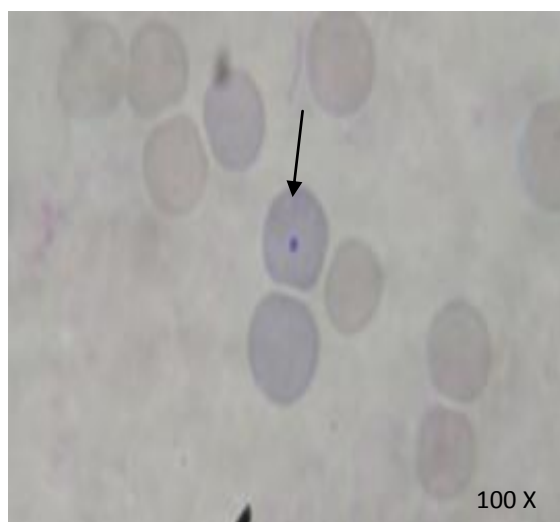


Figura 16. Frotis sanguíneo de ratón (Tinción con Giemsa). La flecha indica eritrocito policromático micronucleado. (Imagen tomada en el laboratorio de Citogenética de la FESC, 2010).

Discusión

La nanotecnología y la producción de nanopartículas está creciendo rápidamente, ya que éstas se están utilizando en una amplia gama de productos comerciales en todo el mundo. Las nanopartículas de plata se utilizan en: electrónica, prendas de vestir, la industria de alimentos, pinturas, protectores solares, cosméticos, dispositivos médicos y como biomarcadores. Por lo cual, esto ha aumentado el riesgo potencial en relación con su toxicidad a corto y largo plazo (Ahamed et. al., 2010).

En la presente investigación se buscó un ensayo que permitiera evaluar la genotoxicidad de las NP de Ag tanto en una exposición aguda, como en una subcrónica; ya que en el primero de los casos se interesaba conocer el potencial mutagénico que tienen estas nanopartículas a concentraciones altas. Por otro lado, comúnmente la exposición subcrónica permite evaluar los efectos de un xenobiótico a mediano plazo, así como estudiar otros aspectos de su acción genotóxica como por ejemplo, su acumulación y acción sobre células blanco (Hayashi et. al., 2000).

El ensayo de MN *in vivo* fue el elegido, ya que como lo indican varios estudios realizados a diversas sustancias, el daño al material genético expresado como rupturas y rezagos cromosómicos es una clara idea del daño genotóxico y por ende el riesgo mutagénico que puede poseer una sustancia tanto en ensayos agudos como subcrónicos (Hayashi et. al., 2000).

Los resultados en el ensayo agudo muestran que a la dosis de 21.25 mg/Kg y de tamaño promedio de 3.7 nm de NP de Ag la frecuencia de EPCMN a las 48 horas presentó una inducción mayor de 3 EPCMN en 1000 EPC siendo esto, estadísticamente significativo con respecto a su tiempo 0.

Con respecto al control negativo no mostró diferencias estadísticas en ninguno de los tiempos en que las muestras fueron evaluadas. En contraste con esto, se puede mencionar que un agente inductor de MN en EPC como la ifosfamida, puede generar una frecuencia estadísticamente significativa de 12 a 24 EPCMN por 1000 EPC a las 48 horas de haber sido administrada a la dosis de 60 mg/Kg y permanecer siendo estadísticamente significativo este valor aún a las 72 horas después del tratamiento (Rocha Y, 2008 y Alvares G., et. al., 2001). Estos resultados hacen concluir que en una administración única de 21.25 mg/Kg de NP de Ag su inducción de micronúcleos no se considera genotóxica y por lo tanto no son clastogénicos o aneugénicos.

Ahamed y colaboradores en el 2010, en estudios *in vitro* e *in vivo* realizados a nanopartículas de plata, indican que la genotoxicidad va a estar dada por el tamaño de la nanopartícula, la dosis administrada y el tiempo de exposición, lo que nos ayuda a explicar los resultados obtenidos por AshaRabi y colaboradores en el 2008, donde se reporta genotoxicidad en este tipo de nanopartículas de plata, las cuales a una concentración de 100 y 200 µg/ml y un tamaño de 25 nm indujeron de 10 y 13 MN en 1000 células binucleadas respectivamente; se podría suponer que los resultados obtenidos en este trabajo fueron negativos en genotoxicidad debido al tamaño inferior de las NP de Ag y también al sistema que este fue *in vivo*.

En relación a la acción citotóxica en el ensayo agudo, al comparar el lote administrado con ifosfamida a una dosis de 60 mg/Kg reportado por Álvarez y colaboradores en el 2001 y Rocha en el 2008, los cuales mostraron en ambos estudios descensos significativos en su frecuencia de EPC por 1000 células a las 72 hrs después de la administración, observando un claro efecto citotóxico.

Los valores de frecuencia de EPC en este estudio siempre se mantuvieron constantes para el ensayo agudo, el cual fue en promedio de 48 EPC por 1000 células, mostrando no ser significativo con respecto al control negativo, lo que hace pensar que a la dosis de 21.25 mg/Kg de NP de Ag de tamaño promedio de 3.7 nm y al tiempo de exposición de éstas no mostraron ser citotóxicas. En el estudio de Villegas en el 2009 utilizando una dosis de 4.25 mg/Kg de NP de Ag vía transtraqueal no presentó datos de citotoxicidad en los órganos estudiados, como podrían ser edema celular, necrosis o apoptosis cuando los tejidos fueron evaluados al microscopio electrónico. Indicando con estos resultados que en una administración aguda a la dosis empleada de Np de Ag no muestran ser genotóxicas ni citotóxicas.

Los EPC con el tiempo se convierten en ENC y permanecen en circulación periférica en el ratón hasta por 30 días, por lo tanto es posible adecuar el ensayo de MN para evaluar el daño clastogénico y aneugénico de manera subcrónica. Los animales se expusieron por un periodo de 10 días lo cual se considera como un lapso de tiempo apropiado para determinar un efecto acumulativo y persistente que permita evidenciar si a mayores tiempos de exposición aparece una respuesta genotóxica, la cual como se vio en el ensayo agudo anterior fue negativa cuando las NP de Ag se administraron a una dosis alta por una sola ocasión.

Los resultados en el ensayo subcrónico mostraron que a las dosis de 4.25, 0.85 y 0.17 mg/Kg de NP de Ag la frecuencia de EPCMN no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo en ninguno de los tiempos en que las muestras fueron evaluadas. La mayor inducción fue de 4.7 EPCMN en 1000 EPC, a diferencia de un agente inductor de MN como lo es la ifosfamida que puede generar una frecuencia de 12 a 24 EPCMN por 1000 EPC a las 48 horas de haber sido administrada a la dosis de 60 mg/Kg y seguir siendo estadísticamente significativo este valor aún a las 72 horas después del tratamiento (Rocha Y., 2008 y Álvarez G. et. al., 2001), lo que deja en claro que

dichas NP de Ag a las dosis utilizadas y tiempos de exposición no son un agente clastogénico o aneugénico que pueda causar un efecto genotóxico.

En relación a la citotoxicidad evaluada en el ensayo subcrónico a las dosis de 4.25, 0.85 y 0.17 mg/Kg de NP de Ag no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, mostrando una frecuencia de 55 EPC en 1000 células, lo que nos hace pensar que las NP de Ag a un tiempo de exposición mayor y a las dosis utilizadas no son citotóxicas. Así mismo confirmando estos resultados con los de Villegas en el 2009 utilizando las dosis, el tiempo de exposición y vía de administración similar reportó que no se observan daños de citotoxicidad evaluados en los estudios histopatológicos y de microscopia electrónica como podrían ser edema celular, necrosis o apoptosis en los órganos evaluados.

Los resultados obtenidos en el ensayo agudo con la fase proteica sin nanopartículas de plata mostraron en la frecuencia de EPCMN a las 48 horas una inducción mayor de 3.6 EPCMN en 1000 EPC siendo estadísticamente significativo con respecto a su tiempo 0. Con respecto al control negativo no mostró diferencias estadísticas en ninguno de los tiempos en que las muestras fueron evaluadas. Así mismo, se observa para el ensayo subcrónico que la frecuencia de EPCMN al día 2 tiene una inducción 5.2 EPCMN en 1000 EPC siendo estadísticamente significativo con respecto a su tiempo 0. Con respecto al control negativo no se muestra diferencias estadísticas en ninguno de los tiempos en que las muestras fueron evaluadas. Estos resultados nos hacen concluir que a las dosis utilizadas y tiempos de exposición la inducción de MN no tiene relevancia biológica como sería por ejemplo el efecto que induce ifosfamida reportado por Alvares y colaboradores en el 2001 y Rocha en el 2008. A pesar de éstos resultados se sugiere que se realicen pruebas de genotoxicidad de mayor sensibilidad para el estudio de esta fase proteica, como lo son el estudio de Intercambio de Cromátides Hermanas o ensayo cometa.

En relación a la actividad citotóxica de la fase proteica sin NP de Ag en los ensayos agudo y subcrónico se observa que no existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo en ninguno de los tiempos en que las muestras fueron evaluadas. Se puede decir que la fase proteica sin nanopartículas de plata no es un agente que pueda estar afectando el ciclo celular.

El resultado de esta investigación pone de manifiesto que la NP de Ag de tamaño de 3.7 nm a las dosis utilizadas, tiempos de exposición y vías de administración no son genotóxicas ni citotóxicas. Es importante que en un futuro se sigan realizando estudios de genotoxicidad y citotoxicidad de mayor sensibilidad, incrementando los tiempos de exposición y las dosis utilizadas, para que estas NP de Ag puedan ser consideradas como una alternativa efectiva, terapéuticamente hablando, así como también a la fase en que sean administradas.

Conclusiones

Las nanopartículas de plata en fase proteica de tamaño promedio de 3.7 nm y de forma esférica no incrementan la frecuencia de EPCMN a las dosis, vías de administración y tiempo de exposición utilizados lo que indica que estas nanopartículas de plata no son genotóxicas.

En nuestros estudios agudo y subcrónico no se observó un incremento o disminución de la frecuencia EPC por lo que las nanopartículas de plata en fase proteica de tamaño promedio de 3.76 nm y de forma esférica no son citotóxicas a las dosis y tiempos de exposición.

Se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad de la fase proteica sin nanopartículas de plata, dando como resultado de nuestros ensayos que no presenta actividad genotóxica, ni citotóxica.

Referencias

- Agnihotri Sunil A., Nadagouda Mallikarjuna N., Tejraj Aminabhavi M., (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100,1:5-28.
- Ahamed M., Mohamad S., AlSalhi, M.K.J., (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta* 11942:9-16
- Al-Qadi S., Remuñán López., (2000). Nanopartículas metálicas: oro. *Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.*
- Alvarez G., Madrigal Bujaidar E., Dorado V., Espinosa Aguirre J.J., (2001). Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse, and evaluation of its modulatory effect on the Cyp3a subfamily. *Mutation Research* 480–481:171–178.
- Arora, S., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M., (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 236:310–318.
- AshaRani P. V., Grace Low Kah Mun, Manoor Prakash Hande, Suresh Valiyaveettil., (2009). Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *American Chemical Society* 3,2:279–290.
- Boletín estadístico y tecnológico. (2009). Nanotecnología. 1852-3110. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Argentina. Disponible en www.mincyt.gov.ar/indicadores/banco.../bet_nano_completo.pdf consultado en 20 de mayo de 2010.

-
- Chen X., Schluesener H. J., (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* 176:1–12.
 - Cherian A.K., Rana A. C., (2000). Self-assembled carbohydrate-stabilized ceramic nanoparticles for the parenteral delivery of insulin. *Drug Dev Ind Pharm* 26: 459–463.
 - Diagnostico y prospectiva de la nanotecnología en México. Disponible en: www.nanored.org.mx/.../Diagnostico%20y%20Prospectiva%20Nanotecnologia%20en%20. Consultada el 22 de mayo de 2010.
 - Domínguez Rojas M., (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. 39.
 - Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* (455):81-95.
 - Gocke Elmar, (1996). The micronucleus test: its value as a predictor of rodent carcinogens versus its value in risk assessment. *Mutation Research* 352: 189-190.
 - Goycoolea F. M., (2007). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.
 - Hayashi M., James T. MacGregor, David G. Gatehouse, Ilse Dore Adler, David H. Blakey, Stephen D. Dertinger, Gopala Krishna, Takeshi Morita, Antonella Russo, Shizuyo Sutou, (2000). In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. II. Some Aspects of Protocol Design Including

Repeated Treatments, Integration With Toxicity Testing, and Automated Scoring Environmental and Molecular Mutagenesis. 35:234-252.

- Hsin Yi-Hong, Chun-Feng Chen, Shing Huang, Tung-Sheng Shih, Ping-Shan Lai, Pin Ju Chueh, (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters* 179,3:130-139.
- Kirsch-Volders M., (2006). The *in vitro* micronucleus test: From past to future. *Mutation Research*. 607:2-4.
- Krishna A., Makoto Hayashi, (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research* 455:155-166.
- Lanza Gregory, Anne Morawski M., Samuel Wickline A., (2005). Targeted contrast agents for magnetic resonance imaging and ultrasound. *Current Opinion in Biotechnology* 16,1:89-92.
- Li Y., Leung P., Yao L., Song Q.W., Newton E., (2006). Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *Journal of Hospital Infection* 62,1:58-63.
- Medina C., Santos Martinez M.J., Radomski A., Corrigan O.I., Radomski M.W., (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*. 150: 552-558.
- Park, K., Eun-Jung Park, Jongheop Yi, Younghun Kim, Kyunghee Choi, (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro* 24,3:872-878.

-
- Rocha Y., (2008). Estudio genotóxico mediante la prueba de micronúcleos del compuesto Tioformolínico LQM 319. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
 - Salata O. V., (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2: 123-131
 - Sarker D. K., Ghaleb Hussein A., William Pitt G., (2005). Engineering of nanoemulsions for drug delivery. *Curr Drug Deliv* 2: 297–310.
 - Singh N., Bella Manshian, Gareth Jenkins S.J., Sioned Griffiths M., Paul Williams M., Thierry Maffeis G.G., Chris Wright J., Shareen Doak H., (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials* 30: 3891–3914.
 - Tang J., Greulich C., Diendorf J., Simon T., Eggeler G., Epple M., Köller M., (2009). Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 9,49:24–32.
 - Villegas Bastida 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.
 - www.iqb.es/hematologia/atlas/eritropoyesis.htm
 - Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A., (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28 (2): 227-236.