



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias

Efecto citotóxico y genotóxico
de la plata *in vitro*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA

M. en C. María de los Angeles Aguilar Santamaría

Director de Tesis:

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Comité Tutor

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz
Facultad de Ciencias, UNAM

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
Facultad de Ciencias, UNAM

México D. F.

Enero 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***A mis padres:
Guadalupe Santamaría Loyo
Nemesio Aguilar Blanco[†]***

Agradecimientos

Al **Dr. José Miguel Betancourt Rule**, Director de esta Tesis por su paciencia y apoyo a lo largo de muchos años.

A la **Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz**, integrante del Comité Tutorial, cuyas enseñanzas contribuyeron a fortalecer mi rigor científico y porque la confianza que mostró en la última etapa para obtener el Grado Académico me alentó a lograrlo.

Al **Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin**, también integrante del Comité Tutorial, por sus valiosas observaciones que, sin duda, contribuyeron a enriquecer el contenido de esta Tesis.

A la **Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón**, Maestra, compañera y amiga quien siempre me impulsó a llegar a la meta.

A la **Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**, cuyas observaciones ampliaron mi criterio en el campo de la Citogenética, por su invaluable apoyo y muestras de aprecio.

A la **Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**, por su inapreciable respaldo y por fortalecer, a través de sus comentarios, el aspecto toxicológico de esta Tesis.

A los **donadores**, compañeros, alumnos y amigos que voluntaria y gentilmente proporcionaron el material biológico para la realización de los diferentes experimentos.

A todos los **colaboradores** cuyo entusiasmo y esfuerzo fue fundamental para obtener resultados confiables y reproducibles: M. en C. Guadalupe Guadarrama, Dra. Guadalupe Partida Hernández, M. en C. Mercedes Lozano Garrido, Dra. Leonor Rodríguez Cruz, Biól. Exp. Raquel Rodríguez, Dr. Saúl Gómez Espinosa, Biól. Exp. Geraldine Flores Rojas, Dra. Celene Razo, M. en C. Francisco González.

Al **M. en C. Gerardo López Ortega**, por su valiosa ayuda para el análisis estadístico de los datos y, principalmente, por su amistad.

Al **M. en C. Marco Aurelio Pérez Hernández**, compañero y amigo quien propició que retomara el trabajo de Tesis Doctoral y concluyera esta etapa académica.

A la Dra. Cristina Piña Barba, Dr. David Díaz Pontones, M. en C. Ma. Lourdes Martínez Cárdenas, Biól. Exp. Karla Dávalos de la Cruz, M. en C. Frida Soria Puente, Dr. Rajanaidu, Dra. Rosa María Galicia, Dra. Laura Pérez Flores, Dra. Judith Cardoso Martínez, Lic. Ma. Emilia López, Srita. Judith Morales Vargas, Biól. Ma. Pilar Martínez, MVZ Trinidad Sierra Guzmán, amigos todos, por su apoyo sincero e incondicional.

A mi **hermana Lupita** y **mis sobrinos Mónica Guadalupe** y **Alejandro** también por su apoyo moral y cariño.

A la **Facultad de Ciencias** de la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *Alma Mater*.

A la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa**, institución noble y generosa en la que me he formado profesionalmente y que financió la mayor parte de este proyecto a través de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Al **CONACyT** por el financiamiento otorgado por un año para la realización inicial del proyecto de investigación.

A todos les estoy profundamente agradecida.

Índice

Página	
<i>i</i>	Dedicatoria
<i>ii</i>	Agradecimientos
<i>v</i>	Índice de Tablas
<i>vii</i>	Índice de Figuras
<i>viii</i>	Resumen
1	Introducción
8	Objetivo
9	Hipótesis
	Materiales y métodos
11	<i>Características de los donadores</i>
	<i>Preparación de las sales de nitrato</i>
	<i>Cultivo de linfocitos</i>
	<i>Exposición a las sales de nitrato</i>
12	<i>Osmolalidad</i>
	<i>Índice mitótico</i>
13	<i>Alteraciones en el número cromosómico</i>
	<i>Frecuencia de aberraciones cromosómicas</i>
14	<i>Frecuencia de micronúcleos</i>
	<i>Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas</i>
15	<i>Cinética de proliferación</i>
16	<i>Daño al ADN</i>
	<i>Reparación del daño al ADN</i>
17	<i>Análisis estadístico</i>
	Resultados y discusión
	<i>Osmolalidad</i>
19	<i>Índice mitótico</i>
24	<i>Alteraciones en el número cromosómico</i>
25	<i>Frecuencia de aberraciones cromosómicas</i>
28	<i>Frecuencia de micronúcleos</i>
30	<i>Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas</i>
32	<i>Cinética de proliferación</i>
34	<i>Daño al ADN</i>
38	<i>Reparación de daño al ADN</i>
41	Consideraciones generales
43	Bibliografía
51	Anexo I

Índice de Tablas

Página

- 3** **Tabla 1.** Principales aplicaciones de la plata en forma metálica y iónica.
- 10** **Tabla 2.** Ensayos realizados para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del ion plata en cultivos de linfocitos humanos.
- 18** **Tabla 3.** Osmolalidad promedio (\pm Error Estándar) registrada en medio de cultivo Mc Coy 5a con nitrato de sodio y nitrato de potasio en concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, durante 0 y 24 horas de incubación a 37 °C.
- 19** **Tabla 4.** Osmolalidad promedio (\pm Error Estándar) en el medio de cultivo de linfocitos de tres donadores. Los cultivos se expusieron a nitrato de sodio y nitrato de potasio en concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 y 48 horas.
- 20** **Tabla 5.** Índice mitótico promedio ($\% \pm$ Error Estándar) en los cultivos de linfocitos de 10 donadores expuestos a cinco concentraciones de AgNO_3 durante 48 horas.
- 21** **Tabla 6.** Índice mitótico promedio ($\% \pm$ Error Estándar) en los cultivos de linfocitos de 10 donadores expuestos a cinco concentraciones de NaNO_3 durante 48 horas.
- 22** **Tabla 7.** Índice mitótico promedio ($\% \pm$ Error Estándar) en los cultivos de linfocitos de 10 donadores expuestos a cinco concentraciones de KNO_3 durante 48 horas.
- 24** **Tabla 8.** Frecuencia ($\%$) de números cromosómicos registrados en metafases de linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.
- 27** **Tabla 9.** Frecuencia de aberraciones cromosómicas registradas por metafases de linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo y a 40 ng/mL de Mitomicina C (testigo positivo).
- 29** **Tabla 10.** Proporción de células con uno (MONO), dos (BI), tres (TRI) o más núcleos (> 3) encontrada en linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.

- 30** **Tabla 11** Proporción de células sin micronúcleos (0), con uno (1), dos (2), tres o más micronúcleos (3>) encontrada en linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.
- 31** **Tabla 12.** Frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas por célula encontrada en linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 0.01, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.
- 33** **Tabla 13.** Proporción de células de 1^o, 2^o y 3er. ciclo de replicación en linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 0.01, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.
- 35** **Tabla 14.** Proporción de linfocitos humanos sin y con daño en el ADN por exposición a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.
- 36** **Tabla 15.** Longitud promedio (μm) de la migración de ADN de linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.
- 37** **Tabla 16.** Distribución de las linfocitos expuesto a nitrato de plata en intervalos de longitud de la migración del ADN dañado.
- 39** **Tabla 17.** Proporción de linfocitos humanos que mostraron daño al ADN a las 0, 24, 48 y 72 después de haber sido expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.
- 40** **Tabla 18.** Longitud promedio (μm) de la migración de ADN de linfocitos humanos que mostraron daño al ADN a las 0, 24, 48 y 72 h después de haber sido expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.

Índice de Figuras

Página

- 4 **Figura 1.** Rutas de ingreso y excreción de la plata (Modificado de Rozman y Klaasen).
- 15 **Figura 2.** Patrón de tinción de cromosomas de células proliferantes en presencia de bromodesoxiuridina durante uno, dos o tres ciclo de replicación.
- 23 **Figura 3.** Comportamiento del índice mitótico registrado en cultivos de linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata, nitrato de sodio y nitrato de potasio en concentraciones de 0, 0.01, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.
- 35 **Figura 4.** Proporción de linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo sin y con daño al ADN.
- 37 **Figura 5.** Distribución de la migración electroforética del ADN de linfocitos humanos tratados con nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$.
- 40 **Figura 6.** Distribución de linfocitos humanos que mostraron daño al ADN a las 0, 24, 48 y 72 h después de haber sido expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.

Efecto citotóxico y genotóxico de la plata in vitro

Resumen

La amplia gama de usos de la plata permite que este elemento ingrese al organismo por vía oral, respiratoria o dérmica. El estado del conocimiento sobre la toxicidad de este elemento no ha cambiado de manera significativa desde hace más de 20 años y es necesario contar con más información al respecto debido al resurgimiento de los compuestos de plata como agentes antibióticos ante la creciente resistencia que muestran las bacterias a los antibióticos comunes.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto citotóxico y genotóxico del ion plata sobre linfocitos humanos en cultivo. Se obtuvieron muestras sanguíneas de un total de 28 donadores, se expusieron a diferentes concentraciones de nitrato de plata durante 48 horas y se evaluaron distintos biomarcadores.

Los resultados obtenidos confirmaron la citotoxicidad del ion plata y la inocuidad del ion nitrato. El índice mitótico disminuyó en función de la concentración del ion plata pero la cinética de proliferación celular no se vio afectada.

Con respecto a las alteraciones cromosómicas se encontró que las células conservan su número diploide normal y que la frecuencia basal de aberraciones cromosómicas no se altera significativamente. La frecuencia de micronúcleos confirmó esta ausencia de clastogenicidad.

La frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) se incrementó significativamente con la concentración de 100 µg/mL de nitrato de plata, confirmando la sensibilidad de esta prueba. El ensayo cometa resultó ser aún más sensible ya que se registraron diferencias significativas a partir de la exposición a 10 µg/mL dato que confirma el daño detectado a través de los ICH.

Se observó que las células reparan el daño 48 h después de haberse interrumpido la exposición a la plata. El mecanismo de reparación que muy probablemente se active es el de escisión de bases.

Debe hacerse un uso racional de este ion para evitar saturar los mecanismos de reparación y también para no propiciar mutaciones en los microorganismos que les confieran resistencia a ella.

Efecto citotóxico y genotóxico de la plata in vitro

INTRODUCCIÓN

La plata es un elemento químico del grupo de los metales de transición cuyo símbolo químico es Ag (del latín *argentum*, blanco y brillante) que se encuentra en la naturaleza en forma libre o combinada con oro y otros metales así como en minerales como la argentita¹. En la corteza terrestre es escaso pero es el metal precioso más abundante y menos costoso. Por erosión llega a la atmósfera y al agua pero las actividades humanas han incrementado su acumulación en estos dos últimos ambientes^{2, 3}.

Es un elemento que se encuentra en el grupo IB de la Tabla Periódica, en el grupo 11, cuyo número atómico es 47. Metal de transición que se caracteriza por tener estados de oxidación positivos siendo el más común +1 (como en el nitrato de plata) pero también se encuentra en estado +2 y +3 con menor frecuencia (como el fluoruro de plata(II) y tetrafluoroargentato, respectivamente). Es estable en aire puro y en el agua³. Es el elemento con la mayor conductividad eléctrica y el metal con la conductividad térmica más elevada; es muy dúctil y maleable.

Se piensa que las primeras extracciones de plata ocurrieron en las minas de Asia Menor y el uso más antiguo que se ha documentado por una civilización data del año de 3500 A.C³. Desde entonces, y debido a sus propiedades únicas, la plata ha sido empleada en una amplia gama de aplicaciones entre las que se pueden mencionar la fabricación de férulas y prótesis, componente de fungicidas y en la acuñación de monedas, en su forma metálica. En solución, como sales de plata, ha sido utilizada para tratar enfermedades mentales, epilepsia, adicción a nicotina e infecciones como sífilis y gonorrea.

Actualmente se sigue empleando en sus dos formas, metálica y combinada, y las aplicaciones más importantes son las que tiene en la industria, joyería y fotografía⁵. Aunque en este último campo ha disminuido su consumo debido a la aparición de la fotografía digital, muchos técnicos de rayos X y cineastas prefieren las películas de halogenuro de plata por su extrema precisión, rentabilidad y excelentes propiedades de color⁶.

Uno de los usos más extendidos de la plata en medicina es como agente antimicrobiano en el tratamiento de quemaduras graves. Se prefiere su empleo combinada con sulfadiazina porque disminuye el riesgo del ennegrecimiento de la piel⁷. La plata coloidal generalmente se emplea como suplemento alimenticio aunque no hay evidencia científica suficiente que avale su eficacia y seguridad; de hecho, la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) no respalda su empleo⁸. En la Tabla 1 se resumen las principales aplicaciones que se le dan a la plata.

La plata no se encuentra presente en forma natural en los tejidos animales ni humanos⁹. En forma metálica es inerte pero en presencia de humedad, fluidos biológicos y secreciones, se ioniza y libera el ion Ag^+ que es biológicamente activo por lo que debe considerarse como un xenobiótico en el cuerpo humano¹⁰. La amplia gama de usos que tiene permite que este elemento ingrese al organismo por vía oral, respiratoria o dérmica. También puede ingresar vía subcutánea, peritoneal, muscular y venosa (Figura 1).

La ingestión es la primera vía de ingreso de la sales y partículas coloidales de plata al organismo. Puede ser absorbida por todas las membranas del aparato digestivo y pasar al hígado a través del sistema portal hepático. Del hígado se incorpora al sistema circulatorio, o bien, es transferida a la vesícula biliar desde donde regresa al aparato digestivo o a la sangre directamente¹¹. También puede volver al aparato digestivo desde el sistema circulatorio. La absorción de la plata por las membranas bucales y mucosas gastrointestinales depende del grado de ionización de la plata y disponibilidad del ion Ag^+ para interactuar con los receptores de las membranas celulares. El Ag^+ reacciona muy fácilmente con los grupos sulfhidrilo, carboxilo,

hidroxilo y con los ligandos de proteínas en las superficies celulares. También reacciona rápidamente con los constituyentes orgánicos de los alimentos e iones inorgánicos como cloruros y fosfatos, reduciendo más aún la absorción¹⁰.

Tabla 1. Principales aplicaciones de la plata en forma metálica y iónica.

Propiedad	Aplicación sobre elemento, material producto
Desinfectante	<ul style="list-style-type: none"> • Agua potable^{5, 6, 7, 10, 12} • Albercas^{6, 7, 12} • Sistemas de distribución de agua^{6, 7, 12} • Torres de refrigeración^{6, 12} • Contra infecciones dentales, oftálmicas y cutáneas^{12, 13} • Superficie de dispositivos médicos^{7, 12} • Superficies de trabajo susceptibles de ser cubiertas por biocapas (<i>biofilms</i>)¹². • Alimentos (frutas, verduras)^{5, 6, 7, 12}
Microbicida	<ul style="list-style-type: none"> • En soluciones de nitrato de plata para: combatir infecciones oftálmicas, prevenir infecciones por gonorrea oftálmica neonatal y eliminar verrugas^{5, 12, 13}. • En cremas y vendas, combinada con sulfadiazina para el tratamiento de quemaduras y heridas^{5, 12, 13}.
Sanitizadora	<ul style="list-style-type: none"> • Aparatos electrodomésticos^{6, 7, 12} • Textiles^{6, 7} • Objetos de uso público (teléfonos, computadoras, juguetes)^{5, 6, 7, 12} • Ropa y calzado deportivo^{6, 7}
Propiedades físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Elaboración de amalgamas dentales^{5, 6, 7, 12} • Fotografía^{6, 7, 12} • Joyería^{5, 6, 7, 12} • Elaboración de vajillas y cubiertos de mesa^{5, 6, 7, 12} • Acuñación de monedas^{5, 6, 7, 12} • Fabricación de instrumentos musicales y objetos de arte^{6, 7} • Fabricación de componentes electrónicos (baterías, cables)^{5, 6} • Fabricación de soldaduras^{5, 6} • Recubrimiento de vidrios y espejos^{5, 6} • Disipador de calor^{5, 6} • Catalizador^{5, 6} • Aislante térmico y eléctrico⁶ • Componente de celdas fotovoltaicas y sistemas alternos de energía eléctrica⁶
No especificadas	<ul style="list-style-type: none"> • Suplemento alimenticio⁶ • Conservador de flores^{5, 6} • Terapia contra tabaquismo con acetato de plata¹⁰

La inhalación de polvo y humos ocurre principalmente en áreas de trabajo, el tracto respiratorio se irrita aunque puede ser debido más al efecto corrosivo del nitrato que a la plata misma¹². Se piensa que en cualquiera de sus formas la plata se ioniza en las secreciones mucosas o en el surfactante alveolar, favoreciendo la absorción. No se ha determinado todavía el grado de interacción de Ag^+ con los fosfolípidos del surfactante pulmonar ni tampoco si esta secreción actúa como barrera para la absorción.

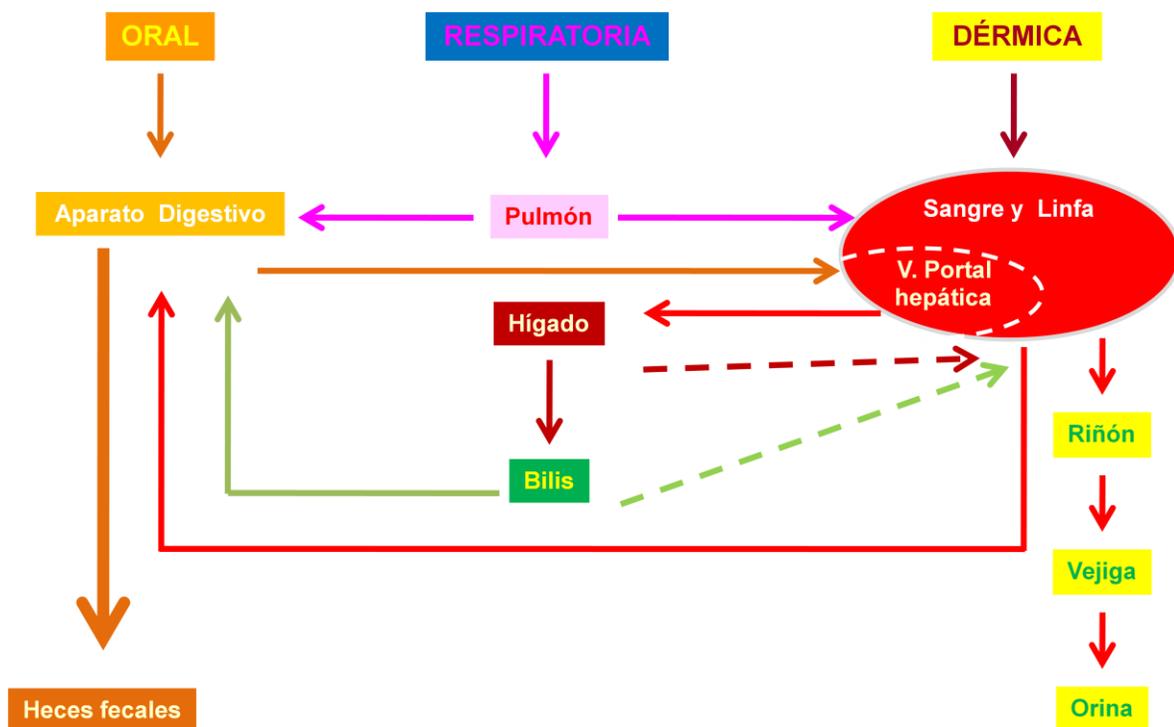


Figura 1. Rutas de ingreso y excreción de la plata (Modificado de Rozman y Klaasen¹⁴)

La mayoría de los productos que contienen plata como antibiótico tienen contacto con la piel pero las evidencias clínicas y experimentales muestran que la absorción percutánea es extremadamente baja debido a que la queratina y los fosfolípidos de la barrera epidérmica se unen a través de sus grupos sulfhidrilo con Ag^+ libre, de manera irreversible¹⁰.

La plata absorbida en forma iónica, independientemente de la ruta de ingreso, se une rápidamente a las proteínas intracelulares, principalmente albúminas séricas y macroglobulinas. Se ha demostrado que el Ag^+ absorbido activamente del nitrato de plata o de la sulfadiazina de plata induce la síntesis de metalotioneína I y II que son proteínas ricas en cisteína con afinidad por los metales. Ag^+ , se une rápidamente a ellas y forma complejos estables^{10, 15}.

No existe acuerdo respecto a las rutas metabólicas que sigue la plata en el cuerpo humano, su acumulación temporal o a largo plazo en el riñón, hígado y hueso pero desde las primeras investigaciones se ha observado que la plata es absorbida por todos los tejidos del cuerpo⁹ y se ha estimado que la absorción alcanza un máximo de 10 % y sólo del 2 al 4 % es retenido en los tejidos⁵.

Con respecto a los patrones de excreción, se considera que la principal vía de eliminación es a través de las heces fecales mediante la descamación de células del aparato digestivo que contienen plata⁹. Di Vincenzo *et al.*¹⁶ realizaron un monitoreo en trabajadores de la industria fotográfica expuestos por largo tiempo a residuos de plata y encontraron que, efectivamente, la mayor parte era eliminada a través de las heces. La excreción biliar parece contribuir de manera determinante a este proceso, como se ha observado en ratas expuestas a diferentes metales, entre ellos, plata^{10,17}. El glutatión parece participar activamente en la excreción biliar ya que la plata tiene una alta afinidad por los grupos tiol en el hígado, se forma un conjugado que puede ser excretado a la bilis o por la orina si es convertido a un ácido mercaptúrico en el riñón¹⁸. En personas con quemaduras en gran parte de su cuerpo, la eliminación es a través de la orina debido posiblemente a que al estar dañada la barrera dérmica la plata pasa directamente a la circulación sistémica y por esa vía llega al riñón¹⁹. Otras vías menores de excreción son el pelo y las uñas^{5, 10}.

Son varios los factores que influyen la capacidad para que un metal produzca efectos tóxicos en el organismo tales como su solubilidad, capacidad para unirse a moléculas

biológicas y el grado en el que los complejos metálicos así formados sean secuestrados o metabolizados y excretados⁵.

Se ha observado que la exposición aguda por vía oral ocasiona disminución de la presión sanguínea y de la respiración, causa diarrea e irritación estomacal. En un estudio en el que se trataron ratas con plata coloidal en dosis elevadas, los animales murieron². En el ser humano, la administración única de 50 mg o más resulta letal provocando edema pulmonar, hemorragia y necrosis de la médula ósea, hígado y riñón²¹. Si la exposición aguda es por vía respiratoria, los síntomas son prácticamente los mismos; en conejos se observó daño en el epitelio de las vías respiratorias después de la exposición a plata coloidal en aerosol^{2, 5}.

En casos de exposición ocupacional crónica vía oral se produce argiria y argirosis^{10, 21} pero también hay reportes de acumulación en el cerebro de personas que han consumido plata en suplementos alimenticios^{21, 22}. Por vía respiratoria se observa irritación, acumulación en el epitelio nasal, conjuntiva y córnea así como pérdida de visión en la oscuridad^{2, 5}. En trabajadores expuestos a residuos de plata por largo tiempo se encontró acumulación en el pelo, la sangre orina y las heces fecales¹⁶.

La argiria y la argirosis son las principales manifestaciones de intoxicación crónica por la vía dérmica y por acumulación a través de las otras vías. En la primera, los gránulos de plata se depositan en la piel, mucosas y órganos internos. En la piel se deposita principalmente en la dermis y causa un color azul. El pigmento que se deposita por lo general es sulfuro de plata que se forma cuando las sales de plata reaccionan con los azufres de los aminoácidos produciéndose sulfuro de plata. El efecto de cambio de coloración es más pronunciado en las zonas expuestas al sol. La argirosis es un tipo local de argiria que ocurre en el ojo y partes contiguas. Se presenta por el empleo de sales de plata en forma de gotas para ojos, cosméticos o por acumulación sistémica. La mayor parte de las estructuras del ojo se ven afectadas excepto el nervio óptico, la retina, el cristalino y el humor vítreo^{2, 5, 20, 23, 24}.

Hay reportes de otros efectos como la variación en las concentraciones de fosfolípidos, triglicéridos, colesterol y enzimas asociadas sin que se altere la función hepática. También se ha observado disminución de células sanguíneas y de oxígeno en la sangre de pacientes bajo tratamiento con algún compuesto de plata^{2, 5, 8, 23, 24}. La mayoría de las revisiones sobre la toxicidad de la plata reportan que no hay evidencias fehacientes de sus efectos sobre la reproducción o el desarrollo pero sí se ha encontrado daño en embriones de rata cuyas madres fueron expuestas a cloruro de plata durante la gestación²⁵ y que la administración de 7 g de nitrato de plata en humanos es fatal²⁰. Con respecto al potencial carcinogénico de la plata, no existe reporte alguno en humanos^{2, 10}, aunque la Organización Mundial de la Salud sí tiene registros en roedores⁹.

En el Perfil Toxicológico de la Plata elaborado por la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*² de los Estados Unidos de Norteamérica, se informa que hasta el momento de elaborarlo no había estudios consistentes *in vivo* o *in vitro* sobre la mutagenicidad o genotoxicidad de la plata en células humanas. En cambio, de las investigaciones con bacterias y otros modelos no humanos sí había evidencia de que el ion plata interactúa con el ADN causando rompimientos de cadena sencilla y afectando la replicación pero sin efecto mutagénico en las bacterias.

Numerosos estudios realizados *in vitro* han demostrado la citotoxicidad de la plata y sus compuestos debida a la capacidad del ion plata para reaccionar con los grupos sulfhidrilo, residuos proteicos y enzimas asociadas con las membranas celulares provocando desnaturalización, daño estructural y disfunción mitocondrial en forma muy similar a la observada en células bacterianas y de hongos¹⁰.

El estado del conocimiento sobre la toxicidad de la plata no ha cambiado de manera significativa. Si bien se han realizado investigaciones en este campo y se han incorporado nuevos biomarcadores, no se ha logrado conformar un panorama integral y confiable de sus efectos a nivel celular y molecular. Más aún, el creciente impulso que se ha dado a las nanopartículas de plata para el tratamiento de heridas

y contra células cancerosas, entre otras aplicaciones, ha generado controversia acerca del uso correcto de este metal y sus compuestos para esos fines debido a su toxicidad^{26 - 31}.

Las nanopartículas de plata (entre 1 y 100 nm) han cobrado auge en los últimos años debido a su potencial antimicrobiano además de que existen agentes terapéuticos, productos cosméticos y domésticos elaborados a base de ellas²⁹. Recientemente se ha demostrado que la fracción de nitrato de plata que contienen es la que contribuye de manera significativa a su toxicidad en una línea de células de pulmón³².

El resurgimiento de los compuestos de plata como agentes antibióticos debido a la creciente resistencia que muestran las bacterias a los antibióticos comunes y el impulso que se ha dado a las nanopartículas de plata para aplicaciones diversas plantean la necesidad de contar con más información acerca de la toxicidad de este elemento.

OBJETIVO

Determinar el efecto citotóxico y genotóxico del ion plata sobre linfocitos humanos en cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de la exposición a diferentes concentraciones del ion plata sobre:

- El índice mitótico para evaluar el efecto citotóxico.
- El índice de replicación para evaluar el efecto de este ion sobre la cinética de proliferación celular.
- La variación del número diploide de la especie ($2n = 46$) (efectos aneuploidógeno y poliploidógeno).
- La frecuencia de aberraciones cromosómicas y de células con micronúcleos (clastogenicidad).

- La frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (genotoxicidad).
- La longitud de la migración electroforética de la molécula de ADN mediante electroforesis unicelular (ensayo cometa) (genotoxicidad).

HIPÓTESIS

Si el ion plata presenta efecto citotóxico, clastogénico, aneu o poliploidógeno, o genotóxico, se registrarán diferencias significativas entre los lotes testigo y experimentales en cada uno de los biomarcadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para verificar la hipótesis propuesta se diseñó una estrategia que consistió en lo siguiente:

- Cultivo de linfocitos de sangre periférica de los donadores.
- Exposición al ion plata en forma de nitrato de plata. Las concentraciones finales variaron en los diferentes ensayos. Inicialmente se eligieron tres: 0.01, 10 y 100 µg/mL. Esta selección se basó en la cantidad de plata encontrada en la sangre de trabajadores expuestos a este metal por DiVincenzo *et al*¹⁷. Después, en función de los resultados que se fueron obteniendo, se tomó la decisión de cambiarlas en algunos ensayos.
- Evaluación del daño a través de los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad: índice mitótico, índice de replicación, alteraciones del número y la estructura cromosómica, formación de micronúcleos e intercambios de cromátidas hermanas y rompimientos de cadena sencilla en el ADN.
- Además del lote testigo en el que los cultivos no se expusieron a nitrato de plata, en la parte correspondiente al índice mitótico se incluyeron dos lotes testigo más con el propósito de descartar el efecto del ion nitrato. Esos cultivos se expusieron a nitrato de sodio y nitrato de potasio en las mismas concentraciones que el nitrato de plata. En el ensayo para determinar clastogenicidad mediante la

frecuencia de aberraciones cromosómicas se incluyó un testigo positivo en el que los cultivos se expusieron a mitomicina C en concentración de 40 ng/mL.

- Todos los lotes consistieron de tres cultivos cada uno.

En la Tabla 2 se resumen los ensayos realizados, las concentraciones aplicadas así como el tamaño de la muestra empleada en cada uno de ellos.

Tabla 2. Ensayos realizados para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del ion plata en cultivos de linfocitos humanos.

Ensayo		Marcador	Tratamiento	Concentración [µg/mL]	No. donadores
Osmolalidad		Presión osmótica	AgNO ₃ NaNO ₃ KNO ₃	1000	3
Citotoxicidad	Índice mitótico	Frecuencia de células en mitosis	AgNO ₃ NaNO ₃ KNO ₃	0 0.1 10 100 1000	10
	Índice de replicación	Frecuencia de células en primero, segundo y tercer ciclo de replicación.	AgNO ₃	0 10 100	6
Genotoxicidad	Aneugenicidad y poliploidogenicidad	Número cromosómico modal	AgNO ₃	0 10 100	10
	Clastogenicidad	Frecuencia de aberraciones cromosómicas	AgNO ₃	0 10 100	10
			Mitomicina C	0.040 ng/mL	
	Daño al ADN	Frecuencia de micronúcleos	AgNO ₃	0 10 100	6
		Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas.	AgNO ₃	0 0.1 10 100	6
			Rompimientos de cadena sencilla del ADN	AgNO ₃	0 10 100
	Recuperación del daño al ADN			10	10

- **Características de los donadores**

- **Criterios de inclusión:**

- Hombres y mujeres de edad entre 20 y 40 años.
 - Sanos
 - Sin hábitos nocivos como el alcoholismo o tabaquismo

- **Criterios de exclusión:**

- Menores de 20 años y mayores de 40 años.
 - Haber estado bajo tratamiento médico al menos durante el último mes.
 - Manifestar tener hábitos nocivos para la salud.

- **Preparación de las sales de nitrato**

Se prepararon soluciones acuosas de nitrato de plata (RESOL), nitrato de potasio (J. T. Baker) y nitrato de sodio (J. T. Baker) cada una en concentraciones 10X. Estas fueron: 0.01, 10, 100 y 1000 µg/mL de medio de cultivo. Se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0.22 µm (Millipore).

- **Cultivo de linfocitos**

Las muestras de sangre se obtuvieron con jeringa previamente heparinizada (Microlab). Los cultivos se prepararon de acuerdo con el protocolo de Arakaki y Sparkes³³ colocando 0.3 mL de sangre completa en frascos ampulla de 60 mL estériles, conteniendo 5 mL de medio de cultivo McCoy 5a (Microlab) adicionado con 0.4 mL de Fitohemaglutinina M (Microlab) y 0.04 mL de una solución antibiótica (penicilina–estreptomina, Microlab). Se incubaron a 37° C durante 72 horas excepto en el ensayo de osmolaridad en el que variaron los tiempos de incubación.

- **Exposición a las sales de nitrato**

Después de las primeras 24 h de incubación a 37 °C, se formaron 13 lotes de tres cultivos cada uno por cada donador:

- 1) Cuatro lotes experimentales que fueron expuestos a 0 de nitrato de plata en concentraciones finales de 0.01, 10, 100 y 1000 µg/mL de medio de cultivo.

- 2) Cuatro lotes testigo que se expusieron a de nitrato de sodio en las mismas concentraciones finales que el nitrato de plata.
- 3) Cuatro lotes testigo que se expusieron a de nitrato de potasio en las mismas concentraciones finales que el nitrato de plata.
- 4) Un lote testigo al cual no se le expuso a ningún agente.

Los lotes expuestos a nitrato de sodio y de potasio se incluyeron para descartar la posibilidad de que al disociarse el nitrato de plata en el medio acuoso en los iones plata (Ag^+) y nitrato (NO_3^-), este último dañara a las células.

Todos los cultivos se re-incubaron a 37 °C por 48 horas más, conforme a la estrategia propuesta por Preston *et al.*³⁴.

- **Osmolalidad**

Con el fin de determinar si la adición a los cultivos de 5 mg/mL de cada una de las soluciones de nitrato de sodio y de potasio para obtener la concentración final de 1000 µg/mL afectaba la presión osmótica, se midió la osmolaridad del medio de cultivo, la del medio de cultivo adicionado con NaNO_3 1000 µg/mL así como la del medio de cultivo con KNO_3 , 1000 µg/mL, a las 0 y 24 horas de incubación a 37 °C. También se cultivaron muestras sanguíneas de tres donadores (1, 13 y 14) y se midió la osmolalidad en los sobrenadantes de los cultivos testigo (sin sal), previamente adicionados con NaNO_3 1000 µg/mL y con KNO_3 en la misma concentración, a las 48 y 72 horas de incubación a 37 °C (24 y 48 horas de exposición a las sales respectivamente). La medida de la osmolalidad se realizó con un osmómetro (Advanced Instruments, Inc., Mod. 3D2).

- **Índice mitótico (IM)**

Para determinar este parámetro se emplearon cultivos de 10 donadores (1-10). Se cosecharon siguiendo la técnica de Moorhead *et al.*³⁵. Una hora antes de iniciar la cosecha, se añadieron 0.125 mL de Colcemid (Microlab) a cada uno de los cultivos de los cuatro lotes. Las células se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación a 1500 rpm; se les aplicó un tratamiento hipotónico con cloruro de potasio 0.057 M (J. T. Baker) durante 30 minutos a 37 °C. Se volvieron a centrifugar

a 1500 rpm y se fijaron con Solución de Carnoy (ácido acético-metanol, proporción 3:1; J. T. Baker). Las preparaciones se hicieron dejando caer gotas de la suspensión celular sobre portaobjetos desengrasados y fríos y secando al calor de la flama del mechero. Se tiñeron con colorante de Giemsa (Merck) al 10 %. A cada preparación se le asignó una clave para ser revisadas con el método del doble ciego.

El índice mitótico se calculó obteniendo la proporción de mitosis en un total de 6000 células por lote de cada donador.

$$IM = \frac{\text{no. de mitosis} \times 100}{\text{no. total de células}}$$

- ***Alteraciones en el número cromosómico***

Las mismas preparaciones con las que se determinó el índice mitótico fueron utilizadas para observar el efecto de la plata sobre la distribución correcta de los cromosomas durante la mitosis. Se revisaron las correspondientes a los lotes testigo y expuestos a 10 y 100 µg/mL de nitrato de plata de seis donadores únicamente (1, 9-11, 16 y 17) por ser las que presentaban la calidad apropiada para este análisis. Se seleccionaron al azar 100 mitosis por lote de cada uno de los donadores y se registró el número de cromosomas presentes en cada una de ellas.

Se sumaron las frecuencias de cada uno de los números cromosómicos en los diferentes lotes y se obtuvo el número modal.

- ***Frecuencia de aberraciones cromosómicas***

De manera similar a la descrita en el inciso anterior, se seleccionaron 60 mitosis de excelente calidad (con 46 cromosomas dispersos) por lote de cada donador (1, 9-11, 16 y 17), se revisó cuidadosamente cada uno de los cromosomas y se registró el número de hendiduras sencillas (G') y dobles (G''), rompimientos sencillos (B') y dobles (B'') presentes en cada célula. Con estos datos se obtuvo la frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula en cada uno de los lotes, testigo y experimentales y se calculó la proporción de células que presentarían al menos un

cromosoma dañado³⁶. Se añadió un lote más cuyos cultivos fueron expuestos a mitomicina C (MMC), 40 ng/mL de cultivo, como testigo positivo.

- ***Frecuencia de micronúcleos***

Las muestras sanguíneas de seis donadores (1, 5-7, 10 y 12) se cultivaron para determinar el efecto del ión plata en concentraciones de 10 y 100 µg/mL sobre la frecuencia de micronúcleos. Se empleó el procedimiento de Fenech³⁷ que consistió en añadir citocalasina B (Sigma) en una concentración final de 3 µg/mL a cada uno de los cultivos de todos los lotes, a las 44 horas de incubación, con el fin de inhibir la citocinesis y obtener células binucleadas. Para cosechar las células se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos para separarlas del medio y se aplicó un choque hipotónico con cloruro de potasio 0.4 % (J. T. Baker) durante 15 minutos para facilitar la observación de las células binucleadas y la presencia de micronúcleos. Las preparaciones se tiñeron con colorante May-Grunwald al 5 % pH 7.2, durante 5 minutos y con Giemsa al 10 % en amortiguador de Sorensen pH 6.8, por 10 minutos. Se determinó la frecuencia de células binucleadas en 6000 células por lote de cada donador así como la frecuencia de micronúcleos en 2000 células binucleadas por lote de cada donador³⁸.

- ***Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas***

Para determinar el efecto de la exposición al ion plata sobre la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas se cultivó sangre de seis donadores (1, 4, 5, 7 y 15) y se expusieron a 0, 0.01, 10 y 100 µg/mL de nitrato de plata.

Los cultivos se cosecharon de la misma forma descrita para obtener las preparaciones en las que se registró el índice mitótico. Para teñir diferencialmente las cromátidas hermanas se aplicó el método propuesto por Perry y Wolff³⁹ que consistió en lo siguiente: se añadieron 0.25 mL de solución acuosa de 5', Bromodesoxiuridina (BrdU) (Sigma) 200 µg/mL, a cada uno de los cultivos, 48 horas antes de ser cosechados. A las 71 h de incubación a 37 °C se les añadieron 0.125 mL de Colcemid (Microlab) y se procedió de la misma manera antes descrita hasta la obtención de las laminillas. Estas se sumergieron en una solución acuosa del

fluorocromo Hoechst33258 (Sigma) 0.5 µg/mL durante 40 minutos. Se cubrió la superficie de cada preparación con amortiguador de Sorensen pH 6.8 y se colocó un cubreobjetos de 25 mm de ancho x 50 mm de largo antes de exponerlas a la luz negra (20 watts) durante 4 horas. Se lavaron con agua destilada y se tiñeron con colorante de Giemsa al 10 % en amortiguador de Sorensen pH 6.8. A cada preparación se le asignó una clave para ser revisadas con el método del doble ciego. Se seleccionaron 60 mitosis de buena calidad, por lote de cada donador, y se cuantificó el número de intercambios dobles y sencillos presentes en cada una de ellas. Con estos datos se obtuvo la frecuencia promedio de intercambios de cromátidas hermanas por célula.

- **Cinética de proliferación**

En las mismas preparaciones teñidas diferencialmente se registró la frecuencia de mitosis de primero, segundo y tercer ciclo de replicación con base en la tinción que mostraran y que a su vez estaba en función de la incorporación de BrdU a una o ambas cadenas del ADN^{39, 40} (Figura 2).

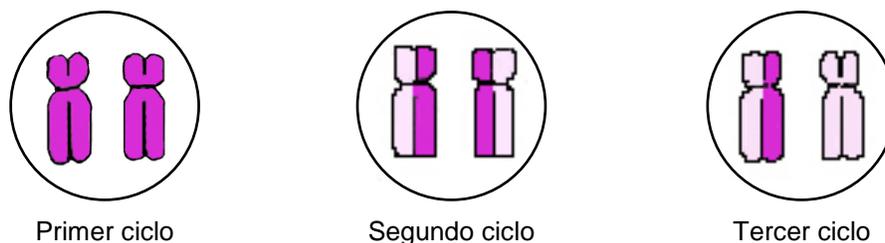


Figura 2. Patrón de tinción de cromosomas de células proliferantes en presencia de bromodesoxiuridina durante uno, dos y tres ciclo de replicación.

Se revisaron y clasificaron 120 mitosis por lote de cada donador y el índice de replicación (IR) se obtuvo mediante la siguiente fórmula⁴¹:

$$IR = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3}{\text{Total de metafases}}$$

- ***Daño al ADN: rompimientos de cadena sencilla (ensayo cometa)***

Para estimar el daño a la molécula de ADN, los cultivos de los lotes testigo y experimentales (0, 10 y 100 µg/mL) de 10 donadores (1, 5, 7-10, 18-21) se lavaron cuidadosamente con PBS dos veces. Se utilizó la técnica de electroforesis unicelular alcalina descrita por Singh *et al.*⁴².

Se prepararon geles con tres capas de agarosa: la primera de 110 µL de agarosa de peso molecular regular (Sigma), la segunda de 75 µL de agarosa de bajo peso molecular (Sigma) mezclada con 75 µL de células, y la tercera de 75 µL de agarosa de bajo peso molecular.

Se incubaron durante una hora, a 4°C, en una solución de lisis (cloruro de sodio 2.5 M, Na₂-EDTA 100 µM, Tris 10 µM, dimetilsulfóxido 10 %, Tritón 100-X 1% (J.T. Baker) y agua desionizada; pH 10).

Las preparaciones se transfirieron a una cámara de electroforesis (Bio Rad), se cubrieron con amortiguador de electroforesis (hidróxido de sodio 10 N, Na₂-EDTA 200 µM (J.T. Baker) y agua desionizada) y se dejaron reposar en él durante 20 minutos a 4 °C. Se expusieron al paso de corriente eléctrica de 25 V, 300 mA, durante 20 minutos.

Después se lavaron con amortiguador de neutralización (Tris (J. T. Baker) 400 mM, pH 7.5) tres veces, se tiñeron con 50 µl de bromuro de etidio (Sigma) 2 µg/mL y se guardaron en una cámara húmeda a 4 °C, hasta su análisis con un microscopio de fluorescencia (Olympus).

Se revisaron 300 células por lote de cada donador y, en aquellas que presentaran migración del ADN, se midió la longitud del desplazamiento empleando un analizador de imágenes y el programa VIDS (Synoptics).

Reparación del daño al ADN

Con el fin de determinar si las células podrían recuperarse del daño causado por el ion plata a su ADN, se obtuvieron muestras de diez donadores (1, 5, 7, 22-28) y se formaron dos lotes de 12 cultivos cada uno: el primero se expuso a 10 µg/mL de nitrato de plata durante 48 horas y el segundo sirvió como testigo.

Al concluir la exposición, los cultivos se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, Microlab), se les añadió medio de cultivo fresco, sin nitrato de plata y se realizaron electroforesis unicelulares a las 0, 24, 48 y 72 horas. Para la evaluación del daño, se procedió de la manera antes descrita.

- **Análisis estadístico**

Los datos de índice mitótico, micronúcleos, índice de replicación y de ensayo cometa se analizaron mediante un ANOVA y la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey. Las frecuencias de aberraciones cromosómicas y de intercambios de cromátidas hermanas por célula se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis. En todos los análisis se empleó el paquete estadístico SPSS v 12.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Características de los donadores**

En total colaboraron 28 donadores a lo largo del proyecto, todos miembros de la comunidad de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, cuyas edades fluctuaron entre los 19 y 38 años, siendo el promedio de 28 años. Se procuró que participara igual número de hombres que de mujeres. De cada uno de ellos se obtuvo el consentimiento por escrito. En el Anexo 1 se presenta la lista de donadores y los ensayos en los cuales fueron empleadas sus muestras.

- **Osmolalidad**

Se sabe que la presión osmótica del medio en que se encuentren las células afecta su metabolismo, crecimiento y densidad, entre otros aspectos. Para obtener la concentración más elevada de NaNO_3 y KNO_3 (1000 $\mu\text{g/mL}$) se añadieron 5 mg/mL a cada tubo de cultivo, que coincidió con la máxima cantidad recomendada por Preston *et al.*³⁴. La concentración de esas sales en términos de molaridad fue de 0.01176 y 0.009 M, respectivamente. En la Tabla 3 se observa que la osmolalidad del medio es la que generalmente tienen los medios de cultivo para células de mamífero (280-320mOsm/kg)⁴³, en particular el medio McCoy 5^a modificado de diferentes marcas

comerciales que se encuentra entre 255 y 292 mOsm/kg (Biowest, HiMedia, Corning Cellgro, Sigma y Lonza). Las diferencias entre los lotes durante las primeras 24 horas de incubación a 37 °C no son significativas (χ^2 , $p > 0.05$).

Tabla 3. Osmolalidad promedio (\pm Error Estándar) registrada en medio de cultivo Mc Coy 5a con nitrato de sodio y nitrato de potasio en concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, durante 0 y 24 horas de incubación a 37 °C.

Incubación a 37 °C (horas)	Medio con células	Osmolalidad (mOsm/Kg)			
		No. de repetición			Promedio \pm EE
		1	2	3	
0		279	283	283	281.66 \pm 1.33
	Adicionado con NaNO ₃	274	272	272	272.66 \pm 0.67
	Adicionado con KNO ₃	270	270	270	270.00 \pm 0.00
24		280	283.25	278.5	280.58 \pm 1.40
	Adicionado con NaNO ₃	262.5	274	275	270.50 \pm 4.02
	Adicionado con KNO ₃	265	273	269	269.00 \pm 2.31

Al incubar las células en el medio, la presión osmótica disminuye tanto en el lote testigo como en los cultivos expuestos a los nitratos en relación con el medio sin células ni sales. También se registra una ligera tendencia a disminuir en función del tiempo de incubación (Tabla 4). En ambos casos, la osmolalidad se mantiene dentro de los límites apropiados (255- 292 mOsm/Kg) y las diferencias que se registraron entre el medio sin sales ni células y en presencia de ellas no son significativas (χ^2 , $p > 0.05$).

Con el fin de verificar que el medio de cultivo se conservaba isotónico con respecto a las células, se tomaron alícuotas de los cultivos de los diferentes lotes y se observó la morfología celular a través del microscopio. En ningún caso se registró alteración alguna que indicara turgencia o plasmólisis.

Tabla 4. Osmolalidad promedio (\pm Error Estándar) en el medio de cultivo de linfocitos de tres donadores. Los cultivos se expusieron a nitrato de sodio y nitrato de potasio en concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 y 48 horas.

Incubación a 37 °C (horas)	Medio con células	Osmolalidad (mOsm/Kg)			
		Donador			Promedio \pm EE
		1	13	14	
48		277	277.5	282	278.8 \pm 1.59
	Adicionado con NaNO_3	274.5	273.6	273	273.7 \pm 0.44
	Adicionado con KNO_3	270	268.33	268.3	268.8 \pm 0.56
72		275.3	277.5	277	276.6 \pm 0.67
	Adicionado con NaNO_3	273.6	273	271	272.5 \pm 0.79
	Adicionado con KNO_3	266.5	268.6	266	267.0 \pm 0.80

De esta forma se constató que la presión osmótica no cambiaba en los cultivos con la concentración más elevada de las sales de nitrato bajo prueba y, al mismo tiempo, se validó el uso de estos lotes como testigos de la toxicidad del ion plata.

- **Índice mitótico**

El índice mitótico es un marcador de citotoxicidad ampliamente utilizado que indica si la célula sobrevive a la acción de un agente externo, si conserva su capacidad para proliferar y, de manera indirecta, permite estimar la duración del ciclo celular. La sensibilidad y reproducibilidad de este parámetro se ha demostrado ampliamente⁴⁴⁻⁴⁶. Al analizar los datos obtenidos en los cultivos testigo y los expuestos a la plata (Tablas 5, 6 y 7) es evidente la diversidad de valores del índice mitótico presentes entre los donadores, comportamiento que ha sido reportado previamente y atribuido a la variabilidad biológica de los individuos en respuesta a las condiciones de cultivo y a la exposición a diferentes agentes^{44, 47, 48}.

Se observó que el índice mitótico promedio disminuyó en función de la concentración de nitrato de plata y se redujo a cero con 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 5); a partir de la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la diferencia es significativa con respecto al lote testigo (Tukey, $p < 0.05$). Estos resultados confirman la citotoxicidad del ión plata^{26, 49} y, en

particular, la disminución de la proliferación en cultivos de células sinoviales humanas^{10, 50}, fibroblastos y células endoteliales⁵¹.

Tabla 5. Índice mitótico promedio (% \pm Error Estándar) en los cultivos de linfocitos de 10 donadores expuestos a cinco concentraciones de AgNO₃ durante 48 horas.

DONADOR	Índice Mitótico (% \pm EE)			
	Concentraciones finales de AgNO ₃ (μ g/mL de cultivo)			
	0	0.01	10	100
1	1.26 \pm 0.22	2.23 \pm 0.42	1.42 \pm 0.17	1.18 \pm 0.26
2	1.90 \pm 0.55	0.22 \pm 0.16	0.19 \pm 0.10	1.02 \pm 0.40
3	1.01 \pm 0.14	1.34 \pm 0.30	1.20 \pm 0.32	1.10 \pm 0.36
4	1.03 \pm 0.35	3.33 \pm 0.41	3.42 \pm 0.97	0.82 \pm 0.16
5	3.70 \pm 0.78	3.22 \pm 0.33	2.85 \pm 0.62	1.03 \pm 0.40
6	3.80 \pm 0.58	3.55 \pm 0.68	2.31 \pm 0.99	0.61 \pm 0.30
7	3.20 \pm 0.98	2.81 \pm 0.71	2.01 \pm 0.26	1.52 \pm 0.50
8	4.13 \pm 0.37	4.76 \pm 0.65	2.87 \pm 0.61	2.57 \pm 0.27
9	1.65 \pm 0.46	3.17 \pm 0.28	2.09 \pm 0.44	1.21 \pm 0.44
10	2.94 \pm 0.31	3.69 \pm 0.31	2.96 \pm 0.98	0.43 \pm 0.15
Promedio \pm EE	2.46 \pm 0.47	2.83 \pm 0.42	2.13 \pm 0.55	1.15 \pm 0.32*

*Diferencia significativa con respecto al lote testigo (Tukey, $p < 0.05$).

La proliferación celular en los cultivos expuestos a nitrato de sodio no se afectó, como puede apreciarse en la Tabla 6. La proporción de células en mitosis encontrada en los diferentes lotes es muy similar, excepto en el de la mayor concentración con la que se registró un incremento de casi 11%. Sin embargo, las diferencias entre el lote testigo y los experimentales no son significativas (Tukey, $p > 0.05$). En la literatura no hay datos acerca del estímulo de la proliferación celular con este compuesto pero se ha encontrado que el nitrito de sodio la favorece significativamente en células del epitelio estomacal (línea AGS)⁵² y en neutrófilos de la línea celular HL60⁵³.

Tabla 6. Índice mitótico promedio (% \pm Error Estándar) en los cultivos de linfocitos de 10 donadores expuestos a cinco concentraciones de NaNO₃ durante 48 horas.

DONADOR	Índice Mitótico (% \pm EE)				
	Concentraciones finales de NaNO ₃ (μ g/mL de cultivo)				
	0	0.01	10	100	1000
1	1.26 \pm 0.22	1.67 \pm 0.15	2.03 \pm 0.33	1.52 \pm 0.48	3.26 \pm 0.44
2	1.90 \pm 0.55	0.96 \pm 0.47	1.55 \pm 0.27	1.61 \pm 0.36	2.97 \pm 0.36
3	1.01 \pm 0.14	1.41 \pm 0.70	1.96 \pm 0.53	1.08 \pm 0.37	2.89 \pm 0.17
4	1.03 \pm 0.35	1.60 \pm 0.28	2.63 \pm 0.94	1.22 \pm 0.42	2.33 \pm 0.36
5	3.70 \pm 0.78	3.98 \pm 0.42	3.50 \pm 0.22	3.91 \pm 1.13	4.63 \pm 0.39
6	3.80 \pm 0.58	0.63 \pm 0.24	2.35 \pm 0.44	1.35 \pm 0.55	3.16 \pm 0.48
7	3.20 \pm 0.98	2.71 \pm 0.68	3.37 \pm 0.39	4.41 \pm 1.00	2.42 \pm 0.19
8	4.13 \pm 0.37	2.22 \pm 0.57	3.65 \pm 0.35	4.08 \pm 0.57	2.75 \pm 0.41
9	1.65 \pm 0.46	3.04 \pm 0.90	2.82 \pm 0.60	3.24 \pm 0.51	2.30 \pm 0.44
10	2.94 \pm 0.31	3.55 \pm 0.30	2.00 \pm 0.30	1.86 \pm 0.25	2.97 \pm 0.36
Promedio + EE	2.46 \pm 0.47	2.18 \pm 0.47	2.35 \pm 0.44	2.43 \pm 0.56	2.97 \pm 0.36

El comportamiento de los cultivos expuestos a nitrato de potasio fue también relativamente uniforme (Tabla 7) y ninguna de las diferencias entre los lotes resultó estadísticamente significativa (Tukey, $p > 0.05$).

Estos resultados no concuerdan con los encontrados por Bharadwaj *et al.*⁵⁴ quienes al exponer células de hepatoma humano de la línea HepG2 a KNO₃ 1 y 4 mM registraron disminución significativa de la proliferación celular. La primera de esas concentraciones es similar a la máxima empleada en el presente trabajo y es muy probable que cada tipo celular tenga una respuesta diferente ante el mismo estímulo. Existe otro reporte más reciente⁵⁵ en el que se expusieron cultivos primarios de linfocitos humanos a esta misma sal en concentraciones de 0, 0.02, 0.2, 2, 4 y 8 mM registrándose disminución significativa en el índice mitótico con las concentraciones de 0.2 y 4 mM. Aunque el modelo experimental es el mismo, las diferencias pueden atribuirse a que las concentraciones que resultaron tóxicas son superiores a las probadas en este trabajo.

Tabla 7. Índice mitótico promedio (% \pm Error Estándar) en los cultivos de linfocitos de 10 donadores expuestos a cinco concentraciones de KNO_3 durante 48 horas.

DONADOR	Índice Mitótico (% \pm EE)				
	Concentraciones finales de KNO_3 ($\mu\text{g/mL}$ de cultivo)				
	0	0.01	10	100	1000
1	1.26 \pm 0.22	2.21 \pm 0.30	1.13 \pm 0.19	1.95 \pm 0.17	2.97 \pm 1.07
2	1.90 \pm 0.55	2.21 \pm 0.43	0.20 \pm 0.12	0.48 \pm 0.22	2.60 \pm 0.58
3	1.01 \pm 0.14	0.32 \pm 0.15	0.94 \pm 0.28	1.67 \pm 0.46	1.96 \pm 0.39
4	1.03 \pm 0.35	1.38 \pm 0.31	2.45 \pm 0.59	3.03 \pm 0.32	1.76 \pm 0.50
5	3.70 \pm 0.78	5.26 \pm 0.89	4.74 \pm 0.44	2.74 \pm 0.51	2.73 \pm 0.91
6	3.80 \pm 0.58	2.21 \pm 0.43	1.04 \pm 0.60	1.23 \pm 0.48	3.81 \pm 0.43
7	3.20 \pm 0.98	3.47 \pm 0.61	4.25 \pm 0.70	4.14 \pm 0.71	4.09 \pm 0.71
8	4.13 \pm 0.37	4.48 \pm 0.37	2.58 \pm 0.43	2.41 \pm 0.42	2.71 \pm 0.19
9	1.65 \pm 0.46	2.79 \pm 1.33	1.03 \pm 0.25	0.67 \pm 0.34	0.81 \pm 0.44
10	2.94 \pm 0.31	2.17 \pm 0.31	3.28 \pm 0.23	2.90 \pm 0.43	2.60 \pm 0.58
Promedio + EE	2.46 \pm 0.47	2.21 \pm 0.43	2.16 \pm 0.38	2.12 \pm 0.41	2.60 \pm 0.58

La Figura 3 resume el comportamiento del índice mitótico en cada una de las condiciones experimentales y testigo. Se aprecia el efecto citotóxico del ion plata a partir de la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, así como la inocuidad de los nitratos de sodio y potasio en las concentraciones aplicadas.

La muestra sanguínea de cada uno de los 10 donadores que se empleó para probar las sales en sus diferentes concentraciones fue una sola, es decir, de cada donador se extrajo, previo consentimiento, el volumen necesario para preparar 39 cultivos (3 testigo y 36 experimentales distribuidos en 12 diferentes lotes) lo cual incrementa la confiabilidad de la comparación debido a que el estado fisiológico del donador, reflejado en la composición sanguínea al momento de tomar la muestra, se mantuvo constante.

Esto resultó muy conveniente desde el punto de vista del diseño experimental pues se ha observado que las muestras de un mismo individuo tomadas en diferentes

tiempos no siempre se comportan de la misma manera en el cultivo. Por ello, en la gráfica de la Figura 3, las tres curvas parten del mismo valor. Otro aspecto que debe resaltarse en la misma es que cada punto corresponde al promedio del índice mitótico de 10 donadores, lo cual representa una muestra de 60,000 células en cada uno de ellos.

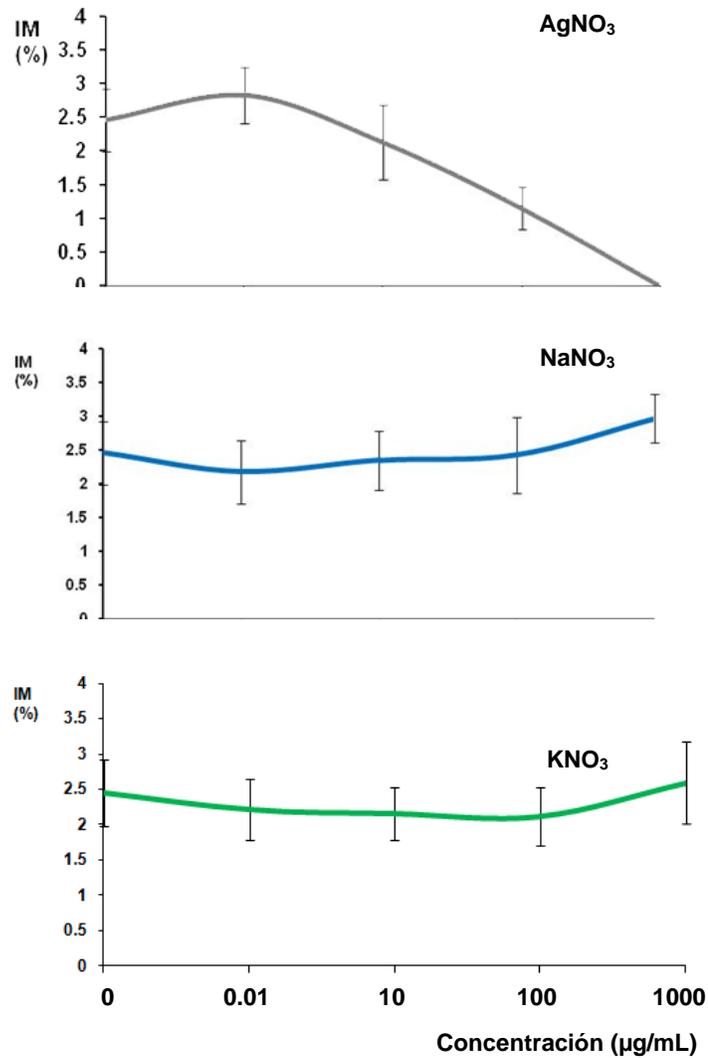


Figura 3. Comportamiento del índice mitótico registrado en cultivos de linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata, nitrato de sodio y nitrato de potasio en concentraciones de 0, 0.01, 10, 100 y 1000 µg/mL de cultivo.

El índice mitótico confirmó ser un valioso marcador de citotoxicidad pues permitió determinar que las células sobrevivieron la exposición a los nitratos de plata, sodio y potasio además de que proliferaron, excepto en los cultivos tratados con 100 µg/mL de nitrato de plata en los que el índice mitótico disminuyó de manera significativa.

En virtud de que los resultados de índice mitótico demostraron la inocuidad del ión nitrato (NO₃⁻), se procedió a evaluar la genotoxicidad del ion plata únicamente, es decir, sin incluir los nitratos de sodio ni de potasio como testigos.

- **Alteraciones en el número cromosómico.**

Se emplearon únicamente las preparaciones de seis donadores por ser las que presentaban la calidad adecuada para evaluar este parámetro.

En la Tabla 8 se resume la frecuencia de los números cromosómicos registrados y se observa que más del 80 % de las metafases en todos los lotes presentaron 46 cromosomas. También se encontraron mitosis con números inferiores a 46 (de 39 a 45 cromosomas) y otras con más de 46 cromosomas (de 47 a 100) pero su frecuencia fue muy baja. Así, el número modal en los tres lotes, testigo y expuestos a 0, 10 y 100 µg/mL de AgNO₃, fue 2n = 46. Se conservó el número diploide de la especie humana.

Tabla 8. Frecuencia (%) de números cromosómicos registrados en metafases de linfocitos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 µg/mL de cultivo.

LOTE µg/mL	Frecuencias de números cromosómicos (%)															
	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50 -	60 -	70 -	80 -	90 -
0	0.34	0.17	0.17	0.34	0.34	3.95	3.78	84.02	2.41	0.00	0.00	1.55	0.69	0.34	0.17	1.72
10	0.00	0.00	0.18	0.00	0.36	2.92	5.66	85.77	1.46	0.00	0.18	0.73	0.55	0.18	0.36	1.64
100	0.00	0.00	0.26	0.00	0.26	6.27	4.18	83.03	1.83	0.00	0.00	0.78	0.00	0.00	1.04	2.35

El número cromosómico es fundamental para la estabilidad de la célula y depende de la distribución equitativa de los cromosomas a las células hijas durante la división celular, mitosis o meiosis⁵⁶.

La segregación cromosómica correcta es un conjunto de eventos coordinados que permiten que se ensamble el huso mitótico, que los cromosomas se unan en tiempo y forma a las fibras del huso a través del cinetocoro, que se alineen correctamente en la placa ecuatorial y que las cromátidas hermanas permanezcan unidas hasta el momento preciso de la separación^{57, 58}. Los mecanismos de regulación del ciclo celular en curso constituyen una vía para lograr esa coordinación y en caso de alteración pueden detener la progresión del ciclo y activar los mecanismos de reparación⁵⁹. Cualquier alteración de la fidelidad de este proceso puede conducir a la formación de células hijas binucleadas, aneuploides o poliploides⁶⁰.

La aneuploidía es una condición en la que el número cromosómico no corresponde a un múltiplo del complemento haploide. Está asociada con enfermedad, muerte y afecta a la proliferación celular⁶¹. En la poliploidía el complemento haploide se encuentra multiplicado más de dos veces. Se ha observado que hay células poliploides obligadas como los megacariocitos, hepatocitos, células del músculo liso de las arterias y miocitos cardiacos, pero también puede haber células que se tornan poliploides debido a que han sido sometidas a un estado de estrés fisiológico⁶².

De los resultados obtenidos se deduce que la exposición al ion plata no afecta a ninguno de los eventos que conducen a una segregación cromosómica correcta durante la división celular, ni estructural ni funcionalmente. Por lo tanto, puede decirse que no es un agente aneugénico ni poliploidogénico.

- ***Frecuencia de aberraciones cromosómicas.***

Para evaluar este parámetro se emplearon las preparaciones de los seis donadores del inciso anterior. La cantidad y calidad de las figuras mitóticas no permitieron analizarlas en el número adecuado, principalmente las provenientes de cultivos

expuestos a 100 µg/mL de la sal de plata; en promedio se revisaron 40 mitosis por lote de cada donador. Los cultivos expuestos a mitomicina C (testigo positivo) se realizaron con muestras sanguíneas tomadas en fecha posterior y sólo pudieron obtenerse de cuatro de los seis donadores iniciales.

Las alteraciones estructurales que se registraron fueron: hendiduras sencillas (G') y dobles (G'') así como rompimientos sencillos (B') y dobles (B''); los datos de estos últimos (B' y B'') se emplearon para calcular la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los diferentes lotes³⁴. En la Tabla 9 se observa que hay mayor proporción de rompimientos en los cultivos tratados con AgNO₃ con respecto al testigo pero la diferencia entre ellos no resultó estadísticamente significativa (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). En cambio, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los cultivos expuestos a mitomicina C difiere significativamente de la registrada en los otros lotes (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$); en los cultivos de todos los donadores se presentó daño. Prácticamente todas las células afectadas sólo mostraron un tipo de alteración por ello los datos de proporción de células dañadas son similares a los de la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Tabla 9).

Nakamuro y Sayato⁶³ al exponer cultivos de linfocitos humanos a AgNO₃ en concentraciones de 0.6, 3.2 y 6.4 µg/mL tampoco encontraron diferencias significativas con respecto al lote testigo pero sí las observaron al exponer fibroblastos de piel de embrión humano a las dos concentraciones más elevadas, por lo cual concluyen que el ion Ag⁺ es un agente clastogénico débil. Este resultado además sugiere que cada tipo celular tiene una sensibilidad diferente.

Esos autores calcularon la frecuencia de aberraciones cromosómicas tomando en cuenta también a las hendiduras (*gaps*) sencillas y dobles (G' y G'', respectivamente) que convencionalmente se excluyen debido a que se desconoce su significado biológico³⁴.

Sin embargo, considerando que las alteraciones reflejan discontinuidad de la cromatina debida a su interacción con un agente tóxico y que implican ruptura y reunión de segmentos^{64, 65} no deberían ignorarse.

Tabla 9. Frecuencia de aberraciones cromosómicas registradas en metafases de linfocitos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo y a 40 ng/mL de mitomicina C (testigo positivo). Se presenta también la proporción de células dañadas en cada lote (daño celular).

Lote $\mu\text{g/mL}$	Donador	G´	G´´	B´	B´´	Total mitosis	Aberraciones por célula	Células dañadas	% Daño celular
0	1	9	0	3	0	60	0.05	3	5
	9	6	0	2	0	60	0.03	2	3.33
	10	8	0	5	0	60	0.08	5	8.33
	11	6	3	3	0	50	0.06	2	4
	16	3	0	0	0	60	0	0	0
	17	10	0	0	0	40	0	0	0
	Total	42	3	13	0	330	0.04	12	3.64
10	1	11	4	5	0	60	0.08	5	8.33
	9	6	0	2	0	50	0.04	2	4
	10	2	0	5	0	60	0.08	5	8.33
	11	7	4	6	0	60	0.1	3	5
	16	1	1	0	0	60	0	0	0
	17	7	2	5	0	20	0.25	3	15
	Total	34	11	23	0	310	0.07	18	5.81
100	1	16	7	0	0	36	0	0	0
	9	2	1	0	0	30	0	0	0
	10	4	0	5	0	40	0.13	5	12.05
	11	1	0	0	0	30	0	0	0
	16	4	1	6	0	50	0.2	10	20
	17	1	0	0	0	40	0	0	0
	Total	34	9	11	4	226	0.07	15	6.64
MMC 40 ng/mL	1	17	7	6	6	60	0.20	12	20
	9	6	0	1	0	60	0.02	1	1.67
	10	2	1	2	0	60	0.03	2	3.33
	17	6	3	6	0	40	0.15	6	15.00
	Total	31	11	15	6	220	0.10*	21	9.55*

*Diferencia significativa con respecto al lote testigo (Kruskal Wallis, $p < 0.05$).

En el caso particular de los datos de esta tesis analizados bajo esa premisa, se confirmó que no existen diferencias significativas entre los lotes expuestos a 0, 10 y 100 µg/mL aunque naturalmente se incrementó la frecuencia de aberraciones cromosómicas al incluir a las hendiduras de 0.04, 0.07 y 0.07 a 0.18, 0.22 y 0.23, respectivamente.

Tanto las aberraciones cromosómicas como la aneuploidía generan una situación de desequilibrio denominada inestabilidad cromosómica que está estrechamente relacionada con la tumorigénesis⁶⁶. De acuerdo con los resultados obtenidos el ion plata no propicia la inestabilidad cromosómica por lo que se puede concluir que no interfiere la segregación cromosómica durante la división celular ni afecta la integridad de la cromatina.

- ***Frecuencia de micronúcleos***

La presencia de micronúcleos es uno de los métodos mejor establecidos para evaluar daño cromosómico en células humanas. El procedimiento más confiable para cuantificarlos es mediante el bloqueo de la citocinesis con citocalasina B que permite obtener células binucleadas y que fue empleado en este trabajo⁶⁷.

En la Tabla 10 se muestran las proporciones de células con uno, dos, tres o más núcleos encontradas en 12000 células por lote de cada uno de los seis donadores. En todos los lotes las más abundantes fueron las células mononucleadas, seguidas por las binucleadas que estuvieron en número suficiente para cuantificar los micronúcleos.

En un promedio de 3000 células binucleadas por lote de cada donador se determinó la proporción de aquellas que no tuvieran micronúcleos así como las que presentarían, uno, dos o más de ellos. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 11 en la que se observa que predominan las células sin daño, es decir sin micronúcleos, en todos los lotes. En la misma se presenta la frecuencia promedio de

micronúcleos por célula en el lote testigo y los experimentales; la diferencia entre ellos no es significativa (Tukey, $p > 0.05$).

Tabla 10. Proporción de células con uno (MONO), dos (BI), tres (TRI) o más núcleos (> 3) encontrada en linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.

LOTE ($\mu\text{g/mL}$)	TIPO CELULAR	Proporción de células (%)						Promedio \pm EE
		DONADOR						
		1	2	3	4	5	6	
0	MONO	93.73	93.81	94.10	91.25	93.50	94.18	93.43 \pm 0.45
	BI	5.92	5.95	5.72	8.60	6.42	5.57	6.36 \pm 0.46
	TRI	0.30	0.19	0.17	0.15	0.08	0.22	0.19 \pm 0.03
	> 3	0.04	0.05	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02 \pm 0.01
10	MONO	90.48	91.69	94.25	92.80	93.98	93.98	92.86 \pm 0.62
	BI	9.209	5.76	5.67	7.03	5.80	5.80	6.55 \pm 0.57
	TRI	0.255	0.17	0.08	0.16	0.18	0.18	0.17 \pm 0.02
	> 3	0.058	0.02	0.00	0.00	0.03	0.03	0.02 \pm 0.01
100	MONO	89.52	94.19	93.78	89.69	93.07	96.16	92.74 \pm 1.07
	BI	10.14	5.69	6.12	9.37	6.85	3.73	6.98 \pm 0.98
	TRI	0.31	0.09	0.10	0.16	0.08	0.10	0.14 \pm 0.04
	> 3	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01 \pm 0.01

Es notoria la uniformidad de la respuesta de los distintos donadores en cuanto a proporción de células binucleadas y frecuencia de micronúcleos por célula pues se sabe que factores como la edad, el sexo, la dieta, el estilo de vida, pueden afectarla⁶⁸. El comportamiento observado puede atribuirse a que los criterios de inclusión de los donadores fueron adecuados.

Tabla 11. Proporción de células sin micronúcleos (0), con uno (1), dos (2), tres o más micronúcleos (3>) encontrada en linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 µg/mL de cultivo.

LOTE (µg/mL)	No. de Micronúcleos por célula	Proporción de células binucleadas (%)						Frecuencia promedio de micronúcleos por célula por lote ± EE	
		DONADOR							Promedio ± EE
		1	2	3	4	5	6		
0	0	97.56	97.53	98.26	98.13	98.45	97.90	97.97 ± 0.15	0.04 ± 0.01
	1	2.25	2.26	1.54	1.83	1.55	2.00	1.91 ± 0.13	
	2	0.12	0.22	0.20	0.04	0.00	0.10	0.11 ± 0.04	
	3 >	0.07	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02 ± 0.01	
10	0	97.84	97.94	98.79	97.9	98.4	97.35	98.04 ± 0.20	0.03 ± 0.00
	1	2.06	1.90	1.17	2.00	1.00	2.22	1.73 ± 0.51	
	2	0.07	0.16	0.00	0.20	0.13	0.33	0.15 ± 0.05	
	3 >	0.03	0.00	0.03	0.10	0.07	0.10	0.06 ± 0.02	
100	0	96.83	97.26	96.86	98.21	98.8	97.11	97.51 ± 0.33	0.05 ± 0.01
	1	2.70	2.42	2.74	1.67	1.10	2.62	2.21 ± 0.27	
	2	0.04	0.31	0.40	0.11	0.10	0.20	0.19 ± 0.06	
	3 >	0.07	0.00	0.00	0.07	0.00	0.07	0.04 ± 0.02	

Los micronúcleos pueden originarse a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos o de cromosomas completos que no fueron incluidos en el núcleo durante la telofase debido a que no se unieron correctamente a las fibras del huso durante la anafase, es decir, que la formación de micronúcleos está relacionada con las alteraciones en el número y la estructura cromosómica y, en consecuencia, con la inestabilidad cromosómica^{67, 69, 70}.

La frecuencia de micronúcleos registrada en este trabajo confirma la ausencia de efecto aneugénico y clastogénico del ion plata.

- **Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas**

A diferencia de las aberraciones cromosómicas, los intercambios de cromátidas hermanas no originan cambios en la forma de los cromosomas ni tampoco son

fuente de variación pues no originan nuevas formas alélicas como ocurre en el entrecruzamiento meiótico (*crossingover*)^{71 - 73}.

De las seis muestras sanguíneas cultivadas sólo en cinco de ellas se obtuvo material de buena calidad y en cantidad adecuada para realizar el análisis, excepto en algunos lotes experimentales, como se observa en la Tabla 12. En el lote testigo se registró variación en la frecuencia promedio de intercambios de cromátidas hermanas por célula entre los donadores la cual puede atribuirse a factores propios de las condiciones del cultivo, la tasa de proliferación, al estilo de vida, el género, la edad y factores de estrés al momento de tomar la muestra sanguínea^{41, 74, 75}.

Tabla 12. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas por célula encontrada en linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 0.01, 10 y 100 µg/mL de cultivo. (ND = no determinada).

DONADOR	Frecuencia promedio de intercambios de cromátidas hermanas por célula			
	LOTE (µg/mL)			
	0	0.01	10	100
1	6.56	1.26	7.55	11.25
2	3.32	3.48	8.1	12.24
3	4.32	6.44	ND	ND
4	2.86	ND	ND	ND
5	4.5	ND	ND	ND
Promedio ± EE	4.31 ± 0.64	3.73 ± 1.5	7.83 ± 0.28	11.75 ± 0.49*

*Diferencia significativa con respecto al testigo (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Si bien no fue posible obtener figuras mitóticas en cantidad suficiente para contar con una muestra más representativa del comportamiento de los cultivos expuestos a 10 y 100 µg/mL, se observa que la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas se incrementa en función directa de la concentración de nitrato de plata. Esta

tendencia se confirma con la diferencia estadística entre el lote testigo y el tratado con 100 µg/mL de AgNO₃ (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Desde que la tinción diferencial de cromátidas hermanas cobró auge como marcador de genotoxicidad en los años 70 del siglo XX, se ha reconocido que es más sensible que las aberraciones cromosómicas^{71, 72, 76, 77}y, en el presente trabajo, éste fue el primer parámetro que puso en evidencia el efecto genotóxico del ion plata.

Se considera que los ICH resultan del intercambio de productos de replicación del ADN en loci homólogos y, aunque aún no se precisa el mecanismo por el cual se forman, la mayoría de los investigadores tiende a pensar que son consecuencia de errores en la replicación del ADN, posiblemente en la horquilla de replicación misma. Esta incertidumbre ha propiciado que algunos investigadores desestimen el valor de este parámetro en la evaluación de riesgo pero ha sido tal su utilidad para establecer las relaciones dosis-respuesta de cientos de compuestos químicos que cualquier análisis citogenético que no los incluya se considera incompleto⁷⁸.

Casi la totalidad de los trabajos en los que se determina la frecuencia de ICH afirman que se desconoce su significado biológico pero Stetka⁷⁹ propuso que por sí mismos representan alteración del ADN en virtud de que todos los agentes mutagénicos inducen su formación, misma que implica ruptura e intercambio de cadenas de ADN y confirma que resultan de la interacción del ADN con el agente mutagénico. Lo que falta precisar es qué tipo de interacción ocurre.

- ***Cinética de proliferación***

El desarrollo de las técnicas de tinción diferencial de los cromosomas basadas en la incorporación de bromodesoxiuridina permitió la identificación precisa de las células en metafase que se habían replicado una, dos y hasta tres veces y brindó la oportunidad de examinar y cuantificar la cinética de proliferación celular^{41, 80}.

La cinética de proliferación es un parámetro que ha sido ampliamente utilizado en estudios de genética toxicológica y su reproducibilidad ha sido confirmada^{44, 46, 47}.

Como se puede apreciar en la Tabla 13, la respuesta de todos los donadores fue muy homogénea y la proporción de células en primero, segundo y tercer ciclos de replicación fue similar en todos los lotes; las diferencias entre ellos no son significativas (Tukey, $p > 0.05$).

Tabla 13. Proporción de células de 1º, 2º y 3er ciclos de replicación en linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 0.01, 10 y 100 µg/mL de cultivo.

LOTE (µg/mL)	DONADOR	Ciclo de replicación			Índice de replicación
		1º	2º	3º	
0	1	14.87	83.47	1.65	1.83
	4	10.48	89.51	0.00	
	5	28.57	71.42	0.00	
	7	23.75	71.25	5.00	
	15	15.00	85.00	0.00	
0.01	1	8.77	91.22	0.00	1.86
	7	9.160	90.83	0.00	
	15	22.95	77.04	0.00	
10	1	10.00	90.00	0.00	1.84
	7	22.13	77.86	0.00	
100	1	12.85	82.85	4.28	1.81
	7	32.00	66.00	2.00	

A diferencia de lo que ocurrió con el índice mitótico en los cultivos expuestos a nitrato de plata en concentración de 100 µg/mL (Tabla 5, Figura 3), el índice de replicación en esa misma concentración no difirió significativamente del testigo ni de los otros grupos experimentales. Este resultado sugiere que el ion plata es citotóxico pues

elimina a las células pero aquellas que sobreviven a ese efecto conservan su capacidad de proliferación sin que la progresión del ciclo celular se altere.

- ***Daño al ADN: rompimientos de cadena sencilla (ensayo cometa)***

Sin duda alguna uno de los marcadores más empleados para estimar daño a la molécula de ADN es el de la electroforesis unicelular, mejor conocido como *ensayo cometa*, debido a que es sensible, rápido, relativamente sencillo y económico⁴². Se basa en que los fragmentos de ADN que se forman como consecuencia de su interacción con un agente tóxico presentan movilidad electroforética; la longitud de la migración está en función directa del daño provocado⁸¹. Las alteraciones que pueden detectarse bajo condiciones alcalinas (pH > 13) son rompimientos de cadena sencillos y dobles, sitios de reparación incompleta, sitios sensibles al álcali y posiblemente entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-Proteína⁸². Sus principales ventajas son que detecta daño en una sola célula, requiere de una muestra de células relativamente pequeña (< 10,000), su alta sensibilidad y que puede emplearse en estudios *in vitro* e *in vivo*, utilizando diversos modelos experimentales^{83, 84}.

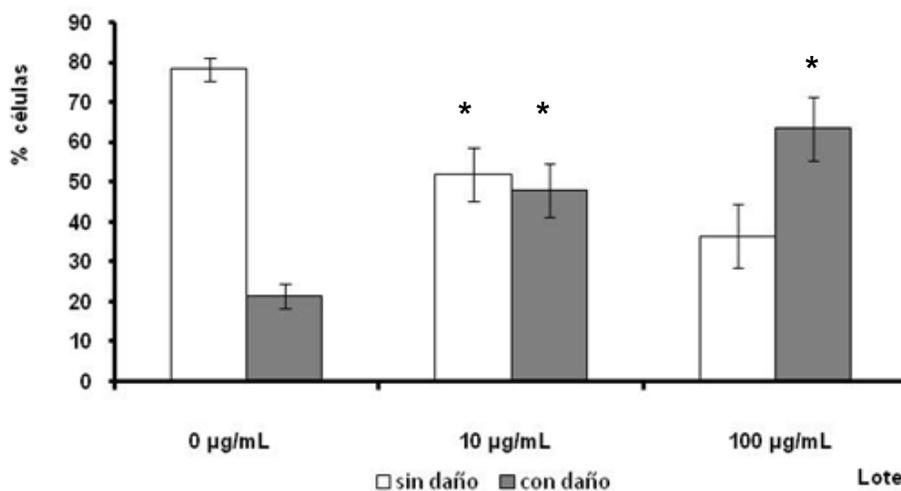
Los datos de la Tabla 14 muestran que en la mayor parte de las células del lote testigo el ADN conservó su integridad mientras que en los experimentales esa fracción de células sin daño disminuyó en función directa de la concentración. En el lote tratado con 10 µg/mL la proporción de células con daño al ADN se incrementó a más del doble que en el testigo y en el expuesto a 100 µg/mL prácticamente se triplicó (292 %). Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas (Tukey, $p < 0.05$).

En la Figura 4 se representan gráficamente los promedios de células con y sin daño en el ADN y es más evidente el efecto genotóxico del nitrato de plata. Estos resultados confirmaron que, efectivamente, el ensayo cometa es un biomarcador muy sensible ya que fue el primero en el que la menor concentración empleada resultó tóxica.

Tabla 14. Proporción de linfocitos humanos sin y con daño en el ADN por exposición a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.

DONADOR	LOTE ($\mu\text{g/mL}$)					
	0		10		100	
	sin daño	con daño	sin daño	con daño	sin daño	con daño
1	80.00	20.00	66.67	33.33	65.83	34.17
5	69.00	31.00	32.00	68.00	8.00	92.00
7	89.47	10.53	72.50	27.50	59.17	40.83
8	60.00	40.00	22.00	78.00	12.00	88.00
9	85.37	14.63	65.46	34.54	61.98	38.02
10	85.12	14.88	72.73	27.27	53.41	46.59
18	77.00	23.00	17.00	83.00	0.00	100.00
19	85.00	15.00	69.00	31.00	56.00	44.00
20	82.50	17.50	54.17	45.83	24.17	75.83
21	71.00	29.00	48.00	52.00	24.00	76.00
Promedio \pm EE	78.45 \pm 2.91	21.54 \pm 2.91	51.95 \pm 6.73*	48.05 \pm 6.73*	36.46 \pm 7.77*	63.54 \pm 7.77*

*Diferencia significativa con respecto al lote testigo (Tukey, $p < 0.05$).



*Diferencia significativa con respecto al lote testigo (Tukey, $p < 0.05$).

Figura 4. Proporción de linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo sin y con daño al ADN.

Con respecto a la longitud de la migración del ADN en la fracción de células dañadas, se observó variación individual tanto en el daño basal como en la respuesta al ion plata (Tabla 15). La longitud promedio de la migración del ADN en los cultivos tratados con 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de nitrato de plata fue mayor, con respecto al testigo, en 16 y 25 %, respectivamente: estas diferencias fueron significativas (Tukey, $p < 0.05$).

Tabla 15. Longitud promedio (μm) de la migración de ADN de linfocitos humanos expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo.

DONADOR	Longitud promedio de la migración del ADN ($\mu\text{m} \pm \text{EE}$)		
	Lote ($\mu\text{g/mL}$ de cultivo)		
	0	10	100
1	92.87 \pm 6.09	111.97 \pm 4.02	117.39 \pm 4.75
2	89.87 \pm 5.87	110.91 \pm 3.58	111.90 \pm 2.92
3	81.93 \pm 6.13	91.88 \pm 5.18	97.59 \pm 4.68
4	84.18 \pm 5.55	95.20 \pm 3.98	113.91 \pm 3.04
5	79.04 \pm 6.05	103.79 \pm 3.83	116.48 \pm 4.18
6	82.37 \pm 7.67	84.38 \pm 5.12	117.01 \pm 5.62
7	73.69 \pm 6.66	88.43 \pm 4.99	95.22 \pm 4.30
8	66.63 \pm 9.28	90.40 \pm 5.59	102.72 \pm 5.72
9	128.33 \pm 7.84	145.93 \pm 5.38	132.72 \pm 4.44
10	104.67 \pm 4.95	90.54 \pm 4.48	97.71 \pm 3.24
Promedio \pm EE	88.36 \pm 6.58	101.34 \pm 4.61*	110.26 \pm 4.29*

*Diferencia significativa con respecto al lote testigo (Tukey, $p < 0.05$).

Dentro del grupo de células que sufrieron daño en cada lote, algunas fueron más sensibles que otras, es decir, la extensión del desplazamiento del ADN fue mayor ante el mismo estímulo, ya fuera por la condición propia del cultivo (lote testigo), o bien, por la exposición al nitrato de plata (lotes experimentales). En la Tabla 16 se presenta la distribución de las células en intervalos de longitud de la migración del ADN.

Tabla 16. Distribución de los linfocitos expuestos a nitrato de plata en intervalos de longitud de la migración del ADN dañado.

Lote ($\mu\text{g/mL}$)	Proporción de células									
	Intervalos de longitud de la migración electroforética del ADN (μm)									
	1-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	121-140	141-160	161-180	181-200
0	1.62	2.85	3.49	4.83	4.25	2.46	0.84	0.56	0.56	0.09
10	0.67	4.86	9.73	7.71	9.34	7.18	4.38	2.31	1.16	0.87
100	0.04	4.45	6.55	14.55	13.60	11.50	5.72	3.81	1.97	0.70

Se encontraron células con daño desde 1 hasta 200 μm en todos los lotes pero en los experimentales la mayoría estuvo entre 81 y 140 μm . En la Figura 5 se aprecia claramente este comportamiento.

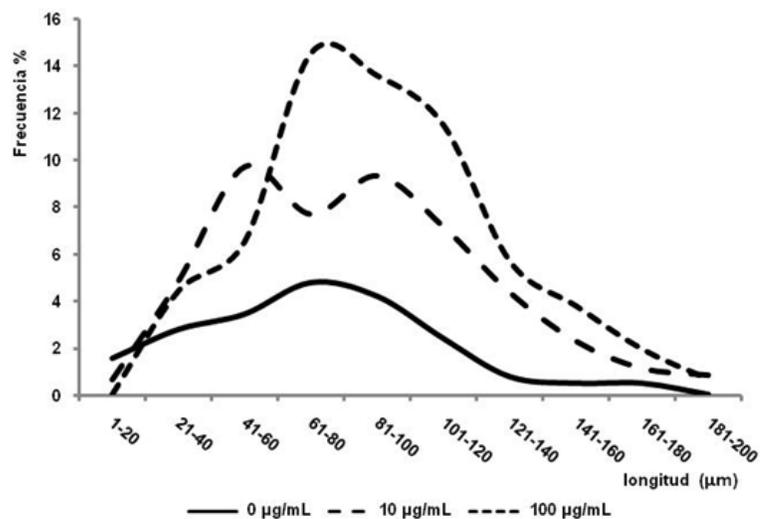


Figura 5. Distribución de la migración electroforética del ADN de linfocitos tratados con nitrato de plata en concentraciones de 0, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados del ensayo cometa confirman la genotoxicidad del ion plata registrada con la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas y, debido a que la longitud de la migración del ADN es un marcador más sensible aún, el efecto sobre el ADN se registró a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Desde los años 60 se ha prestado atención a la interacción del ADN con los iones metálicos y se descubrió que hay dos puntos de interacción: los fosfatos del esqueleto de azúcar y los sitios donadores de electrones en las bases. Cuando la interacción ocurre con los grupos fosfato el resultado es una mayor estabilidad de la estructura mientras que, si es entre el ion y los nucleótidos, se desestabiliza⁸⁵.

Aunque al ion plata no se le ha reconocido un papel biológico, desde esa época se estudió su interacción con el ADN encontrándose que por cada cuatro bases se intercala un ion plata y si lo hace cerca de un residuo de guanina, se incrementa la estabilidad de la estructura debido a la formación de al menos un par guanina-citosina. Cuando la proporción P/Ag aumenta, la plata se intercala entre esos pares dando lugar a cambios conformacionales que resultan en una nueva doble hélice de estructura desconocida e insensible a temperaturas entre 20 y 100 °C⁸⁶.

Estudios más recientes han confirmado que el ion plata interactúa más con las bases que con los grupos fosfato y el azúcar del ADN, pudiendo unirse con el átomo de nitrógeno 3 de la citosina en los pares C-C que ocurren naturalmente. La unión da como resultado la formación de un par de bases C-Ag_(I)-C en la doble hélice de ADN⁸⁷.

Considerando estos antecedentes es muy probable que el resultado de la interacción Ag⁺-ADN provoque los rompimientos de cadena sencilla que fueron revelados por el ensayo cometa.

- ***Reparación del daño al ADN***

El experimento realizado para determinar si la célula era capaz de reparar el daño al ADN ocasionado por el ion plata mostró que, en efecto, la célula se recupera. En la Tabla 17 se presenta la proporción de células con daño registrada al concluir el periodo de exposición y luego de haber lavado las células, así como 24, 48 y 72 horas después. En el lote testigo se registró un aumento no significativo (Tukey, p >0.05) de células con daño mientras que en el experimental esa proporción fue disminuyendo hasta que, después de 48 horas de recuperación la diferencia en la

cantidad de células con daño entre el lote testigo y el experimental dejó de ser significativa (Tukey, $p > 0.05$).

Tabla 17. Proporción de linfocitos humanos que mostraron daño al ADN a las 0, 24, 48 y 72 después de haber sido expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo. (ND = no determinada).

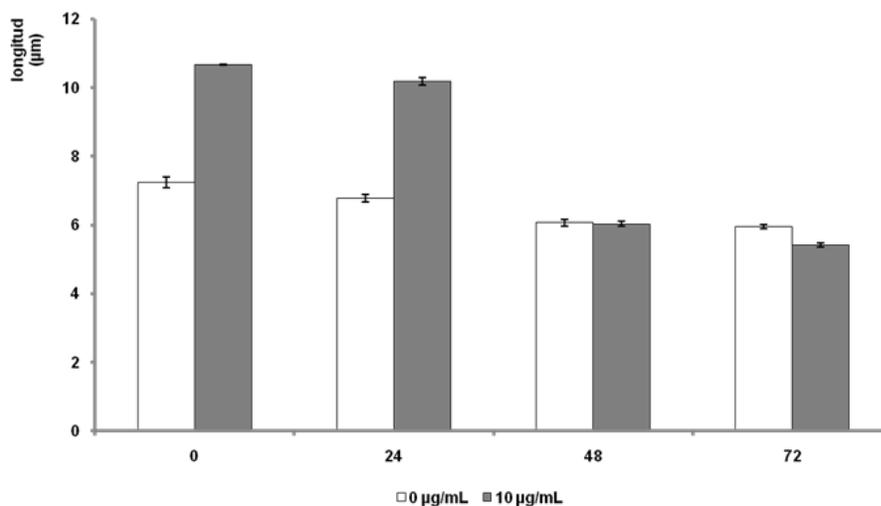
DONADOR	Proporción de células con daño al ADN (%)							
	0 $\mu\text{g/mL}$				10 $\mu\text{g/mL}$			
	Tiempo de recuperación				Tiempo de recuperación			
	0	24	48	72	0	24	48	72
1	39.5	19.65	ND	ND	60	20	ND	ND
5	46	46	67	70.5	85.65	95	69.5	73
7	52.5	24	ND	ND	99.5	90	ND	ND
22	60.5	65	ND	ND	99	93.5	ND	ND
23	30	100	67.5	73.5	99.5	100	82.5	73
24	54.5	30.5	ND	ND	46.4	21	ND	ND
25	39.34	86.25	ND	ND	96	84	ND	ND
26	48	47	48	59	84.67	90	44	61
27	74.67	73.5	73	82	84.5	97	80	78.5
28	63.33	51.5	ND	ND	88.56	87	ND	ND
Promedio ± EE	50.83 ± 4.16	54.34 ± 7.70	63.88 ± 2.92	71.25 ± 2.38	84.38 ± 5.38*	77.75 ± 8.47*	69.00 ± 4.54	71.38 ± 1.79

*Diferencia significativa con respecto al testigo (Tukey, $p < 0.05$)

En la Figura 6 se aprecia más claramente este comportamiento de disminución de células con daño en los cultivos expuestos al nitrato de plata.

Con respecto a la longitud promedio de la migración electroforética del ADN también se redujo de manera significativa a partir de las 48 horas de recuperación. En la Tabla 18, se presenta un resumen de los datos registrados. Se observa que en las células no expuestas la magnitud del daño mostró poca variación mientras que en aquellas tratadas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de nitrato de plata, la migración se redujo a la mitad

después de 72 horas de recuperación y el valor es prácticamente el mismo que en el lote testigo.



Diferencia significativa con respecto al testigo (Tukey, $p < 0.05$)

Figura 6. Distribución de linfocitos humanos que mostraron daño al ADN a las 0, 24, 48 y 72 horas después de haber sido expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0 y 10 µg/mL de cultivo.

Tabla 18. Longitud promedio (µm) de la migración de ADN de linfocitos humanos que mostraron daño al ADN a las 0, 24, 48 y 72 horas después de haber sido expuestos a nitrato de plata en concentraciones de 0 y 10 µg/mL de cultivo.

LOTE (µg/mL)	Longitud promedio de la migración del ADN (µm ± EE)			
	Tiempo de recuperación después de la exposición a AgNO ₃ (horas)			
	0	24	48	72
0	7.25 ± 0.16	6.78 ± 0.12	6.07 ± 0.10	5.95 ± 0.07
10	10.66 ± 0.01*	10.17 ± 0.11*	6.03 ± 0.07	5.41 ± 0.06

**Diferencia significativa con respecto al testigo (Tukey, $p < 0.05$)*

Los resultados del ensayo cometa muestran que inicialmente la exposición al ion plata incrementó significativamente la frecuencia de rompimientos de cadena sencilla

debidos posiblemente a la alteración de la estructura de la doble hélice, por lo que el mecanismo de reparación que más probablemente se active en los linfocitos sea el de escisión de nucleótidos que reconoce lesiones voluminosas que distorsionan a la molécula de ADN como aductos, lesiones inducidas con radiación UV y dímeros de pirimidinas, entre otros⁸⁸.

El hecho de que las células se recuperen del daño después de 48 horas sugiere que muy probablemente ese mecanismo de reparación se active desde el primer contacto con la plata pero que su eficiencia sea mayor a partir del momento en que es retirada del medio celular.

CONSIDERACIONES GENERALES

El amplio espectro de aplicaciones que han tenido la plata y sus productos se debe principalmente a su efecto antimicrobiano. La resistencia de los microorganismos a los antibióticos actuales, el auge que ha cobrado el desarrollo de las nanopartículas de plata como agentes terapéuticos y como base para la elaboración de cosméticos y productos domésticos así como las propiedades no confirmadas que se han atribuido principalmente a los productos de plata coloidal, han propiciado su uso descontrolado^{7, 8}.

Aunado a esto, el Perfil Toxicológico de la plata TP-90-24 elaborado por la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (1990)² que es un documento considerado como de alta confiabilidad y credibilidad por haber sido elaborado y patrocinado por los Estados Unidos de Norte América, establece que “la única condición clínica atribuible a la exposición prolongada a la plata o sus compuestos es el oscurecimiento del color de la piel en las áreas de contacto. No hay estudios en seres humanos y la mayor parte de la información sobre la genotoxicidad de este metal proviene de ensayos *in vitro*, predominantemente microbiológicos”, premisa que podría haber servido de amparo a los intereses comerciales.

Llama la atención que ese Perfil no haya sido revisado y actualizado pues existen reportes en la literatura sobre la existencia de bacterias resistentes a la plata⁷ y casos clínicos de argiria producida por el consumo vía oral de proteína de plata coloidal como suplemento alimenticio²¹ o por consumo de gotas para los ojos por largo tiempo⁵. Además hay evidencias, incluidas en el Perfil mismo, acerca de que la argiria no es una afección exclusiva del tejido dérmico sino que la exposición crónica a la plata ocasiona que también se acumule en las mucosas nasales, pulmonares, oculares e, incluso, en el cerebro^{2, 5, 10, 20, 23}.

Afortunadamente hay investigadores que están alertando sobre esta falta de regulación de los usos de la plata, de las consecuencias del consumo indiscriminado de sus productos y dedican sus esfuerzos a estudiar los efectos de este metal en seres humanos^{5, 7, 26}.

Los resultados del trabajo de tesis realizado contribuyen a este conocimiento en virtud de que la muestra poblacional fue uniforme en cuanto a composición y, además, se empleó siempre el mismo criterio y nivel de rigurosidad. Los marcadores empleados son citológicos los cuales requieren de mayor tiempo y dedicación para su análisis pero permiten realizar observaciones cualitativas, como cambios en la morfología y comportamiento celular, a diferencia de lo que ocurre en los ensayos bioquímicos.

Los siete criterios evaluados brindan información a nivel celular, subcelular y molecular y permiten concluir que la forma iónica de la plata es citotóxica y genotóxica pues los linfocitos humanos en cultivo no sobreviven a concentraciones superiores a 100 µg/mL, se reproducen menos pero sin alteración en su tiempo de generación. Existen evidencias de que la plata no afecta la cromatina, mismas que se confirmaron al no encontrarse incremento significativo de las frecuencias de aberraciones cromosómicas ni de micronúcleos, pero interactúa negativamente con el ADN incrementando la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas y de rompimientos sencillos de la cadena. Por el tipo de daño registrado se infiere que el

mecanismo de reparación que participa es el de escisión de nucleótidos cuya eficiencia se incrementa al retirar la plata del entorno celular.

Si bien las células cuentan con mecanismos de reparación del daño ocasionado por la plata, debe hacerse un uso racional de este ion para evitar saturarlos y también para no propiciar mutaciones en los microorganismos que les confieran resistencia a ella.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cotton AF, Wilkinson G. Química inorgánica avanzada. Limusa. México. p1669 (2006)
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for silver. TP-90-24. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1990).
3. Morones RR. Historia de la plata: su impacto en las antiguas civilizaciones y la sociedad moderna. Revista Digital Universitaria 11(7) ISSN: 1067-6079. Coordinación de Publicaciones Digitales. DGSCA-UNAM (2010).
4. Cotton AS. Chemistry of precious metals (libro electrónico). Blackie Academic & Professional. London. p 361 (1997).
5. Drake PL, Hazelwood KJ. Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. Annals of Occupational Hygiene 49:575-585 (2005).
6. Silver Institute. http://www.silverinstitute.org/silver_uses.php (Página consultada el 13 de noviembre de 2012).
7. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. FEMS Microbiology Reviews 27:341-353 (2003).
8. US Department of Health and Human Services, National Institute of Health, National Center for Complementary and Alternative Medicine. Colloidal silver products. <http://nccam.nih.gov/health/silver/> (Página consultada el 15 de noviembre de 2012).
9. WHO. Summary of Toxicological data for certain food additives. WHO Food Additives Series No. 12 (1977).
10. Lansdown ABG. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. Advances in Pharmacological Sciences. DOI:10.1155/2010/910686. (2010).

11. Levine W G. Biliary excretion of drugs and other xenobiotics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 18:81-96 (1978).
12. Silvestry-Rodriguez N, Sicairos-Ruelas EE, Gerba CP, Bright KR. Silver as a disinfectant. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 191:23-45 (2007).
13. Fung MC, Bowen DL. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. *Clinical Toxicology* 34:119-126 (1996).
14. Rozman KK, Klaasen CD. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: Klaasen CD (Ed.). *Casarett / Doull's Toxicology*. McGraw Hill. USA. (2001).
15. Landsdown ABG. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. In: Hipler UC, Elsner P. (Eds). *Biofunctional textiles and the skin*. S Karger AG. Switzerland. (2006).
16. DiVincenzo GD, Giordano CJ, Schriever LS. Biologic monitoring of workers exposed to silver. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 56:207-215 (1985).
17. Gregus Z, Klaasen CD. Disposition of metals in rats: a comparative study of fecal, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 85:24-38 (1986).
18. Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaasen CD (Ed.). *Casarett / Doull's Toxicology*. McGraw Hill. USA. (2001).
19. Boosalis MG, McCall JT, Ahrenholz DH, Solem LD, McClain CJ. Serum and urinary silver levels in thermal injury patients. *Surgery* 101:40-43 (1987).
20. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Opinion on toxicological data on colouring agents for medicinal products: E 174 Silver. (2000).
21. Gulbranson SH, Hud JA, Hansen RC. Argyria following the use of dietary supplements containing colloidal silver protein. *Cutis* 66:373-374 (2000).
22. Landsdown ABG. Critical observations on the neurotoxicity of silver. *Critical Reviews in Toxicology* 37: 237-250 (2007).
23. Whadera A, Fung M. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver *Dermatology Online Journal* 11:12-23 (2005).
24. Palamar M, Midilli R., Egrilmez S, Akalin T, Yagci A. Black tears (Melanodacryorrhea) from argyrosis. *Archives of Ophthalmology* 128: 503-505 (2010).

25. Shavlovski MM, Chebotar NA, Konopistseva LA, Zakharova ET, Kachourin AM, Vassiliev VB, Gaitskhoki VS. Embryotoxicity of silver ions is diminished by ceruloplasmin – further evidence for its role in the transport of copper. *BioMetals* 8:122-128 (1995).
26. Hollinger M A. Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Critical Reviews in Toxicology* 26:255-260 (1996).
27. Poon VKM, Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns* 30:140-147 (2004).
28. Reddy PN, Peña-Méndez EM, Havel J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *Journal of Applied Biomedicine* 6:117-129 (2008).
29. AshaRani PV, Prakash HM, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology* 10: 65. DOI:10.1186/1471-2121-10-65. (2009).
30. Nowack B, Krug HF, Height M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environmental Science & Technology* 45:1177-1183 (2011).
31. Asare N, Instanes C., Sandberg WJ, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, Brunborg G. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 291: 65-72 (2012).
32. Beer C., Foldbner R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H. Toxicity of silver nanoparticles – Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters* 208: 286-292 (2012).
33. Arakaki D, Sparkes R, Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 2:57 (1963).
34. Preston RJ, San Sebastian JR, McFee AF. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutation Research* 189:175-183 (1987).
35. Moorhead PS, Nowell PD, Melman WJ, Battips DM, Hungerford PS. Chromosome preparations of leukocyte culture from peripheral blood. *Experimental Cell Research* 20:613-615 (1960).
36. Mukherjee A, Agarwal K, Aguilar MA, Sharma A. Anticlastogenic activity of beta carotene against cyclophosphamide in mice in vivo. *Mutation Research* 263:41-46 (1991).
37. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research* 285:35-44 (1993).

38. Natarajan AT, Obe G. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays. *In: Heddle J (Ed.). Mutagenicity. New Horizons in Genetic Toxicology. Academic Press. USA. (1982).*
39. Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature 251:156-158 (1974).*
40. Tice R, Schneider EL, Rary JM. The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Experimental Cell Research 102:232-326 (1976).*
41. Lamberti L, Bigatti Ponzetto P, Ardito G. Cell kinetics and sister-chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutation Research 120:193-199 (1983).*
42. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Experimental Cell Research 178: 184-191 (1988).*
43. Waymouth C. Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. *In Vitro 6:109-127 (1970).*
44. Rojas E, Montero R, Herrera L, Sordo M, Gonsebatt ME, Rodríguez R, Ostrosky-W P. Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutation Research 282:283-286 (1992).*
45. Rojas E, Herrera L, Sordo M, Gonsebatt ME, Montero R, Rodríguez R, Ostrosky-W P. Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs 4:637-640 (1993).*
46. Ostrosky-Wegman P. El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico, *Gaceta médica de México, Academia Nacional de Medicina, 130:432-437 (1994).*
47. Gonsebatt M, Herrera L, Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring. *In: Butterworth, F, Corkum LD, Guzman-Rincón J. Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. Plenum Press. USA. (1995).*
48. Aguilar MA, Espinosa S, Rodríguez L, Piña C. Biocompatibility in vitro tests of Zinalco. *Mutation Research 446:129-134 (1995).*
49. Faust AR. Toxicity summary for silver. Chemical Hazard Evaluation and Communication Group. Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program. (1982).
50. Goldberg RL, Kaplana SR, Fullera GC. Effect of heavy metals on human rheumatoid synovial cell proliferation and collagen synthesis. *Biochemical Pharmacology 32:2763-2766 (1983).*

51. Hidalgo E, Domínguez C. Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicology Letters* 98:169-179 (1998).
52. Sun J, Aoki K, Wang W, Guo A, Misumi J. Sodium nitrite-induced cytotoxicity in cultured human gastric epithelial cells. *Toxicology in Vitro* 20:1133-1138 (2006).
53. Kumar S, Barthwal MK, Dikshit M. Nitrite-mediated modulation of HL-60 cell cycle and proliferation: involvement of cyclin-dependent kinase 2 activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 337:812-821 (2011).
54. Bharadwaj L, Dhama K, Schneberger D, Stevens M, Renaud C, Ali A. Altered gene expression in human hepatoma HepG2 cells exposed to low-level 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and potassium nitrate. *Toxicology in Vitro* 19:603-619 (2005).
55. Mpountoukas P, Vantarakis A, Sivridis E, Lialiaris T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food and Chemical Toxicology* 46:2390-2393 (2008).
56. Parry JM, Parry EM, Bourner R, Doherty A, Ellard S, O'Donovan J, Hoebee B, de Stoppelaar JM, Mohn GR, Önfelt A, Renglin A, Schultz N, Söderpalm-Berndes C, Jensen KG, Klrsch-Volders F, Elhajouj A, Van Hummelten P, Degraessl F, Antoccla A, Clmini D, Izzo M, Tanzarella C, Adler I-D, Khesch U, Schriever-Schwemmer G, Gasser P, Crebelli R, Carere A, Andreoli C, Benigni R, Leopardi P, Marcon F, Zinjo Z, Natarajan AT, Boei JJWA, Kappas A, Voutsinas G, Zarani FE, Patrinely A, Pachierotti F, Tiveron C, Hess P. The detection and evaluation of aneugenic chemicals. *Mutation Research* 353:11-46 (1996).
57. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* 4:253-265 (2004).
58. Clift D, Marston AL. The role of Shugoshin in meiotic chromosome segregation. *Cytogenetic and Genome Research* 133:234-242 (2011).
59. MacQueen AJ, Hochwagen A. Checkpoint mechanisms: the puppet masters of meiotic prophase. *Trends in Cell Biology* 21:393-400 (2011).
60. Birk M, Bürkle A, Pekari K, Maier T, Schmidt M. Cell cycle-dependent cytotoxicity and mitotic spindle checkpoint dependency of investigational and approved antimetabolic agents. *International Journal of Cancer*.130: 798-807 (2012).
61. Tang Y-Ch, Williams BR, Siegel JJ, Amon A. Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds. *Cell* 144:499-512 (2011).
62. Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: Occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Experimental Hematology* 28:3-16 (2000).

63. Nakamuro K, Sayato Y. Studies on the toxicity of silver ion in water filtered through a household water purifier equipped with a silver-coated charcoal filter. *Esisei Kagaku* 32:28-33 (1986).
64. Savage JRK. An Introduction to Chromosomal Aberrations. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. <http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/Chromaber.html> (1999).
65. Hlatky L, Farber D, Sachs RK, Vazquez M, Cornforth MN. Radiation-induced chromosome aberrations: insights gained from biophysical modeling. *BioEssays* 24:714-723 (2002).
66. Thompson TL, Compton D.A. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *The Journal of Cell Biology* 180:665-672 (2008).
67. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26:125-132 (2011).
68. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26:43-49 (2011).
69. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28: 227-236 (2005).
70. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* 600:58-66 (2006).
71. Perry P, Evans HJ. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258:121-125 (1975).
72. Wolff S. Sister Chromatid Exchange. *Annual Review of Genetics* 11:183-201 (1977).
73. Barile F.A. *Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods*. CRC Press, Inc. USA. (1994).
74. Fischman HK, Kelly DD. Chromosomes and stress. *International Journal of Neuroscience* 99:201-219 (1999).

75. Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S. Sister Chromatid Exchange and Micronucleus Frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31:228-242 (1998).
76. Kato H, Shimada H. Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal level. *Mutation Research* 28:459-464 (1975).
77. Carrano AV, Thompson LH, Lindl PA, Minkler JL. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271:551-553 (1978)
78. Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research Reviews in Genetic Toxicology* 365:147-159 (1996).
79. Stetka DG. Operative and non-operative mechanisms of sister chromatid exchange. In: Sandberg AA. *Sister chromatid exchange*. Alan R. Liss, Inc. USA. Pp99-114. (1982).
80. Tice R, Schneider L, Rary M. The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Experimental Cell Research* 102:232-326 (1976).
81. Tice R. The Comet Assay: The First 25 Years. Proceedings of the 8th. International Comet Assay Workshop. Faculty of Pharmacy, University of Perugia, Italy. August 27-30. p 3 (2009).
82. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honmah M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Unom Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research* 627:31-35 (2007).
83. Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. Comet Assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30:139-146 (1997).
84. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206-221 (2000).
85. Eichhorn GL, Shin Y A. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *Journal of the American Chemical Society* 90:7323-7328 (1968).

86. Daune M. Interactions of metal ions with nucleic acids. *In*: Siegl H, Sigel A. (Eds.) Metal ions in biological systems. Vol.1. Marcel Dekker, Inc. USA. (1974).
87. Ono A, Cao S, Togashi H, Tashiro M, Fujimoto T, Machinami T, Oda S, Miyake Y, Okamoto Y, Tanaka T. Specific interactions between silver(I) ions and cytosine-cytosine pairs in DNA duplexes. *The Royal Society of Chemistry. Chemical Communications* 39:4825-4827 (2008).
88. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3-34 (2003).

Anexo 1

DONADOR		Sexo	Edad	Osmolaridad	Índice Mitótico	Número cromosómico	Aberraciones cromosómicas	Micronúcleos	ICH	Migración ADN	Recuperación
MAAS	1	F	38	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MLG	2	F	25		✓						
CG	3	M	24		✓						
GRR	4	F	37		✓				✓		
DDP	5	M	33		✓			✓	✓	✓	✓
IR	6	M	23		✓			✓			
LMC	7	F	36		✓			✓	✓	✓	✓
MLG	8	F	23		✓					✓	
EC	9	M	30		✓	✓	✓			✓	
HS	10	M	34		✓	✓	✓	✓	✓	✓	
GU	11	F	23			✓	✓		✓		
YH	12	F	27					✓			
JLG	13	M	30	✓							
AD	14	M	25	✓							
SC	15	F	32						✓		
EBG	16	M	28			✓	✓				
SG	17	M	25			✓	✓				
GG	18	F	30							✓	
LE	19	F	27							✓	
EM	20	M	31							✓	
SI	21	M	23							✓	
GF	22	F	22								✓
CR	23	F	24								✓
FR	24	M	27								✓
EP	25	M	25								✓
BVM	26	F	29								✓
FDL	27	M	29								✓
FRC	28	M	19								✓