



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

---

---

CENTRO DE NANOCIENCIAS Y  
NANOTECNOLOGÍA

*Evaluación de citotoxicidad de  
nanopartículas de plata en cultivos primarios  
de ratones BALB/c*

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

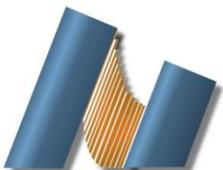
*Alberto Blanco Salazar*

TUTOR DE TESIS

*Dra. Yanis Toledano Magaña*

*Dr. Juan Carlos García Ramos*

Ensenada, Baja California, diciembre 2020





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

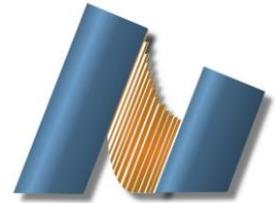
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**



**LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA**  
**BIONANOTECNOLOGÍA**

## **Evaluación de citotoxicidad de nanopartículas de plata en cultivos primarios de ratones BALB/c**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:**  
**LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**ALBERTO BLANCO SALAZAR**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA**  
**DR. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA DICIEMBRE 2020**

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

---

*ALBERTO BLANCO SALAZAR*

## Agradecimientos

A mi directora de tesis, Dra. Yanis Toledano Magaña.

A mi codirector de tesis, Dr. Juan Carlos García Ramos.

A mis sinodales:

Dra. Nina Bogdanchikova

Dra. María Evarista Arellano García

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes

Al Laboratorio de Nanomedicina en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y a sus miembros.

Al Laboratorio de Nanomedicina y Nanotoxicología y a sus miembros de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California y a sus miembros.

A la Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en biomedicina, alimentación y bioseguridad del Conacyt y a sus miembros.

A mi familia y amigos, en Ensenada y en CDMX.

A todos quienes de alguna forma contribuyeron a mi formación profesional y personal.

## Dedicatoria

A mi hermano, Luis Adrián Blanco Salazar, quien siempre me ha acompañado incondicionalmente. Por enseñarme el valor de la familia.

A mi familia en CDMX:

A mi padre, Alberto Blanco Ochoa, por ser mi guía, por tus incontables consejos y por nunca dejar de velar por mí. Por enseñarme a continuar sin importar las circunstancias.

A mi hermana mayor, María José Blanco Salazar, por tu compañía, por ser mi ejemplo y por tu empeño en cumplir tus metas. Por enseñarme a esforzarme para mejorar cada día.

A mi hermana menor, Fátima Blanco Salazar, por tu apoyo, por ser mi confidente y por todas tus travesuras. Por enseñarme a sonreír a pesar de las adversidades.

A mi familia en Ensenada:

A mi tutora, Yanis Toledano Magaña, por ser mi madre académica, por tu tiempo, enseñanzas y cuidados, por compartirme tu forma de ver las cosas. Por enseñarme a actuar por los motivos correctos.

A mi cotutor, Juan Carlos García Ramos, por ser mi padre académico, por las lecciones de docencia e impulsarme a tomar mis propias decisiones. Por enseñarme la importancia de equivocarme.

A mi amigo, José Antonio Rodríguez Arenas, por formar parte del binomio maravilla, por ser mi compañero de desvelos y de ideas geniales. Por enseñarme a no preocuparme si algo no puede resolverse.

A mi amiga Aranzazu González Schiefenbusch, por tus palabras de aliento, por siempre estar, por decirme cuando me equivoco. Por enseñarme la importancia del amor propio.

A mi amiga, Marylin Gil Martínez, por tu apoyo en el proceso de escritura de la tesis y cuidar a la Candy. Por enseñarme a hacerme valer.

A mi sinodal, Nina Bogdanchikova, por ser mi abuela académica, por tu confianza y tus numerosas preguntas. Por enseñarme el valor de la constancia.

A mi sinodal y profesora, María Evarista Arellano García, por ser mi abuela académica, por tus experiencias y aportaciones en mi formación. Por enseñarme la importancia de simplificar los conceptos.

A todos quienes de alguna forma contribuyeron a mi formación profesional y personal.

## Resumen

Con los avances registrados por la nanotecnología en los últimos años y la amplia gama de aplicaciones de los nanomateriales que con mayor frecuencia se encuentran en el mercado, el ser humano se encuentra cada vez más expuesto a los posibles efectos adversos de los nanomateriales. Las nanopartículas de plata destacan por ser los nanomateriales más comercializados y utilizados con intereses biomédicos y en el área de la salud. Se han utilizado principalmente porque sus propiedades fisicoquímicas únicas les confieren un potencial agente antimicrobiano y anticancerígeno.

Los resultados de citotoxicidad de nanomateriales como las AgNPs que han sido reportados en la literatura presentan una falta de sistematicidad en los modelos de evaluación, siendo las líneas celulares las más utilizadas para determinar los efectos toxicológicos de estos materiales. Se ha identificado que los efectos citotóxicos dependen de la línea celular utilizada para las determinaciones, esto aunado al hecho de que muchos resultados son contradictorios o no tienen una correlación con los estudios realizados en organismos vivos. En este sentido, los cultivos primarios se han recomendado por su sensibilidad a evaluaciones toxicológicas, además de que al ser células aisladas de tejidos guardan mejor sus características bioquímicas y sus funciones se asemejan más a las de un organismo vivo. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto citotóxico de cinco formulaciones de nanopartículas de plata Argovit™ en cultivos primarios de ratones BALB/c tras 24 horas de exposición a 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de AgNPs.

# Contenido

	<b>Página</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>4</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>5</b>
<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>12</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>17</b>
<b>2. Justificación</b>	<b>19</b>
<b>3. Antecedentes</b>	<b>20</b>
<b>4. Marco Teórico</b>	<b>22</b>
Cultivo celular	22
Cultivos primarios	23
Ventajas	24
Aplicaciones	24
Citotoxicidad	25
Determinación de citotoxicidad	25
Viabilidad celular	26
Conteos celulares en la determinación de viabilidad celular	26
Prueba de exclusión de azul tripano	27
Citometría de flujo	28
<b>5. Hipótesis</b>	<b>30</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>31</b>
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
<b>7. Metodología</b>	<b>32</b>
Formulaciones de nanopartículas de plata	32
Ratones BALB/c	32
Disección de ratones BALB/c	32

Cultivos primarios de ratón BALB/c	33
Ensayo de viabilidad celular	33
Análisis estadístico	34
<b>8. Resultados</b>	<b>35</b>
Prueba de exclusión de azul tripano	35
Viabilidad celular por citometría de flujo	36
Análisis estadístico	37
<b>9. Discusión</b>	<b>51</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>66</b>
<b>Anexo</b>	<b>67</b>
<b>Referencias</b>	<b>94</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>Prueba de exclusión vital de azul tripano</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>Componentes de un citómetro de flujo</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Imágenes del cambio de coloración de células y aumento de restos celulares de cultivos primarios de hígado de ratón BALB/c en cámara de Neubauer</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Distribución de eventos contabilizados por citometría de flujo de una población de cultivos primarios de hígado de ratones BALB/c</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de BALB/c con AgNP1</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de hígado de ratones BALB/c con las formulaciones de AgNPs</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de riñón de ratones BALB/c con las formulaciones de AgNPs</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c con las formulaciones de AgNPs</b>	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de médula de ratones BALB/c con las formulaciones de AgNPs</b>	<b>43</b>
<b>10</b>	<b>Viabilidad celular de linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c con las formulaciones de AgNPs</b>	<b>45</b>
<b>11</b>	<b>Viabilidad celular de monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c con las formulaciones de AgNPs</b>	<b>46</b>
<b>12</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro de partícula metálico en la viabilidad celular de cultivos primarios de hígado de ratones BALB/c</b>	<b>48</b>
<b>13</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro hidrodinámico en la viabilidad celular de cultivos primarios de hígado de ratones BALB/c</b>	<b>49</b>

<b>14</b>	<b>Efecto de la modificación del potencial Z en la viabilidad celular de cultivos primarios de hígado de ratones BALB/c</b>	<b>50</b>
-----------	---	-----------

## Lista de Tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>Viabilidad celular de células de cultivos primarios tras 24 horas de exposición a AgNPs</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Viabilidad celular de células hepáticas tras 24 horas de exposición a AgNPs</b>	<b>55</b>
<b>3</b>	<b>Viabilidad celular de células del sistema inmunológico tras 24 horas de exposición a AgNPs</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de Argovit en disolución acuosa</b>	<b>64</b>

## Anexo

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>A1</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de BALB/c con AgNP2</b>	<b>68</b>
<b>A2</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de BALB/c con AgNP3</b>	<b>69</b>
<b>A3</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de BALB/c con AgNP4</b>	<b>70</b>
<b>A4</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de BALB/c con AgNP5</b>	<b>71</b>
<b>A5</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de aorta de ratones BALB/c con las formulaciones de AgNPs</b>	<b>72</b>
<b>A6</b>	<b>Viabilidad celular de cultivos primarios de corazón de ratones BALB/c con las formulaciones de AgNPs</b>	<b>73</b>
<b>A7</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro de partícula metálico en la viabilidad celular de cultivos primarios de riñón de ratones BALB/c</b>	<b>74</b>
<b>A8</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro de partícula metálico en la viabilidad celular de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>75</b>
<b>A9</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro de partícula metálico en la viabilidad celular de cultivos primarios de médula de ratones BALB/c</b>	<b>76</b>
<b>A10</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro de partícula metálico en la viabilidad celular de cultivos primarios de aorta de ratones BALB/c</b>	<b>77</b>
<b>A11</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro de partícula metálico en la viabilidad celular de cultivos primarios de corazón de ratones BALB/c</b>	<b>78</b>

<b>A12</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro de partícula metálico en la viabilidad celular de linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>79</b>
<b>A13</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro de partícula metálico en la viabilidad celular de monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>80</b>
<b>A14</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro hidrodinámico en la viabilidad celular de cultivos primarios de riñón de ratones BALB/c</b>	<b>81</b>
<b>A15</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro hidrodinámico en la viabilidad celular de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>82</b>
<b>A16</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro hidrodinámico en la viabilidad celular de cultivos primarios de médula de ratones BALB/c</b>	<b>83</b>
<b>A17</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro hidrodinámico en la viabilidad celular de cultivos primarios de aorta de ratones BALB/c</b>	<b>84</b>
<b>A18</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro hidrodinámico en la viabilidad celular de cultivos primarios de corazón de ratones BALB/c</b>	<b>85</b>
<b>A19</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro hidrodinámico en la viabilidad celular de linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>86</b>
<b>A20</b>	<b>Efecto de la modificación del diámetro hidrodinámico en la viabilidad celular de monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>87</b>
<b>A21</b>	<b>Efecto de la modificación del potencial Z en la viabilidad celular de cultivos primarios de riñón de ratones BALB/c</b>	<b>88</b>
<b>A22</b>	<b>Efecto de la modificación del potencial Z en la viabilidad celular de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>89</b>

<b>A23</b>	<b>Efecto de la modificación del potencial Z en la viabilidad celular de cultivos primarios de médula de ratones BALB/c</b>	<b>90</b>
<b>A24</b>	<b>Efecto de la modificación del potencial Z en la viabilidad celular de cultivos primarios de aorta de ratones BALB/c</b>	<b>91</b>
<b>A25</b>	<b>Efecto de la modificación del potencial Z en la viabilidad celular de cultivos primarios de corazón de ratones BALB/c</b>	<b>92</b>
<b>A26</b>	<b>Efecto de la modificación del potencial Z en la viabilidad celular de linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>93</b>
<b>A27</b>	<b>Efecto de la modificación del potencial Z en la viabilidad celular de monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c</b>	<b>94</b>



# 1. Introducción

Los seres humanos han experimentado exposiciones a partículas nanométricas a lo largo de la historia, pero es solo con la llegada de la revolución industrial que tales exposiciones han aumentado drásticamente debido a fuentes antropogénicas (Oberdörster et al., 2005). En ese sentido, es probable que el campo de la nanotecnología, que se encuentra en rápido desarrollo, se convierta en una fuente más de exposición humana a partículas nanométricas (Loret et al., 2018; Moghimi et al., 2005). En los últimos años, el interés por los efectos potenciales de la exposición a nanomateriales ha aumentado considerablemente porque los estudios reportados han demostrado que éstos pueden producir efectos adversos para la salud (Moghimi et al., 2005; Sayes et al., 2007).

Si bien los nanomateriales son atractivos tanto por razones científicas como tecnológicas, el creciente contacto humano con estos materiales así como sus propiedades distintivas exigen el desarrollo y la validación de protocolos precisos de caracterización que permitan clasificarlos en función de su toxicidad y peligrosidad (Jones & Grainger, 2009; Sayes et al., 2007). Estos métodos deben predecir y evaluar de manera confiable los posibles escenarios de efectos, desde los beneficios hasta los posibles riesgos, además de los peligros para la salud asociados con la exposición a los nanomateriales a medida que se vuelven más utilizados en la industria y la medicina (Jones & Grainger, 2009; X. F. Zhang et al., 2016).

La revolución actual en el uso de los nanomateriales ha conducido a un aumento en el número de evaluaciones toxicológicas reportadas. Sin embargo, estos estudios deben ir acompañados de un esfuerzo de investigación para desarrollar nuevas herramientas, métodos, protocolos y estándares de biocompatibilidad para las diferentes clases de nanomateriales (Dobrovolskaia et al., 2009; Jones & Grainger, 2009).

Actualmente, no existe consenso sobre los riesgos intrínsecos, tolerancia, peligros, toxicidad o relaciones dosis-respuesta para la mayoría de los nanomateriales. Una búsqueda en la literatura actual puede proporcionar fácilmente opiniones diametralmente opuestas sobre toxicidad del mismo nanomaterial en modelos de ensayo *in vitro* (Loret et al., 2018).

A pesar de los intensos esfuerzos de investigación, los informes de las respuestas celulares a los nanomateriales suelen ser inconsistentes e incluso contradictorios. Se ha informado de una variación considerable en el comportamiento celular con los cambios en el tamaño, la forma y las propiedades de la superficie de los nanomateriales sintetizados. Sin embargo, la relación entre la respuesta inducida en los diferentes tipos celulares y las propiedades de los nanomateriales aún no se encuentra completamente descrita (Kumar et al., 2015; Shubayev et al., 2009; Sohaebuddin et al., 2010). En el contexto de la aplicación biomédica, las propiedades fisicoquímicas juegan un papel muy importante en la inducción de respuestas a escala biológica (Sohaebuddin et al., 2010)s.

En la actualidad, no se ha desarrollado un protocolo de prueba completo para comparar la toxicidad de diferentes nanomateriales de forma estandarizada (Mao et al., 2016; Xia et al., 2006). Un ensayo *in vitro* adecuado para las pruebas de toxicidad reglamentarias debe incluir criterios de valoración biológicamente relevantes, pero fáciles de medir. Esto aumentará el valor predictivo de los datos *in vitro* obtenidos, así como la correlación con los resultados obtenidos en modelos *in vivo* (X. Chen & Schluesener, 2008; Hirsch, C.; Roesslein, M.; Krug, H.; Wick, 2011; Riaz Ahmed et al., 2017; Wiemann et al., 2016).

## 2. Justificación

Para algunos estudios, los modelos de cultivo de células primarias dan resultados más pertinentes en comparación con las líneas celulares inmortalizadas. Las células de cultivos primarios de órganos sanos conservan muchas, si no todas, las funciones celulares nativas *in vitro* (Kim et al., 2014). Estas células se derivan de tejido sano bien identificado, no se modifican o alteran genéticamente de ninguna manera más allá de la exposición natural a las agresiones ambientales que se encuentran normalmente durante la vida útil del organismo del que se aislaron. Generalmente, conservan la morfología, función celular, características de crecimiento, marcadores celulares, señalización e integridad genética normales cuando se mantienen o se propagan en cultivo (ZenBio, 2017).

El uso de un tipo celular bien caracterizado y diferenciado puede brindar confianza y seguridad en los datos generados *in vitro*. Estas herramientas proporcionan biorelevancia y datos experimentales más realistas que aquellos obtenidos de líneas celulares transformadas e inmortalizadas (Kim et al., 2014).

La vida útil finita de las células de cultivos primarios es esencialmente un mecanismo de control incorporado que protege contra los peligros de las alteraciones genéticas, las transformaciones o una variedad de presiones selectivas encontradas en las líneas celulares inmortalizadas que se utilizan durante períodos prolongados de tiempo (ZenBio, 2017).

### 3. Antecedentes

El uso de cultivos primarios aislados de mamíferos para la evaluación de efectos toxicológicos de nanomateriales ha sido poco reportado en la literatura. Su uso como modelo de evaluación toxicológica de AgNPs ha sido principalmente en la determinación de neurotoxicidad con cultivos primarios de cerebro de ratas o ratones. Algunos trabajos que muestran los resultados de viabilidad celular tras la exposición a AgNPs con cultivos primarios como modelo de evaluación toxicológica se presentan en la **Tabla 1**.

Sung-Hwan y colaboradores utilizaron cultivos primarios de neuronas de ratas para determinar el efecto citotóxico de AgNPs comerciales identificaron una disminución de viabilidad celular dependiente de la dosis que fue atribuida a la inducción de apoptosis por un incremento en los niveles intracelulares de ROS, de acuerdo con los resultados de fragmentación de ADN (Kim et al., 2014). Haase y colaboradores también describieron un efecto dosis dependiente de AgNPs de 20 y 40 nm en un co-cultivo de neuronas y astrocitos de cultivos primarios de cerebro de ratón (Haase et al., 2012). Por su parte, Xu y colaboradores encontraron que las AgNPs causan degeneración del citoesqueleto y generan una deficiencia en la maquinaria sináptica de las neuronas, daño mitocondrial y muerte celular en cultivos primarios de rata (Xu et al., 2013).

Por su parte, Habas y colaboradores confirmaron que las AgNPs pueden causar toxicidad reproductiva en mamíferos machos, al evaluar los efectos de diferentes concentraciones de nanopartículas en células de Sertoli aisladas de ratón. Identificó que el daño es causado por incremento en ROS, conduciendo a daño oxidativo en células testiculares y culminando en apoptosis (Habas et al., 2018). Del mismo modo, Hernández-Sierra y colaboradores, evaluaron concentraciones de 1 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de AgNPs de tres diferentes tamaños. Encontrando que las nanopartículas más pequeñas inducen efectos citotóxicos más notorios en cultivos primarios de fibroblastos humanos (Hernández-Sierra, 2011).

Finalmente, Arora y colaboradores utilizaron cultivos primarios de fibroblastos y células hepáticas para evidenciar la citotoxicidad de AgNPs a diferentes

concentraciones. Determinaron que la morfología celular en ambos cultivos primarios se mantiene inalterada hasta los 100 µg/ml. Sin embargo, la viabilidad celular fue mucho menor en fibroblastos que en células hepáticas. Sugieren que la diferencia entre los mecanismos antioxidantes es la causa de las diferencias en viabilidad identificadas, siendo cada uno de estos mecanismos el encargado de proteger a las diferentes células de daños por estrés oxidativo inducido por los tratamientos de AgNPs (Arora et al., 2009).

**Tabla 1.** Viabilidad de células de cultivos primarios tras 24 horas de exposición a AgNPs.

Célula	Formulación	Tamaño (nm)	Concentración (µg/ml)	Viabilidad (%)	Ref.
Cultivos primarios de neuronas de rata Sprague Dawley	AgNPs (Nanopoly Co)	10	0.4	~ 71	(Kim et al., 2014)
			2	~ 68	
			10	~ 46	
Cultivos primarios de fibroblastos humanos	AgNPs	10	1	~ 100	(Hernández-Sierra, 2011)
			5	~ 98	
			10	~ 95	
			25	~ 66	
			50	~ 23	
			100	~ 7	
		15-20	1	~ 102	
			5	~ 100	
			10	~ 86	
			25	~ 72	
			50	~ 40	
			100	~ 28	
		80-100	1	~ 102	
			5	~ 96	
			10	~ 96	
			25	~ 95	
			50	~ 94	
			100	~ 94	
Cultivos primarios de células Sertoli de ratón	AgNPs (Sigma Aldrich)	---	5	~ 94	(Habas et al., 2018)
			10	~ 92	
			15	~ 57	
Cultivos primarios de fibroblastos de ratón Swiss albino	AgNPs	7-20	10	~ 81	(Arora et al., 2009)
			25	~ 68	
			50	~ 52	
			61	50	
			100	~ 37	
Cultivos primarios de hígado de ratón Swiss albino	AgNPs	7-20	100	~ 81	
			200	~ 71	
			300	~ 63	
			449	50	
			500	~ 48	

## 4. Marco Teórico

### *Cultivo celular*

El cultivo celular se refiere a métodos de laboratorio que permiten el crecimiento de células eucariotas o procariotas en condiciones fisiológicas (Invitrogen, 2018; Lonza, 2020a). Su origen se remonta a principios del siglo XX cuando se introdujo para estudiar el crecimiento y la maduración de los tejidos, la biología del virus y el desarrollo de vacunas, el papel de los genes en la enfermedad y la salud, y el uso de líneas celulares híbridas a gran escala para generar productos biofarmacéuticos. Las aplicaciones experimentales de las células cultivadas son tan diversas como los tipos de células que pueden cultivarse *in vitro* (Segeritz & Vallier, 2017; SigmaAldrich, 2020b). Sin embargo, en un contexto clínico, el cultivo celular está comúnmente relacionado con la creación de sistemas modelo que estudian la biología celular básica, replican los mecanismos de la enfermedad o investigan la toxicidad de nuevos compuestos farmacológicos. Una de las ventajas de utilizar el cultivo celular para estas aplicaciones es la posibilidad de manipular genes y rutas moleculares (Lonza, 2020a; SigmaAldrich, 2020b; ThermoFisher, 2020).

El cultivo celular es una herramienta invaluable que proporciona a los científicos, sistemas modelo para estudiar la fisiología y bioquímica de células sanas y enfermas. Menos costosos y más fáciles de trabajar que los organismos completos, la reproducibilidad de los cultivos celulares se pone en evidencia ya que se utilizan ampliamente tanto en la investigación, como en la fabricación a gran escala de compuestos biológicos (SigmaAldrich, 2020b; ThermoFisher, 2020).

El cultivo celular es una de las principales herramientas utilizadas en biología celular y molecular, que proporciona excelentes sistemas modelo para estudiar la fisiología y bioquímica normales de las células (por ejemplo, estudios metabólicos, envejecimiento), los efectos de fármacos y compuestos tóxicos en las células, mutagénesis y carcinogénesis. También se utiliza en la detección y el desarrollo de fármacos y en la fabricación a gran escala de compuestos biológicos (por ejemplo,

vacunas y proteínas terapéuticas). La principal ventaja de usar cultivo celular para cualquiera de estas aplicaciones es la homogeneidad y reproducibilidad de los resultados que se pueden obtener al usar un lote de células clonales (Invitrogen, 2018; ThermoFisher, 2020).

### *Cultivos primarios*

El cultivo primario se refiere a la etapa del cultivo después de que las células se aíslan del tejido y proliferan o se mantienen en las condiciones apropiadas hasta que ocupan todo el sustrato disponible. En esta etapa, las células que son capaces de proliferar deben ser sub cultivadas (es decir, pasadas) transfiriéndolas a un nuevo recipiente con medio de crecimiento fresco para proporcionar más espacio para el crecimiento. Una vez aislados, se colocan en un ambiente artificial en recipientes de plástico o vidrio, apoyados con un medio especializado que contiene nutrientes esenciales y factores de crecimiento (Lonza, 2020b; SigmaAldrich, 2020b).

Las células de cultivo primario representan más fielmente el tejido de origen. Se toman directamente del tejido y se procesan para establecerlas en condiciones de cultivo óptimas. Debido a que se derivan de tejido y no se modifican, son más similares al estado *in vivo* y exhiben una fisiología normal. Por esta razón, son excelentes sistemas modelo para estudiar la fisiología y bioquímica de las células (por ejemplo, estudios metabólicos, envejecimiento, estudios de señalización, entre otros) y los efectos de fármacos y compuestos tóxicos (Lonza, 2020b; ZenBio, 2017).

Se debe tener en cuenta que las células de cultivos primarios tienen una vida útil limitada y aquellas que proliferan, dejarán de dividirse (o envejecer) después de cierto número de divisiones celulares y pueden ser más difíciles de cultivar y mantener que una línea celular continua.

## *Ventajas*

El uso de células de cultivo primario proporciona resultados más pertinentes que las líneas celulares en ciertos casos. Una vez preseleccionadas son buenos modelos para representar la señalización *in vivo* muy de cerca. Además, son rentables ya que ayudan a reducir el gasto en modelos animales necesarios para los estudios *in vivo* (Invitrogen, 2018; ZenBio, 2017).

## *Aplicaciones*

Los cultivos primarios se utilizan en estudios metabólicos, de envejecimiento y señalización para estudiar la fisiología normal y bioquímica; para determinar los efectos de, fármacos, compuestos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. También se utiliza en el cribado de fármacos, así como para el desarrollo de compuestos biológicos tales como: vacunas y proteínas terapéuticas a gran escala (SigmaAldrich, 2020b).

- Cultivo de células en 3D: dado que las células primarias no se transforman ni se immortalizan, simulan de cerca un modelo vivo, producen resultados más fisiológicamente significativos y se pueden utilizar para modelar tejidos. Estas células pueden actuar como un sistema modelo para estudiar la biología y bioquímica celular, la interacción entre la célula y los agentes causantes de enfermedades como bacterias y virus, el efecto de las drogas, entre otros (SigmaAldrich, 2020b).
- Pruebas de detección y toxicidad de fármacos: los cultivos primarios se utilizan para estudiar la citotoxicidad de nuevos fármacos (para estudiar el efecto y la dosis segura) o acarreadores de fármacos (nanopartículas). Son útiles para la síntesis o producción de una variedad de biomoléculas a escala industrial. Esto es particularmente útil en la industria farmacéutica (SigmaAldrich, 2020b).

## *Citotoxicidad*

El efecto tóxico causado por agentes externos a las células se denomina citotoxicidad. La exposición de las células a un compuesto citotóxico puede producir varios resultados en la célula (Salih Istifli et al., 2019). Una sustancia se considera citotóxica si interfiere con la unión de las células, altera significativamente la morfología, afecta negativamente la tasa de crecimiento celular o hace que las células mueran (McGaw et al., 2014).

Se ha prestado mucha atención a los estudios de citotoxicidad como primer paso para evaluar la toxicidad de las sustancias de prueba. Esto es especialmente válido en relación con el cribado de la actividad biológica de extractos de plantas y compuestos activos aislados de plantas. Los ensayos de citotoxicidad se realizan ampliamente porque los compuestos de prueba, incluidos los extractos derivados de plantas y los compuestos purificados, pueden estar destinados a ser utilizados como productos farmacéuticos o cosméticos, en cuyo caso es importante una toxicidad mínima o nula (McGaw et al., 2014). En particular, los ensayos para medir la reducción de la viabilidad celular (inhibición del crecimiento/división o muerte por vías apoptóticas-necróticas) se denominan pruebas de citotoxicidad (Aslantürk, 2018).

## *Determinación de citotoxicidad*

Los ensayos de citotoxicidad se utilizan ampliamente en la investigación y en el descubrimiento de fármacos para seleccionar bibliotecas en busca de compuestos tóxicos. Un compuesto que genera una respuesta citotóxica puede eliminarse de las rondas de selección posteriores; pero si el compuesto está dirigido a células que se dividen rápidamente puede constituir un "éxito" en una pantalla de terapias contra el cáncer (Aslantürk, 2018).

Los estudios de citotoxicidad son un paso inicial útil para determinar la toxicidad potencial de una sustancia de prueba. Una toxicidad mínima o nula en modelos sanos es esencial para el desarrollo exitoso de una preparación

farmacéutica o cosmética y, en este sentido, los estudios de toxicidad celular juegan un papel crucial (McGaw et al., 2014).

### *Viabilidad celular*

Los ensayos de viabilidad celular con células cultivadas se utilizan ampliamente para las pruebas de citotoxicidad de productos químicos y fármacos. En particular, la viabilidad y la tasa de proliferación de las células son buenos indicadores de citotoxicidad, y pueden determinar tanto efectos adversos inducidos por diferentes agentes físicos y químicos, como potenciales efectos benéficos de terapias oncológicas que pretenden inhibir el crecimiento de células tumorales (Aslantürk, 2018).

### *Conteos celulares en la determinación de viabilidad celular*

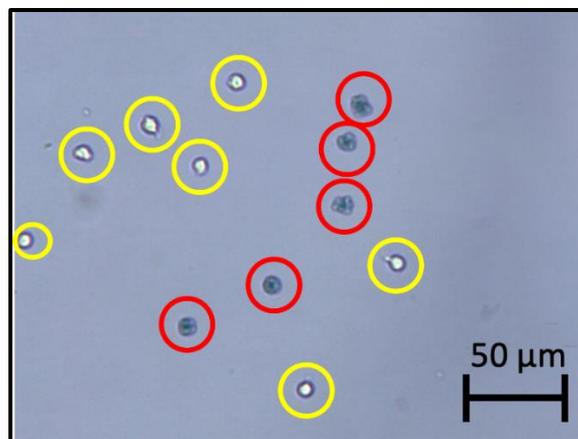
La proporción de células viables en una población celular se puede estimar mediante varios métodos. El método más simple y ampliamente utilizado es el método de exclusión de colorante, donde las células viables excluyen a los colorantes y las células muertas los incorporan. Aunque el procedimiento de tinción es bastante simple, el procedimiento experimental de un gran número de muestras es difícil y requiere mucho tiempo. La determinación de la integridad de la membrana es posible utilizando esta técnica, para la que se han empleado una gran variedad de colorantes que incluyen, eosina, rojo Congo, eritrosina B y azul tripano. De estos, el azul tripano se ha utilizado con mayor frecuencia (Aslantürk, 2018).

El recuento de células se utiliza como una medida generalizada en el cultivo de tejidos, para evaluar y normalizar la densidad celular de cultivos, como una lectura en los ensayos de proliferación, viabilidad y toxicidad (BioTek, 2020).

### *Prueba de exclusión vital de azul tripano*

El azul tripano es una molécula grande con carga negativa. Este ensayo de exclusión de colorante se usa para determinar el número de células viables o muertas en una suspensión celular. El ensayo de exclusión del colorante azul tripano se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen este colorante, mientras que las células muertas no (**Figura 1**). En este ensayo, las células adherentes o no adherentes se incuban con diferentes concentraciones de los compuestos de prueba durante varios tiempos. Después del tratamiento, la suspensión celular se mezcla con el colorante y luego se examina visualmente para determinar si las células incorporan o excluyen el tinte. Las células viables tendrán un citoplasma claro, mientras que las células muertas tendrán un citoplasma azul (Strober, 2015). El número de células viables o muertas por unidad de volumen se determina mediante microscopía óptica como porcentaje de células con respecto al control sin tratamiento. Un cultivo celular sano se caracteriza por una viabilidad celular del 80 al 95%. El recuento de células se realiza generalmente con la ayuda de un hematocitómetro utilizando la **Fórmula 1** (Aslantürk, 2018; Fuentes, 2014; SigmaAldrich, 2020a)

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{número de células viables}}{\text{promedio células viables del control negativo}} \times 100\%$$



**Figura 1.** Prueba de exclusión de azul tripano en células Jurkat. Las células viables (amarillo) mantienen sus membranas celulares intactas y no permiten el paso del colorante. Sin embargo, las células no viables (rojo) son teñidas por el ingreso del colorante al citoplasma. Adaptada de (L. Chan, 2020).

En los últimos años, el recuento celular automatizado se ha convertido en una alternativa atractiva al recuento celular manual con hematocitómetros, que ofrece resultados fiables en una fracción del tiempo necesario para el recuento manual, una de las técnicas automáticas más utilizadas es la citometría de flujo.

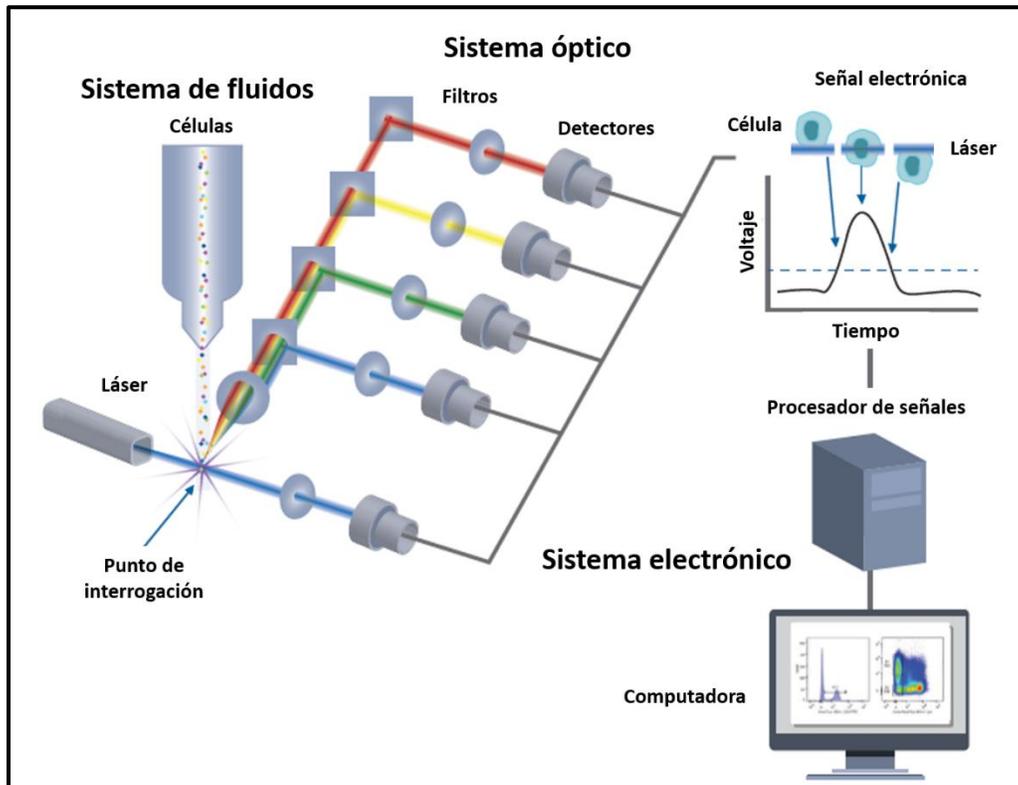
### *Citometría de flujo*

La citometría de flujo es una tecnología potente y de alto rendimiento que se utiliza para caracterizar suspensiones de células o partículas individuales [18, 19], analiza rápidamente eventos individuales a medida que pasan por un láser único o múltiple mientras están suspendidas en una solución salina tamponada. Cada evento se analiza para determinar la dispersión de la luz visible y uno o varios parámetros de fluorescencia. La dispersión de luz visible se mide en dos direcciones diferentes, la dirección de avance (dispersión hacia adelante o FSC) que puede indicar el tamaño relativo del evento y a 90° (dispersión lateral o SSC) que indica la complejidad interna o granularidad del evento (McKinnon, 2018).

Todos los citómetros de flujo se componen de tres componentes básicos (**Figura 2**). El sistema de fluidos utiliza presión, vacío o bombas para mover las células del tubo de muestra, a la celda de flujo donde se enfoca la corriente de muestra, para alinear los eventos y analizarlos uno a la vez. En el sistema óptico, los láseres se dirigen al punto de análisis (punto de interrogación) como fuente de excitación para las sondas fluorescentes. La emisión de fluorescencia (fotones) y la dispersión de la luz se dirigen a los detectores mediante fibra óptica o lentes/espejos. El sistema electrónico convierte los fotones emitidos en un pulso de voltaje, una señal electrónica a lo largo del tiempo. Cada evento se procesa y visualiza usando gráficos de una y dos dimensiones (Biotechne, 2019).

La citometría de flujo es una tecnología que mide simultáneamente y luego analiza múltiples características físicas de partículas individuales, generalmente células, mientras fluyen en una corriente de fluido a través de un haz de luz. Las propiedades medidas incluyen el tamaño relativo, la granularidad relativa o la complejidad interna

y la intensidad de fluorescencia relativa. Estas características se determinan mediante un sistema de acoplamiento óptico-electrónico que registra cómo la célula o partícula dispersa la luz láser incidente y emite fluorescencia (BectonDickinson, 2002; BIO-RAD, 2017).



**Figura 2.** Componentes de un citómetro de flujo. El sistema de fluidos del instrumento permite la adquisición de muestras y dirige las células al punto de interrogación. Un complejo sistema óptico basado en láseres, que incluye espejos, filtros y detectores, que genera y dirige la fluorescencia. Las señales fluorescentes generadas por este proceso se convierten a formato digital para su procesamiento y almacenamiento en el sistema electrónico. Adaptada de (Biotechne, 2019).

Los datos de citometría de flujo se almacenan de acuerdo con un formato estándar, el formato estándar de citometría de flujo (FCS), desarrollado por la *Society for Analytical Cytology*. De acuerdo con el estándar FCS, un archivo de almacenamiento de datos incluye una descripción de la muestra adquirida, el instrumento en que los datos se recopilaron, el conjunto de datos y los resultados del análisis de datos (BectonDickinson, 2002)

## 5. Hipótesis

La viabilidad de cultivos primarios de aorta, bazo, corazón, hígado, médula ósea y riñón de ratones BALB/c es sensible a la exposición a diferentes formulaciones de nanopartículas de plata Argovit™.

## 6. Objetivos

### ***Objetivo general:***

Determinar el efecto citotóxico de nanopartículas de plata en cultivos primarios de ratones BALB/c comparando entre dos métodos de determinación de viabilidad ampliamente reportados en la literatura.

### ***Objetivos específicos:***

- Determinar la viabilidad celular de los cultivos primarios mediante la prueba de exclusión de azul tripano tras 24 horas de exposición a 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las cinco formulaciones de nanopartículas de plata Argovit™.
- Evaluar la viabilidad celular de los cultivos primarios del panel mediante citometría de flujo tras 24 horas de exposición a 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las cinco formulaciones de nanopartículas de plata Argovit™.
- Evaluar el efecto de las diferentes formulaciones de nanopartículas de plata Argovit™ en linfocitos y monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c.
- Realizar el análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre concentraciones y formulaciones.

## 7. Metodología

### ***Formulaciones de nanopartículas de plata***

Las nanopartículas de plata fueron donadas por la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la UNAM y producidas en el Centro de Investigación y Desarrollo Vector-Vita Ltd ubicado en Novosibirsk, Rusia, por el Dr. Vasily Burmistrov.

El productor reporta que las formulaciones de nanopartículas de plata (Argovit) contienen 12 mg/ml de plata metálica estabilizada con 188 mg/ml de polivinilpirrolidona (PVP) por 1 litro de agua, siendo la única diferencia entre ellas la longitud de la PVP. Se evaluaron cuatro concentraciones de cada formulación de nanopartículas, correspondientes a 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag.

### ***Ratones BALB/c***

Se utilizaron ratones BALB/c, machos, de 4 a 6 semanas de edad, mantenidos en condiciones de bioterio con agua y comida *ad libitum* en el bioterio de la Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Valle de las Palmas. En todo momento se siguió la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y uso de animales de laboratorio. El protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Bioética de la misma institución con número de expediente 001/2019.

### ***Disección de ratones BALB/c***

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical en un ambiente estéril. Posteriormente, se diseccionaron y perfundieron el hígado, riñón, bazo, aorta, corazón, riñones, y médula ósea, y fueron colocados en cajas Petri con solución salina fisiológica estéril (SSF).

### ***Cultivos primarios de ratón BALB/c***

Se establecieron cultivos primarios de aorta, bazo, corazón, hígado, médula ósea y riñón. Para ello se disgregó mecánicamente el tejido obtenido, se lavó con solución salina fisiológica estéril y se sembró en cajas Petri con medio RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés) y 0.1% (v/v) de antibiótico/antimicótico. Los cultivos se incubaron 2 horas a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 90%.

### ***Ensayo de viabilidad celular***

Para la evaluación de la citotoxicidad de las formulaciones de Argovit, se sembraron entre 50,000 y 100,000 células en placas de 96 pozos y se añadieron 10µl de suspensión de AgNPs Argovit™ para alcanzar las concentraciones finales de 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml, en un volumen final de 200 µl. Esto se realizó por cada uno de los cultivos primarios aislados y se realizaron tres ensayos independientes por triplicado. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 90%. Se utilizó un control negativo de medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS y un control negativo con SSF.

Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la viabilidad celular de los cultivos por la prueba de exclusión vital con azul tripano, a través del conteo de células en cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico recto *AmScope B120c*. Además, se contaron las células por citometría de flujo utilizando un *Attune NxT Flow Cytometer* utilizando como referencia el tamaño y granularidad de los controles negativos.

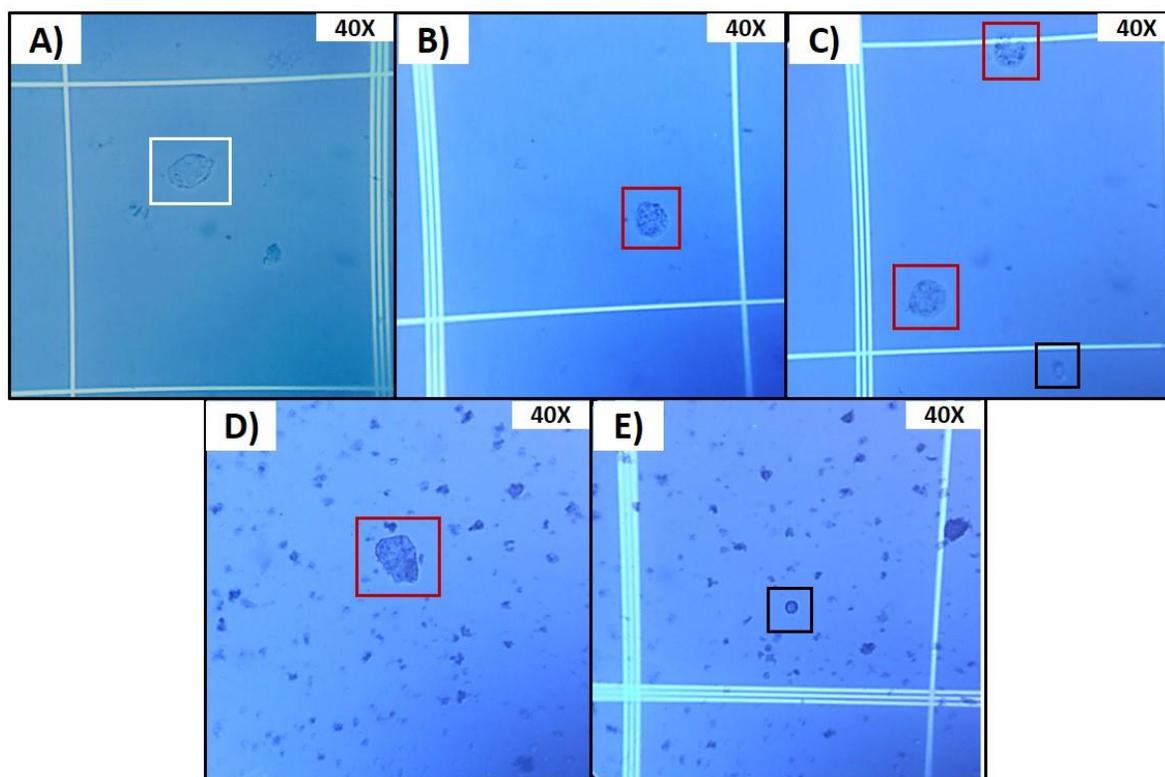
### ***Análisis estadístico***

Se realizó una prueba D'Agostino-Pearson para determinar la distribución normal de los datos. Posteriormente, se calcularon los promedios y desviaciones estándar de los resultados obtenidos de la viabilidad celular de los cultivos primarios. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y pruebas *post-hoc* de Tukey para determinar diferencias significativas entre concentraciones y formulaciones de las diferentes AgNPs en los diferentes cultivos primarios utilizados. Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Para realizar los análisis se utilizó el programa *GraphPad Prism* (v.6.01).

## 8. Resultados

### *Prueba de exclusión vital de azul tripano*

El efecto citotóxico de diferentes concentraciones de las formulaciones de AgNPs se evaluó mediante la prueba de exclusión vital de azul tripano tras 24 horas de exposición de cultivos primarios de aorta, bazo, corazón, hígado, médula ósea y riñón. Los conteos en cámara de Neubauer revelaron un mayor número de células muertas (teñidas con azul tripano) a las concentraciones más altas (1,000 y 10,000 ng/ml de Ag) en cultivos primarios de hígado, riñón y bazo, no así en los cultivos primarios de aorta, médula y corazón.

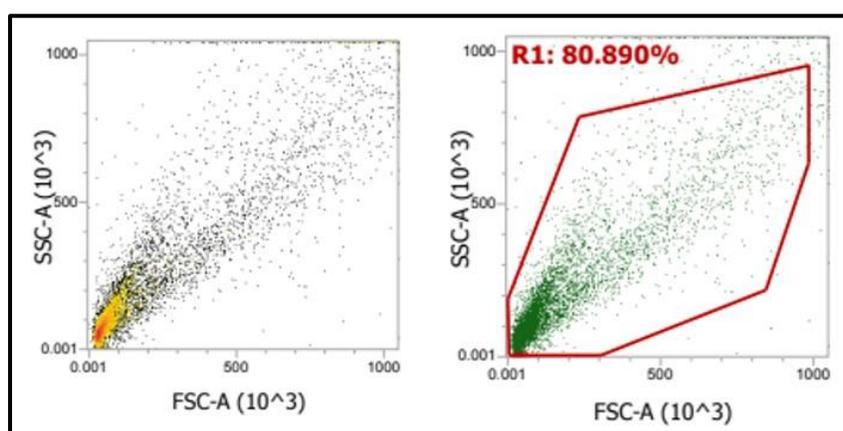


**Figura 3.** Imágenes del cambio de coloración de células y aumento de restos celulares de cultivos primarios de hígado de ratón BALB/c en cámara de Neubauer. Tratamiento representativo. **A)** Hepatocito (blanco) de pozo sin tratamiento (control). **B)** y **C)** Pozos tratados con 1,000 ng/ml de Ag. Célula epitelial (negro) sin cambio y hepatocitos (rojo) con cambio de coloración respecto al control. **D)** y **E)** Pozos tratados con 10,000 ng/ml de Ag (incremento de restos celulares). Célula epitelial (negro) y hepatocito (rojo) con cambios de coloración respecto al control. Las imágenes fueron obtenidas a 40x en un microscopio *AmScope B120c*.

Además, los cultivos primarios de hígado, riñón y bazo presentaron un incremento en la cantidad de restos celulares en los cultivos con 10,000 ng/ml de Ag de las diferentes formulaciones de AgNPs. Algunas células de estos cultivos que fueron expuestas a concentraciones de 1,000 y 10,000 ng/ml de Ag cambiaron de coloración a un tono coincidente con el de los tratamientos de las diferentes formulaciones de AgNPs (**Figura 1**).

#### *Viabilidad celular por citometría de flujo*

El efecto en la viabilidad celular de cultivos primarios de aorta, bazo, corazón, hígado, médula ósea y riñón se determinó por citometría de flujo tras 24 horas de exposición a cuatro concentraciones diferentes de las formulaciones de AgNPs. Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos para cada uno de los cultivos fueron normalizados con respecto al control negativo de medio RPMI-1640. En la **Figura 2** se presenta un ejemplo representativo de gráfico obtenido del análisis de cultivos con el citómetro de flujo. Describe la contabilización de eventos en función de los parámetros de tamaño y granularidad celular para determinar la viabilidad de las células en los diferentes cultivos primarios de ratones BALB/c.

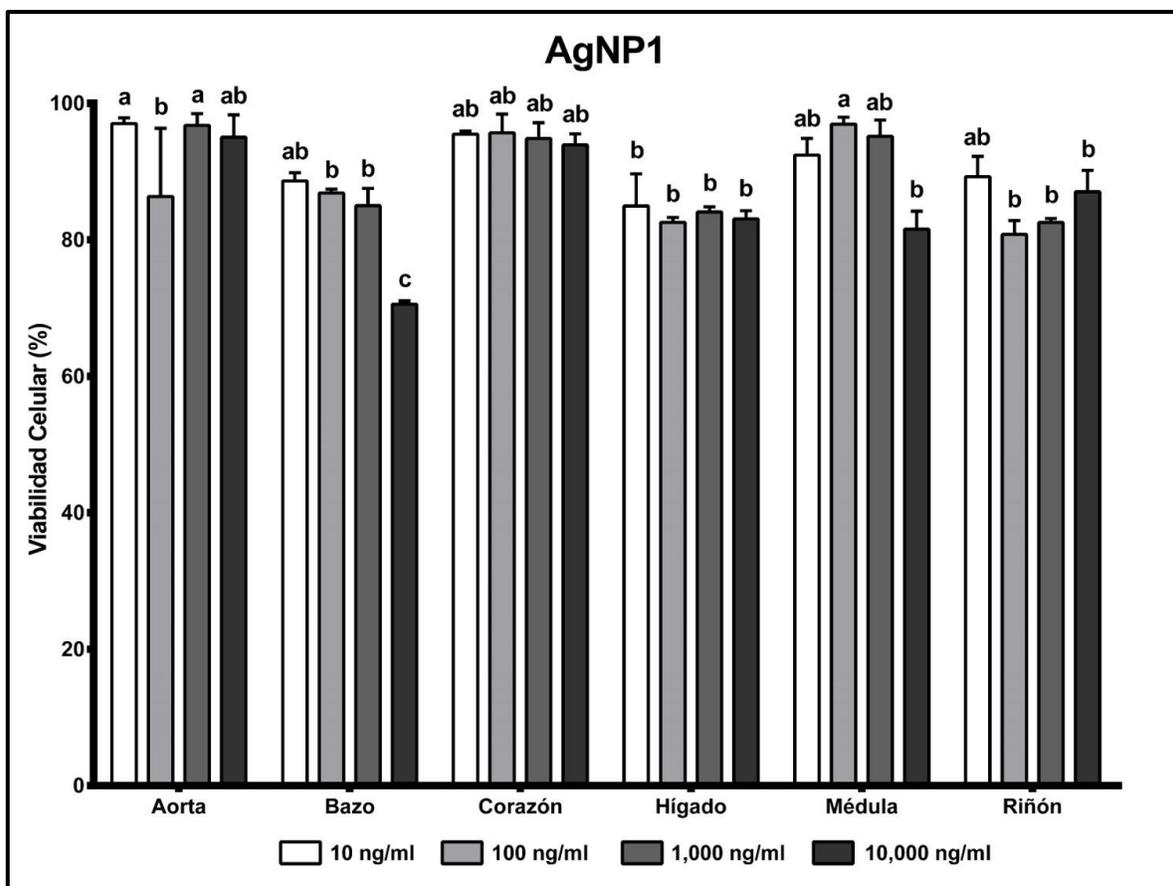


**Figura 4.** Distribución de eventos contabilizados por citometría de flujo de una población de cultivos primarios de hígado de ratón BALB/c. A la izquierda se muestra el gráfico de densidad obtenido del análisis de población celular por la compensación de tamaño (FSC) contra granularidad (SSC). A la derecha se resalta en color rojo la región que abarca la población celular identificada, de la cuál se estimará la viabilidad celular.

### *Análisis estadístico*

Se graficaron los porcentajes de viabilidad celular obtenidos del panel completo de cultivos primarios tratados con cada una de las formulaciones de AgNPs en comparación con el control sin tratamiento. El análisis de varianza muestra que, el efecto inducido por la exposición a una misma formulación de Argovit depende del cultivo primario en el que se está evaluando. Sin embargo, la prueba *post-hoc* de Tukey indica que, en ocasiones el efecto en la viabilidad celular de los cultivos primarios no depende de la concentración de las formulaciones Argovit a la que fueron expuestos.

En este trabajo no se identificaron diferencias significativas al comparar la viabilidad celular determinada por el ensayo de exclusión vital de azul tripano y la calculada utilizando el citómetro de flujo. Ambas técnicas mostraron que las cinco formulaciones evaluadas disminuyeron los valores de viabilidad celular en cultivos primarios de hígado, riñón y bazo, por lo que registran los menores porcentajes (74-85%, 82-89%, 67-88%, respectivamente) en comparación con los cultivos primarios de aorta, médula y corazón (90-98%, 84-96%, 90-96%, respectivamente). La prueba *post-hoc* de Tukey muestra que, las concentraciones más altas de AgNPs (1,000 y 10,000 ng/ml de Ag) disminuyeron de forma significativa la viabilidad celular con respecto al control sin tratamiento en los cultivos que registran los efectos citotóxicos (hígado, riñón, bazo).



**Figura 5.** Viabilidad celular de cultivos primarios de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de la AgNP1. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

El tratamiento de los cultivos primarios con AgNP1 (**Figura 3**) evidenció efectos citotóxicos (viabilidad celular < 85%) en cultivos primarios de bazo, hígado, médula y riñón. Sin embargo, el análisis de varianza indicó que no en todos los valores la disminución registrada es dependiente de la dosis. De acuerdo con la prueba *post-hoc* de Tukey, sólo los cultivos primarios de bazo y médula tratados con 10,000 ng/ml de Ag presentaron diferencias significativas. Por lo tanto, únicamente estos cultivos mostraron un efecto dosis dependiente.

Por su parte, los cultivos primarios de bazo, riñón e hígado registraron los menores valores de viabilidad celular (69-88%, 82-88%, 80-82%, respectivamente) después del tratamiento con AgNP2 (**Figura A1, página 62**). Se encontró que

únicamente los cultivos primarios de bazo mostraron un efecto dependiente de la concentración, presentando diferencias significativas a 10,000 ng/ml de Ag.

Los cultivos en los que AgNP3 mostró una disminución más marcada fueron los cultivos primarios de bazo, hígado, médula y riñón (70-87%, 78-85%, 91-95%, 85-88%, respectivamente) (**Figura A2, página 63**). De acuerdo con la prueba *post-hoc* de Tukey, sólo los cultivos primarios de bazo y médula tratados con 10,000 ng/ml de Ag presentaron diferencias significativas, siendo los únicos cultivos del panel con efectos dependientes de la concentración.

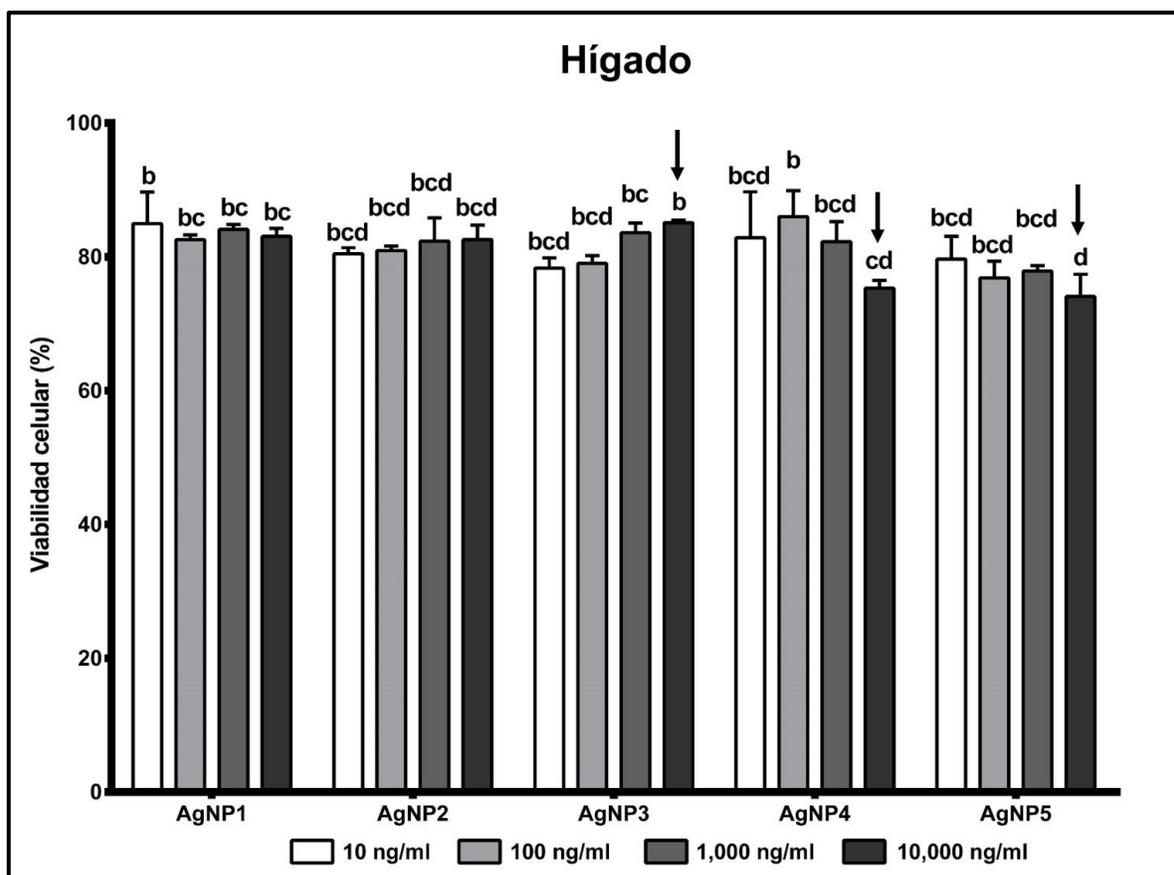
El tratamiento de los cultivos primarios con AgNP4 mostró efectos citotóxicos en cultivos primarios de bazo, hígado y riñón (viabilidad celular < 85%) (**Figura A3**). Sin embargo, únicamente los cultivos primarios de bazo e hígado evidenciaron un efecto dependiente de la dosis, al registrar diferencias significativas con 10,000 ng/ml de Ag.

Los cultivos primarios de bazo, hígado, médula y riñón registraron los menores valores de viabilidad celular (67-88%, 74-79%, 84-95%, 87-88%, respectivamente) después del tratamiento con AgNP5 (**Figura A4, página 64**). Se encontró que únicamente los cultivos primarios de bazo mostraron un efecto dependiente de la concentración, presentando diferencias significativas a 10,000 ng/ml de Ag.

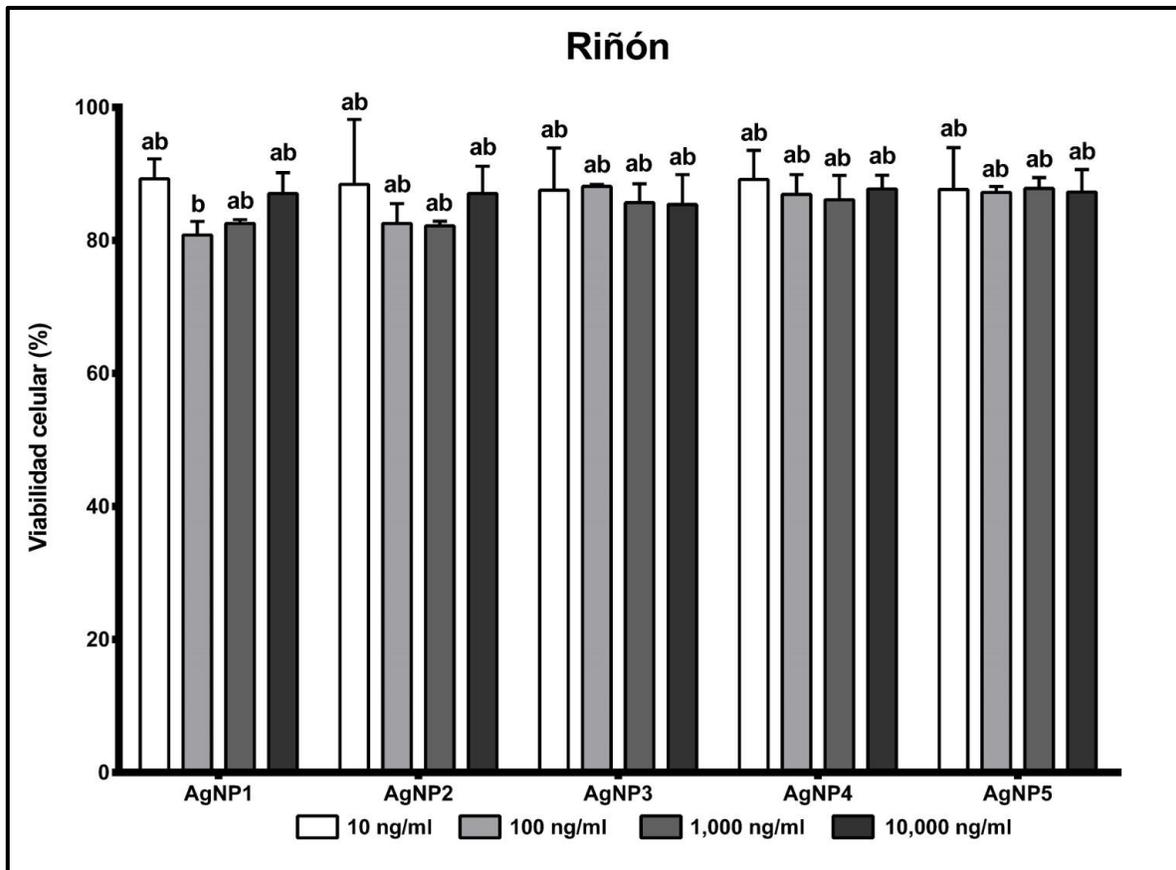
Como se encontró una respuesta citotóxica dependiente de la sensibilidad de los diferentes cultivos primarios a los tratamientos de AgNPs, se determinó el efecto de las diferentes formulaciones de Argovit a 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag, graficando los porcentajes de viabilidad celular obtenidos del tratamiento tras 24 horas de exposición en cada uno de los cultivos primarios en comparación con el control sin tratamiento. Para el análisis de resultados se compararon los resultados en viabilidad celular entre valores de concentraciones iguales de las cinco formulaciones de Argovit™. El análisis de varianza muestra que, el efecto inducido por algunas concentraciones es dependiente de la formulación con la que se esté tratando cada uno de los cultivos primarios. La prueba *post-hoc* de Tukey indica que

en ocasiones este efecto en la viabilidad celular es específico para ciertas formulaciones en concentraciones puntuales entre los cultivos.

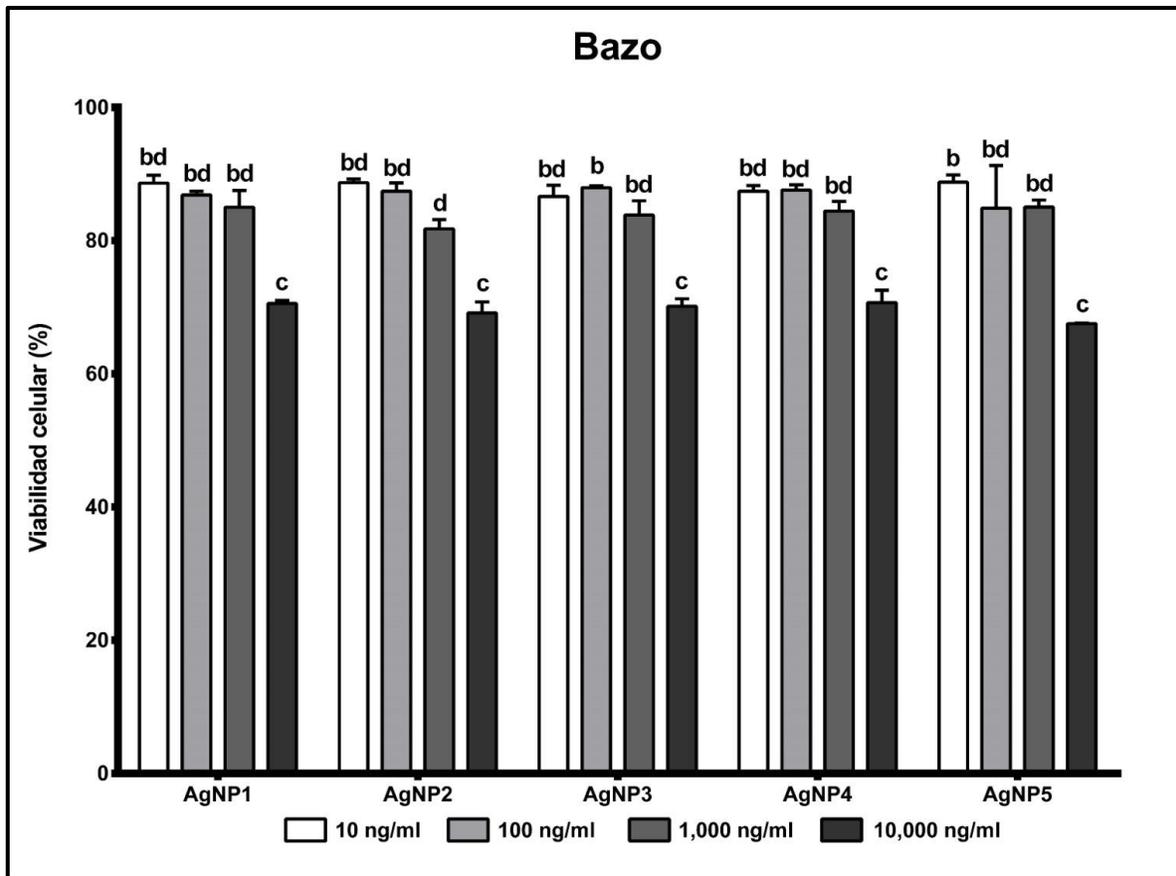
Los cultivos primarios de aorta y corazón no presentaron disminuciones significativas a tratamientos con ninguna de las formulaciones de AgNPs (viabilidad celular > 90%) (**Figuras A5 y A6, páginas 66 y 67, respectivamente**). Sin embargo, la prueba *post-hoc* de Tukey identificó diferencias estadísticamente significativas entre AgNP1 en 100 ng/ml de Ag en comparación con el resto de las de concentraciones en la totalidad de formulaciones en los cultivos primarios de aorta.



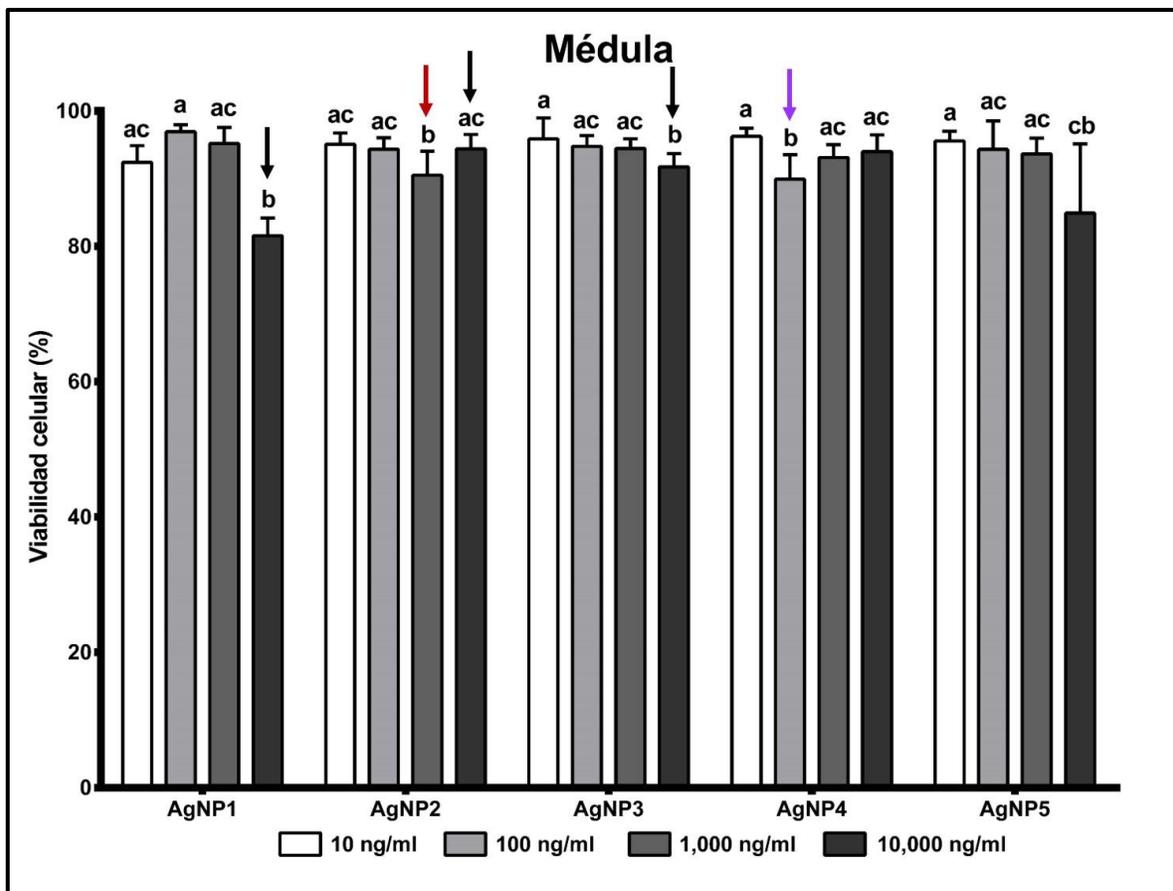
**Figura 6.** Viabilidad celular de cultivos primarios de hígado de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



**Figura 7.** Viabilidad celular de cultivos primarios de riñón de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



**Figura 8.** Viabilidad celular de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



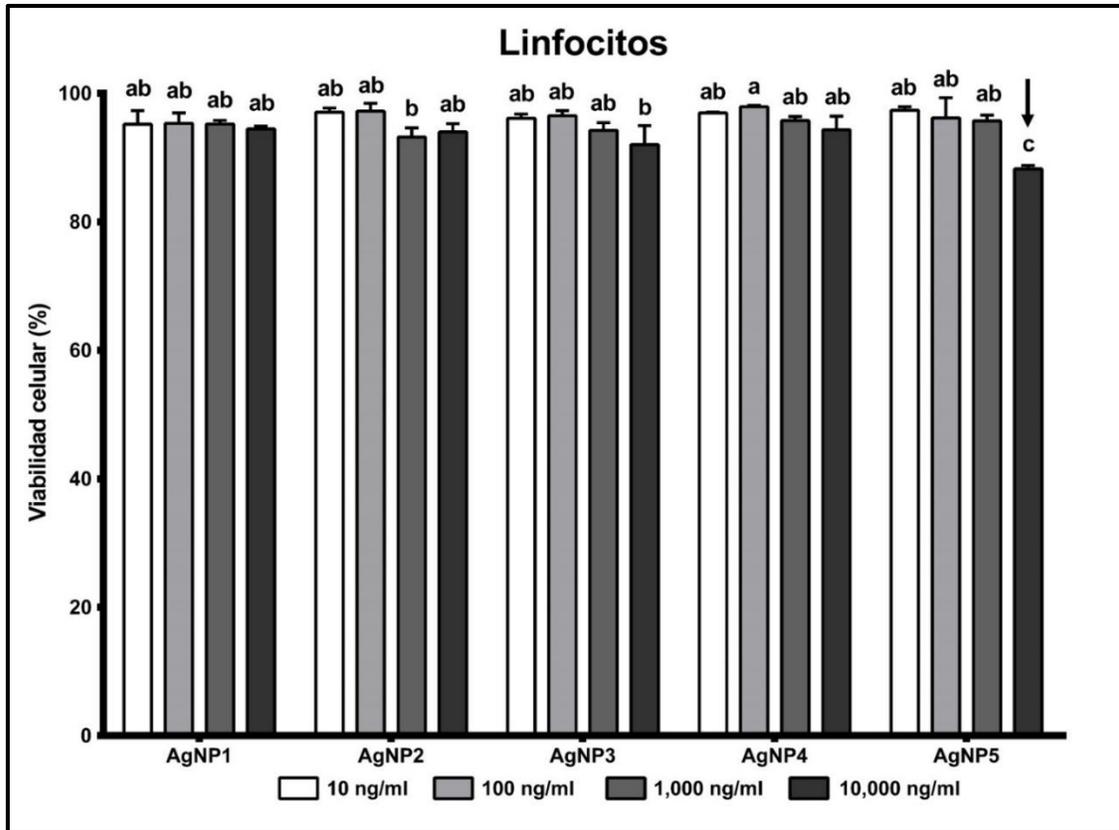
**Figura 9.** Viabilidad celular de cultivos primarios de médula de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Los cultivos primarios de hígado (**Figura 4**) registraron los valores más bajos de viabilidad celular para las cinco formulaciones de Argovit (74-85%). El análisis de varianza indicó que no todas las formulaciones de AgNPs causan el mismo efecto a concentraciones iguales, mostrando que los cultivos primarios de hígado permiten diferenciar entre los efectos causados entre las diferentes formulaciones. De acuerdo con la prueba *post-hoc* de Tukey, se presentaron diferencias significativas en 10,000 ng/ml de Ag entre AgNP1 con AgNP5 y entre AgNP 3 con AgNP4 y AgNP5.

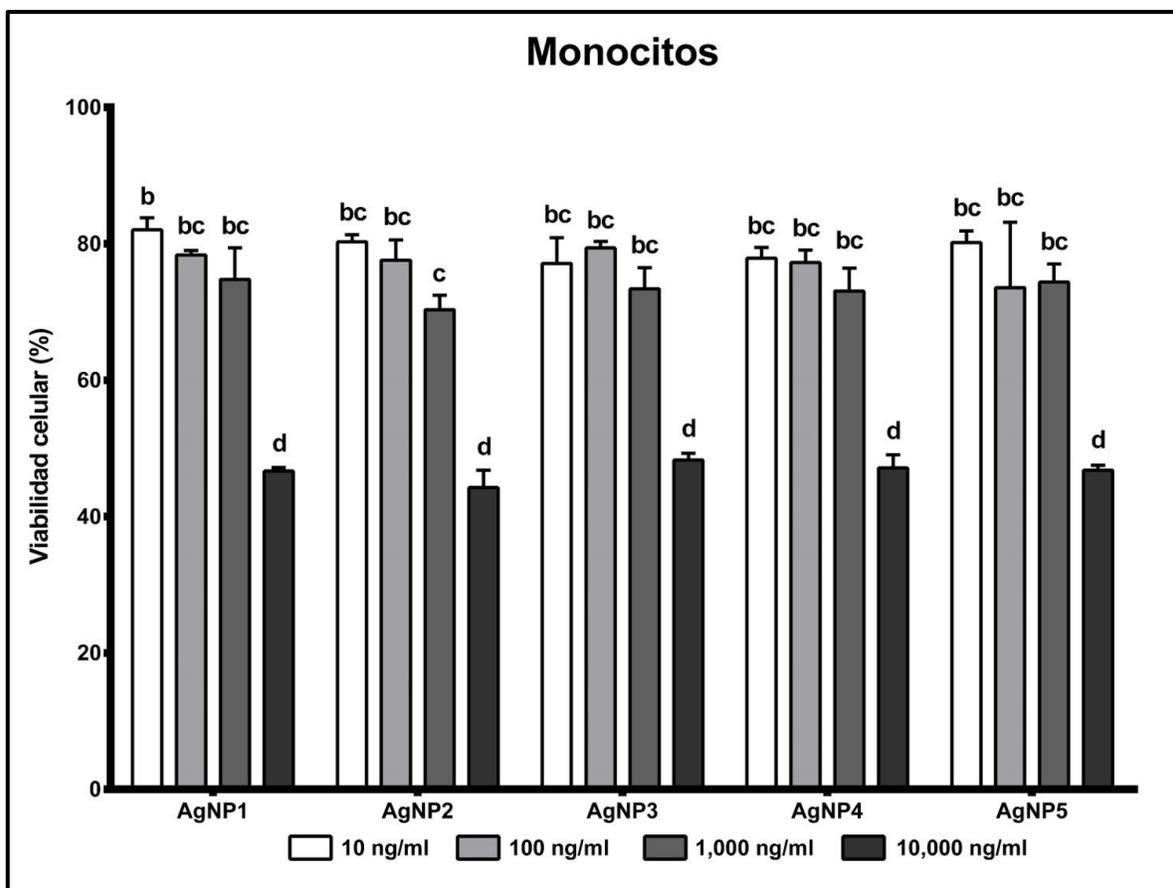
El tratamiento con las cinco formulaciones de AgNPs también redujo la viabilidad celular de los cultivos primarios de riñón (80-89%) (**Figura 5**). Sin embargo, el análisis de varianza evidenció que el efecto no es dependiente de la formulación de Argovit a la que se expone el cultivo. Del mismo modo, aunque la viabilidad celular de los cultivos primarios de bazo (**Figura 6**) presentó una disminución para la totalidad de las formulaciones, el análisis de varianza no identificó diferencias significativas entre las AgNPs evaluadas.

De acuerdo con el análisis de varianza, los cultivos primarios de médula (**Figura 7**) fueron los más sensibles a los efectos en viabilidad celular inducidos por las diferencias entre formulaciones de Argovit a las mismas concentraciones (81-96%). La prueba *post-hoc* de Tukey indicó diferencias estadísticamente significativas en 100 ng/ml entre AgNP4 con el resto de las formulaciones, en 1000 ng/ml de Ag entre AgNP2 con el resto de las formulaciones, y entre AgNP1 con AgNP2 y AgNP3 en 10,000 ng/ml de Ag.

Se evaluó el efecto en la viabilidad celular de linfocitos y monocitos de cultivos primarios de bazo, para distinguir los efectos inducidos entre ambas poblaciones celulares de forma independiente. Se graficaron los valores de viabilidad celular obtenidos tras 24 horas de tratamiento con las cinco formulaciones de Argovit™ en comparación con el control sin tratamiento. Para la interpretación de los resultados, se compararon los resultados en viabilidad celular entre calores de concentraciones iguales de las cinco formulaciones de Argovit™.



**Figura 10.** Viabilidad celular de linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



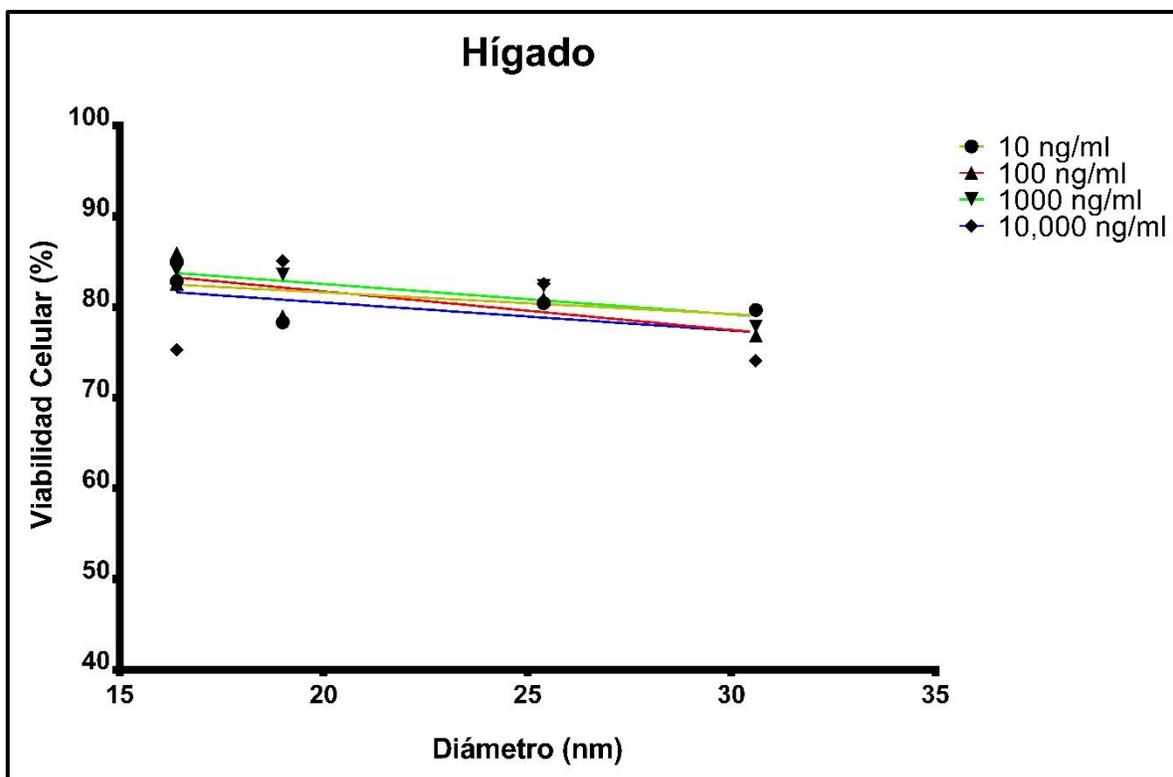
**Figura 11.** Viabilidad celular de monocitos de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Los linfocitos de cultivos primarios de bazo (**Figura 8**) no registraron una reducción en la viabilidad celular (93-97%) tras 24 horas de exposición a las formulaciones de AgNPs. El análisis de varianza indicó que este efecto es independiente de la formulación evaluada, con excepción de AgNP5, que presenta diferencias significativas en 10,000 ng/ml de Ag con el resto de las formulaciones, de acuerdo con la prueba *post-hoc* de Tukey.

Por el contrario, las cinco formulaciones de Argovit™ disminuyeron de forma significativa los valores de viabilidad celular de monocitos de cultivos primarios de bazo (44-82%) (**Figura 9**). El análisis de varianza indicó que este efecto es dependiente de la concentración. La prueba *post-hoc* de Tukey mostró que, para la

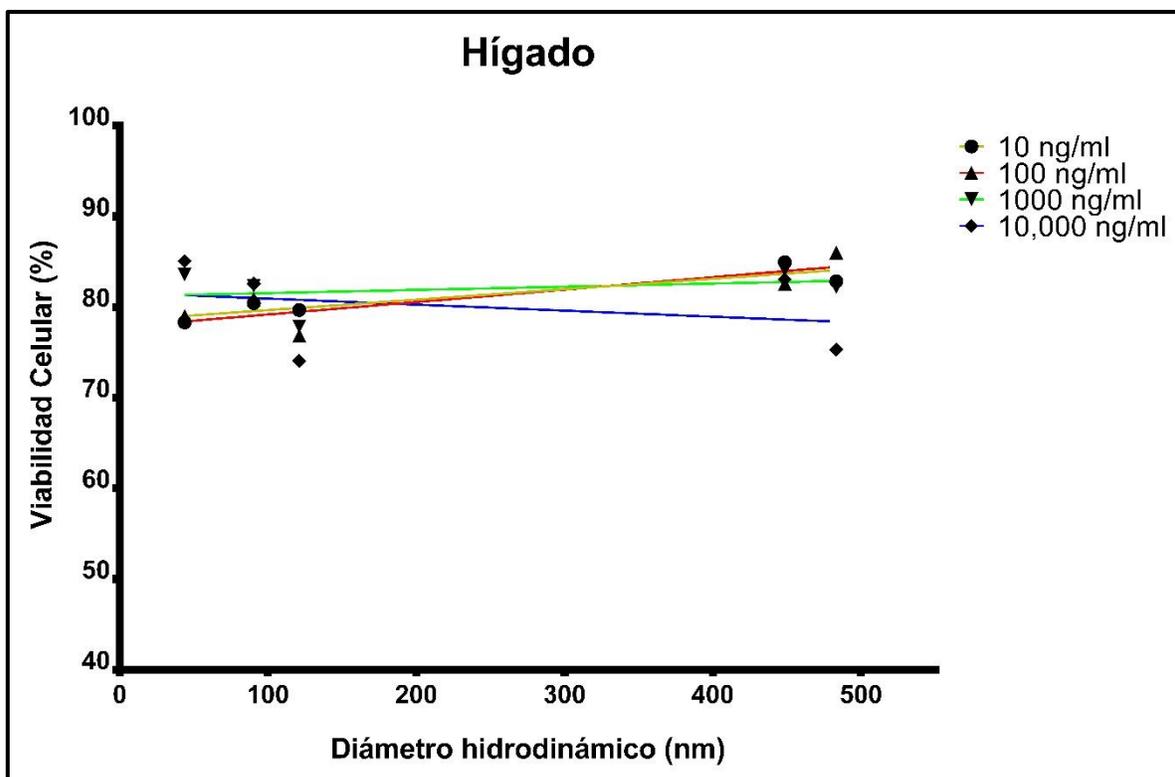
totalidad de las formulaciones, la concentración de 10,000 ng/ml de Ag presenta diferencias significativas respecto a las otras dosis evaluadas. Sin embargo, el análisis de varianza indicó que la reducción de la viabilidad celular en monocitos no depende de la formulación evaluada.

Finalmente, se compararon los efectos en la viabilidad celular producidos por la variación de las diferentes propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de Argovit™ en los cultivos primarios de ratones BALB/c. Para el análisis se graficaron los porcentajes de viabilidad celular obtenidos del tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag contra los valores del diámetro promedio de las partículas metálicas, el diámetro hidrodinámico y potencial Z. Sobre la distribución de puntos se trazaron las líneas de tendencia para observar el comportamiento de las pendientes. En la **Figura 10** se presentan los resultados obtenidos de la variación en la viabilidad celular generada por el cambio en el diámetro promedio de las partículas metálicas de las formulaciones de Argovit™ en cultivos primarios de hígado. Se puede observar que la variación entre las diferentes formulaciones no presenta una pendiente en las líneas de tendencia que permita describir un efecto en viabilidad celular que sea dependiente del diámetro de las partículas metálicas en las formulaciones evaluadas de AgNPs. Se identificó que para la totalidad de los cultivos primarios, los valores de viabilidad celular encontrada no son dependientes de las modificaciones en el diámetro de las partículas metálicas de Argovit™ (**Figuras A7-A13, páginas 68-74**).



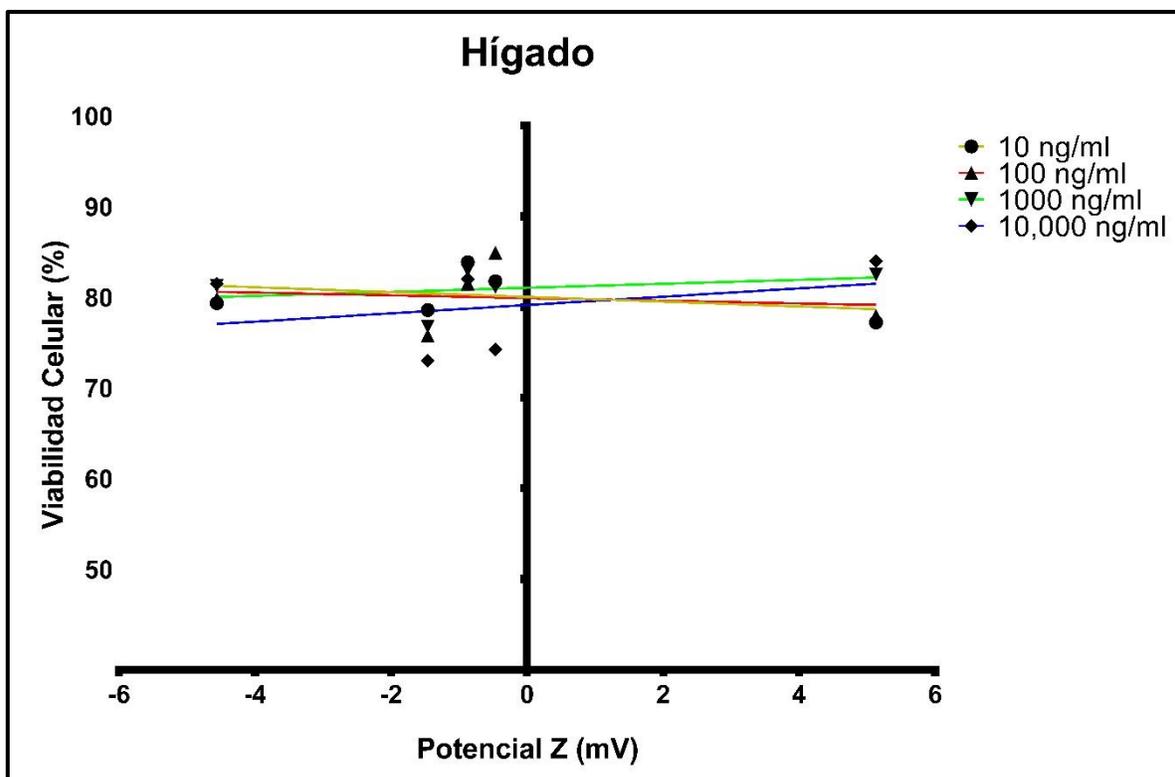
**Figura 12.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro promedio de las partículas metálicas en cultivos primarios de hígado de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.

En la **Figura 11** se presentan los resultados de la variación en la viabilidad celular que es producida por el cambio en el diámetro hidrodinámico de las formulaciones evaluadas de nanopartículas en cultivos primarios de hígado. La tendencia identificada muestra que las modificaciones en el diámetro hidrodinámico no conducen a una variación en la viabilidad celular, por lo que el efecto citotóxico identificado es independiente a esta propiedad. Las **Figuras A14 a A20** muestran que los valores de viabilidad celular de todos los cultivos primarios evaluados no presentan variaciones con la variación del diámetro hidrodinámico de las formulaciones de Argovit™.



**Figura 13.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro hidrodinámico en cultivos primarios de hígado de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.

Finalmente, en la Figura 12 se muestra el efecto de la variación del potencial Z en la viabilidad celular de cultivos primarios de hígado tratados con Argovit™ en las diferentes concentraciones. Las líneas de tendencia no indican una dependencia entre esta propiedad y los efectos citotóxicos identificados. Resultados similares se identificaron para el resto de los cultivos primarios tratados con las formulaciones de AgNPs (Figuras A21-A27), indicando que el efecto citotóxico identificado fue independiente de la variación del potencial Z.



**Figura 14.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del potencial Z en cultivos primarios de hígado de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.

Por lo tanto, se identificó que las modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de AgNPs de Argovit no inducen un efecto que sea reflejado en las tendencias de viabilidad celular identificadas en los diferentes cultivos primarios de ratones BALB/c utilizados como modelo de evaluación. Es decir, que los efectos citotóxicos identificados en este trabajo son independientes de las variaciones entre las propiedades de las nanopartículas de plata.

## 9. Discusión

Las evaluaciones de citotoxicidad de AgNPs han sido ampliamente reportadas utilizando líneas celulares para determinar su efecto en células sanas. Sin embargo, existen pocos reportes del efecto de AgNPs en cultivos primarios de ratones BALB/c. En el presente trabajo se estudió el efecto citotóxico de cinco formulaciones de *Argovit* en cultivos primarios de ratones BALB/c como una primera aproximación a la evaluación toxicológica de dichas formulaciones. En primera instancia, se determinó la viabilidad celular por microscopía óptica a través del ensayo de exclusión vital por tinción con azul tripano. Posteriormente, se realizó el conteo celular por citometría de flujo y se hizo el análisis estadístico correspondiente para determinar la viabilidad celular de los cultivos primarios tras 24 horas de exposición a las AgNPs.

Aunque determinar la citotoxicidad a través del conteo manual mediante la prueba de exclusión vital con azul tripano se ha reportado como imprecisa en algunas evaluaciones (L. L. Y. Chan et al., 2020), en este trabajo no encontramos diferencias significativas al comparar la viabilidad celular determinada por este ensayo y la calculada por citometría de flujo. Más aun, los conteos realizados a través de microscopía óptica proporcionaron información relevante de las condiciones experimentales en los cultivos, permitiendo identificar una mayor cantidad de restos celulares en los tratamientos de 1,000 y 10,000 ng/ml de Ag en cultivos primarios de riñón, bazo e hígado (**Figura 1**).

Del mismo modo, la observación en el microscopio de los cultivos primarios de ratones BALB/c permitió registrar una ligera tinción en el interior de las células similar al color de las disoluciones de nanopartículas al tratar las células con las concentraciones de 1,000 y 10,000 ng/ml de Ag (**Figura 1**). Cruz-Ramírez reportó este efecto en células de cáncer de colon humano (HCT-15) al tratar con las mismas concentraciones de AgNPs, sugiriendo que la internalización del nanomaterial en las células tratadas es la responsable de que éstas adopten la coloración del coloide

(Cruz-Ramírez, 2020). Ambos resultados resaltan la importancia de verificar los efectos inducidos por nanopartículas de plata utilizando el microscopio óptico, por lo que sugerimos su uso al determinar los efectos citotóxicos en cultivos celulares.

Se ha reportado que las nanopartículas de plata pueden inducir citotoxicidad en una gran cantidad de células de mamíferos (Park et al., 2011). Dichos efectos son dependientes del origen y tipo celular en el que se realizan las evaluaciones (Lankoff et al., 2012; H. Zhang et al., 2015). Debido a que las AgNPs se encuentran entre los nanomateriales más utilizados en productos comercializados, pueden ingresar al organismo intencionalmente o por exposición no consentida (Moradi-Sardareh et al., 2018). Por esta razón, determinar la toxicidad para los efectos citotóxicos en las células de los principales tejidos que de algún modo se verían expuestos si las AgNPs ingresaran al organismo debe ser considerado prioritario.

Los resultados indican que la respuesta citotóxica de células aisladas de origen tisular diferente es distinta, demostrando que el modelo de cultivos primarios de ratones BALB/c es consistente con lo que dicta la literatura. Al comparar los resultados de viabilidad celular se identificó que todas las formulaciones de *Argovit*<sup>™</sup> inducen un efecto citotóxico (viabilidad < 85%) en cultivos primarios de hígado (**Figura 4**), riñón (**Figura 5**) y bazo (**Figura 6**). Por otro lado, en cultivos primarios de aorta (**Figura A5**), corazón (**Figura A6**) y médula (**Figura 6**) no se registraron valores inferiores a 85% en viabilidad celular, es decir, no se encontró que alguna de las formulaciones indujera citotoxicidad. Estos efectos diferenciados sugieren que existe sensibilidad por parte de algunos tipos celulares a los tratamientos con las formulaciones de *Argovit*<sup>™</sup>.

Zhang et al. mostraron que existe una susceptibilidad a los efectos de AgNPs al comparar entre células de epitelio y macrófagos de líneas celulares de ratón, rata y humano. En dicho trabajo se sugiere que la variabilidad se debe a la respuesta específica del sistema antioxidante de cada tipo celular, lo que conduce a resultados de citotoxicidad distintos (H. Zhang et al., 2015). Del mismo modo, Lankoff y colaboradores (Lankoff et al., 2012) describieron una respuesta citotóxica y metabólica diferenciada entre células hepáticas humanas (HepG2), células

pulmonares humanas (A549) y células linfoides del sistema inmunológico (THP1), atribuida a la protección antioxidante, a la capacidad metabólica y la función fisiológica especializada de cada tipo de célula en particular. Zhang y colaboradores (H. Zhang et al., 2015) también describen el papel de las defensas antioxidantes como factor de la heterogeneidad de las respuestas toxicológicas identificadas entre tipos celulares distintos.

El sistema cardiovascular es responsable de la distribución y circulación en el organismo. Sin importar la vía de administración, la distribución de las nanopartículas que lleguen al torrente sanguíneo se llevará a cabo a través de este sistema, por lo que resulta relevante estudiar los efectos toxicológicos que puede llegar a tener por su exposición (Cao et al., 2018). En el presente trabajo no se identificaron efectos citotóxicos en cultivos primarios de aorta (**Figura A5**) o corazón (**Figura A6**) de ratones BALB/c tratados con las diferentes formulaciones de AgNPs. Esto coincide con lo identificado previamente por Wang (M. Wang et al., 2018), quien tampoco identificó efectos citotóxicos tras evaluar concentraciones de 8, 16, 32 y 64  $\mu\text{g/ml}$  de AgNPs en células de músculo liso aórtico humano.

Por su parte, Rosas-Hernández y colaboradores (Rosas-Hernández et al., 2009) reportan un efecto antiproliferativo y vasoconstrictor en células coronarias endoteliales y anillos aórticos de rata tratadas con 0.1 y 1  $\mu\text{g/ml}$  de AgNPs de 45 nm. Sin embargo, al aumentar la concentración a 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de Ag identificó una proliferación mediada por óxido nítrico y vasodilatación, por lo que sugiere que el efecto en células cardiovasculares es dependiente del tamaño de las nanopartículas. El que se hayan identificado respuestas celulares distintas resalta la importancia de considerar células de origen cardiovascular para evaluaciones de citotoxicidad inducida por AgNPs.

Los riñones desempeñan un papel clave en la filtración de la sangre para la eliminación de desechos en el organismo. Por lo tanto, evaluar el efecto de la interacción de las nanopartículas con las células renales responsables de estos procesos, permite comprender si es posible inducir algún tipo de daño en el proceso de excreción (Du et al., 2018). Con las evaluaciones realizadas se identificó una

disminución de viabilidad celular (~15-20%) en cultivos primarios de riñón de ratones BALB/c tratados con las formulaciones Argovit™ (**Figura 5**), reflejando que es uno de los cultivos más sensibles al efecto de nanopartículas de plata. Sharma y colaboradores (L. Sharma et al., 2014) ya habían descrito este efecto inducido por nanopartículas metálicas en células renales y atribuyó la sensibilidad identificada en células de este origen tisular a su función de eliminación de desechos. Estos resultados son consistentes con lo descrito por Milić y colaboradores (Milić et al., 2015), quienes reporta una disminución de viabilidad celular dependiente de la concentración de AgNPs tras 24 horas de exposición en células renales de puerco (Pk15). Por otra parte, la susceptibilidad en células renales de humano (HEK293T) a efectos inducidos por AgNPs fue confirmada por Chen en 2018 (Y. Chen et al., 2018), quien mostró una disminución en la viabilidad celular en concentraciones superiores a 8 µg/ml, pero inducción de autofagia en células que fueron tratadas con dosis inferiores de nanopartículas.

Un tejido que cumple funciones como una de las principales rutas de excreción y filtración de sustancias en el organismo es el hígado (Michelle Longmire, Peter L. Choyke, M.D., and Hisataka Kobayashi, M.D., 2008). El hígado recibe todo el suministro de nutrientes a través de la circulación, siendo responsable de filtrar y procesar una gran cantidad de sustancias incluyendo a aquellos agentes químicos que puedan resultar tóxicos para el organismo (Michalopoulos, 2007). El estudio de la respuesta citotóxica en células hepáticas proporciona información relevante en la caracterización toxicológica de nanopartículas porque es un órgano clave en el metabolismo y regulación del cuerpo (Rui, 2014). Se evaluó la respuesta citotóxica de las formulaciones de Argovit™ en cultivos primarios de hígado de ratones BALB/c (**Figura 4**). Se identificaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones de 10 a 1,000 ng/ml con 10,000 ng/ml de Ag para todas las formulaciones de AgNPs. Esta disminución de viabilidad celular (~15-25%) es posible referirla como sensibilidad a los efectos toxicológicos de AgNPs y puede ser atribuida a la función que desarrollan las células hepáticas en el procesamiento de sustancias en el organismo. En la **Tabla 2** se presentan algunos

resultados reportados en la literatura referentes a la exposición de células hepáticas a AgNPs.

**Tabla 2.** Viabilidad de células hepáticas tras 24 horas de exposición a AgNPs.

Célula	Formulación	Tamaño (nm)	Concentración (µg/ml)	Viabilidad (%)	Ref.
Cultivos primarios de hígado de ratones Swiss albino	AgNPs (Nanocid L2000)	20 - 40	1	~ 99	(Faedmaleki et al., 2016)
			10	~ 82	
			50	~ 67	
			100	~ 54	
			150	~ 39	
			200	~ 28	
			400	~ 9	
Cultivos primarios de hígado de ratones BALB/c	PVP-AgNPs Argovit	16.4±8.0	0.01	84.95	Presente trabajo
			0.1	82.57	
			1	84.09	
			10	83.06	
		25.4±13.2	0.01	80.44	
			0.1	80.93	
			1	82.33	
			10	82.58	
		19.0±9.3	0.01	78.31	
			0.1	79.01	
			1	89.60	
			10	85.09	
		16.4±8.1	0.01	82.85	
			0.1	85.99	
			1	82.24	
			10	75.31	
		30.6±23.2	0.01	79.68	
			0.1	76.85	
			1	77.86	
			10	74.07	
HepG2	AgNPs (Nanocid L2000)	20 - 40	1	~ 96	(Faedmaleki et al., 2014)
			2	~ 75	
			3	~ 30	
			4	~ 21	
			5	~ 20	
			7.5	~ 19	
			10	~ 17	
C3A	AgNPs (NM300)	15	2.5	~ 84	(Hussain et al., 2005)
			5	~ 73	
			10	~ 74	
			25	~ 53	
			50	~ 13	
		100	2.5	~ 91	
			5	~ 71	
			10	~ 60	
			25	~ 43	
			50	~ 9	
HepG2	Cit-AgNPs	16.3 (dH)	1	~ 75	

			10	~ 67	(Vinković Vrček, 2016)
			50	~ 52	
			75	~ 48	
			100	~ 43	
	PVA-AgNPs	6.3 (dH)	10	~ 59	
HepG2	PVP-AgNPs	23.44±4.92	20	~ 93	(Li et al., 2020)
			40	~ 92	
			80	~ 89	
			160	~ 84	
			320	~ 81	
			640	~ 62	
HepG2	AgNPs	20 - 50	12.5	~ 98	(J. Wang et al., 2017)
			25	~ 96	
			50	~ 88	
			100	~ 69	
			200	~ 41	
HepG2	AOTA-AgNPs	29.4±1.4	1	~ 96	(Brkić Ahmed et al., 2017)
			5	~ 74	
			10	~ 66	
			25	~ 55	
			50	~ 47	
			100	~ 18	
	PVP-AgNPs	9.6±1.7 (21%) 29.8±6.4 (79%)	1	~ 98	
			5	~ 97	
			10	~ 77	
			25	~ 70	
			50	~ 51	
			100	~ 29	
	BSA-AgNPs	18.4±2.1	1	~ 97	
			5	~ 53	
			10	~ 30	
			25	~ 23	
			50	~ 14	
			100	~ 9	
	PLL-AgNPs	8.6±1.6	1	~ 95	
			5	~ 89	
			10	~ 75	
25			~ 36		
50			~ 30		
100			~ 9		
CTAB-AgNPs	4.8±0.7 (11%) 27.8±5.4 (73%) 71.2±15.1 (16%)	1	~ 94		
		5	~ 71		
		10	~ 59		
		25	~ 34		
		50	~ 22		
		100	~ 21		

De entre los valores registrados en la tabla, se pueden apreciar diferencias en los valores de viabilidad celular dependiendo del agente de recubrimiento de las nanopartículas. Las nanopartículas recubiertas con PVP registraron una menor

respuesta citotóxica en células de origen hepático en comparación con AgNPs recubiertas con agentes reportados como menos estables. Las formulaciones de *Argovit*<sup>™</sup> presentaron el menor efecto citotóxico de entre las nanopartículas recubiertas con PVP. Es posible que la proporción de PVP con respecto al tamaño del núcleo metálico que presentan estas formulaciones de AgNPs les confiera una mayor estabilidad que se vea reflejada en una disminución en efectos toxicológicos.

Se ha reportado que la estabilidad de las AgNPs juega un papel fundamental al comparar los daños inducidos por el estrés oxidante y desequilibrio redox en células hepáticas (Das et al., 2017; Tejamaya et al., 2012; Vinković Vrček, 2016). En este sentido, nuestros resultados en cultivos primarios de ratones BALB/c concuerdan con el efecto citotóxico identificado por Faedmaleki y colaboradores en 2016 (Faedmaleki et al., 2016), quien describe una respuesta citotóxica en concentraciones superiores a los 10 µg/ml. En el presente trabajo no se determinaron los efectos en la mitocondria, desequilibrio redox o el metabolismo celular, sin embargo nuestros resultados son consistentes con los efectos reportados por Faedmaleki y otros estudios realizados previamente por otros grupos de trabajo. Ejemplo de ello son los resultados encontrados por Hussain y colaboradores (Hussain et al., 2005), quien evaluó el efecto citotóxico de AgNPs de células hepáticas de rata (BRL3A). Identificó que a concentraciones de 5 y 10 mg/ml la función mitocondrial, la integridad de membrana y la actividad metabólica fueron disminuidas de forma significativa. Li y colaboradores en 2019 (Li et al., 2020), describen una reducción significativa de viabilidad celular en células hepáticas humanas (HepG2) al tratar con concentraciones de AgNPs superiores a 20 µg/ml. En dicho trabajo, se sugiere que la toxicidad inducida por AgNPs está relacionada con el daño que se genera en la mitocondria y el colapso del potencial de membrana que es causado por estrés oxidativo. Con esos resultados, Li recomienda determinar los efectos citotóxicos tomando en cuenta los parámetros del funcionamiento mitocondrial, que está directamente relacionado con el metabolismo celular. Por su parte, Vinković y colaboradores (Vinković Vrček, 2016) también identificaron que los efectos citotóxicos de AgNPs recubiertas con citrato están mediados por el daño en la membrana celular y reducción en la función metabólica de células de hígado

humano. El daño mitocondrial observado por Sun y colaboradores (Sun et al., 2013) después de exponer células hepáticas primarias de rata a AgNPs demuestra que los efectos en el metabolismo celular se deben a la interacción del nanomaterial con este organelo.

Conjuntando los resultados anteriormente descritos y de acuerdo con lo indicado por Lee, se ha demostrado que las AgNPs al interactuar con células susceptibles pueden inducir daños en mitocondria, reducir la función metabólica, aumentar la cantidad de ROS y desencadenar un desequilibrio redox que culmina en la muerte celular (Lee et al., 2015). En estudios previos realizados con *Argovit*<sup>TM</sup> se ha llegado a resultados que concuerdan con lo descrito en la literatura. Castro-Gamboa y colaboradores (Castro-Gamboa et al., 2019) evaluaron la respuesta de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6. En dicho trabajo se identificó que la exposición a una concentración de 1.0 µg/ml de AgNPs disminuye significativamente la viabilidad relacionada con la actividad metabólica obtenida del ensayo con calceína, aun cuando la viabilidad celular determinada con tinciones de Anexina V y Ioduro de Propidio era mayor al 95%. Del mismo modo, Cruz-Ramírez (Cruz-Ramírez, 2020) identificó este efecto al determinar la actividad antiproliferativa de formulaciones de *Argovit*<sup>TM</sup> en células de cáncer de colon humano (HCT15). En dicho trabajo, también se sugiere una sobreestimación de viabilidad con tinciones de exclusión de vitalidad que no corresponde con el efecto citotóxico identificado con las tinciones de Anexina V y Ioduro de Propidio.

Ambos estudios muestran que el efecto citotóxico de las AgNPs evaluadas en este trabajo en cultivos primarios de ratones BALB/c puede explicarse como una disminución de actividad metabólica en las células susceptibles que fueron expuestas a las formulaciones. De este modo, la disminución en la viabilidad celular de los cultivos primarios de hígado (**Figura 4**), riñón (**Figura 5**) y bazo (**Figura 6**) puede atribuirse a las condiciones metabólicas particulares que presentan sus células, confiriéndoles dicha sensibilidad a los efectos citotóxicos de AgNPs.

El bazo desempeña numerosas funciones en el organismo. Es el órgano responsable de la respuesta inmunológica a patógenos y agentes anormales que

llegan a través de la sangre en su proceso de filtración (Lewis et al., 2019). También desempeña un papel fundamental en la función hematopoyética y homeostasis de eritrocitos, así como del resto de células sanguíneas (Bronte, V.; Pittet, 2013). Se ha documentado que la exposición a AgNPs puede inducir una respuesta en células del sistema inmunológico (Ali et al., 2016; Luo et al., 2015), por ello resulta relevante determinar los efectos citotóxicos que puedan llegar a desarrollar. Los resultados de viabilidad celular de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c muestran una disminución de entre el 15-20% en células tratadas con las formulaciones de Argovit™. Por tal motivo se determinó el efecto citotóxico en poblaciones celulares específicas identificadas en los cultivos primarios. En los resultados se registró una disminución de viabilidad mayor al 50% en monocitos tratados con 10,000 ng/ml, sin presentar un efecto citotóxico en linfocitos tratados con la misma concentración de las formulaciones de AgNPs. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Greulich y colaboradores en 2011 (Cruz-Ramírez, 2020), quienes describen un efecto citotóxico en monocitos, pero no en linfocitos. En dicho trabajo, Greulich sugiere que los monocitos son células susceptibles a los efectos citotóxicos de las AgNPs, mientras que los linfocitos son resistentes a éstos.

En la **Tabla 3** se presentan algunos resultados reportados en la literatura referentes a la exposición de células del sistema inmunológico a AgNPs. De los datos registrados en la tabla se puede identificar que las células de cultivos aislados fueron más susceptibles a efectos citotóxicos que aquellas células de líneas celulares evaluadas con el mismo intervalo de concentraciones (-). Una vez más se distingue el papel que juega el PVP como agente de recubrimiento en la modulación de toxicidad en AgNPs. *Argovit*™ no es la que presenta valores de viabilidad celular más altos, sin embargo no conduce a efecto inmunológico inflamatorio como el evidenciado en el resto de las formulaciones de AgNPs recubiertas con PVP, sino como un proceso asociado a la respuesta inmunomoduladora como propone Castro-Gamboa y colaboradores (Castro-Gamboa et al., 2019).

**Tabla 3.** Viabilidad de células del sistema inmunológico tras 24 horas de exposición a AgNPs.

Célula	Formulación	Tamaño (nm)	Concentración (µg/ml)	Viabilidad (%)	Ref.
Linfocitos de cultivo primario de bazo de ratones BALB/c	PVP-AgNPs Argovit	16.4±8.0	0.01	95.49	Presente trabajo
			0.1	95.68	
			1	94.84	
			10	93.92	
		25.4±13.2	0.01	95.53	
			0.1	94.17	
			1	92.69	
			10	89.71	
		19.0±9.3	0.01	95.38	
			0.1	92.23	
			1	92.23	
			10	95.57	
		16.4±8.1	0.01	96.46	
			0.1	94.55	
			1	93.77	
			10	90.40	
30.6±23.2	0.01	96.69			
	0.1	95.26			
	1	96.07			
	10	94.56			
Monocitos de cultivo primario de bazo de ratones BALB/c	PVP-AgNPs Argovit	16.4±8.0	0.01	82.05	Presente trabajo
			0.1	78.36	
			1	74.80	
			10	46.67	
		25.4±13.2	0.01	80.28	
			0.1	77.6	
			1	70.33	
			10	44.25	
		19.0±9.3	0.01	77.12	
			0.1	79.39	
			1	73.38	
			10	48.26	
		16.4±8.1	0.01	77.89	
			0.1	77.27	
			1	73.09	
			10	47.10	
30.6±23.2	0.01	80.18			
	0.1	73.58			
	1	74.38			
	10	46.80			
Células dendríticas de cultivos primarios de médula de ratones C57BL/6	PVP-AgNPs Argovit	35	0.03	~ 76	(Castro-Gamboa et al., 2019)
			0.062	~ 78	
			0.125	~ 72	
			0.25	~ 73	
			0.5	~ 62	
			1	~ 54	
Monocitos humanos de	PVP-AgNPs	70	20	~ 88	
			25	~ 76	

sangre periférica humana			30	~ 57	(Greulich et al., 2011)gre
THP-1	PVP-AgNPs (0.2%)	69±49	0.625	~ 78	(Foldbjerg et al., 2009)
			1.250	~ 72	
			2.5	~ 38	
			5	~ 5	
			7.5	~ 2	
THP-1	AgNPs (Sigma Aldrich)	<100	1	~ 86	(Galbiati et al., 2018)
			10	~ 86	
			50	~ 80	
			100	~ 75	
THP-1	PVP-AgNPs	50-70	1.9	~ 85	(Murphy et al., 2016)
			3.91	~ 70	
			7.81	~ 64	
			15.6	~ 60	
			31.25	~ 58	
			62.5	~ 55	
			125	~ 52	
			250	~ 46	
Macrófagos primarios de rata	AgNPs sin recubrimiento	15	28	50	(Carlson et al., 2008)
		30	33	50	
		55	>75	50	
RAW 264.7	PVP-AgNPs	20	0.01	~ 100	(Makama et al., 2018)
			0.1	~ 114	
			1	~ 107	
			5	~ 95	
			10	~ 76	
			20	~ 47	
			50	~ 3	
			100	~ 0	
			200	~ 0	
		50	0.01	~ 100	
			0.1	~ 100	
			1	~ 98	
			5	~ 96	
			10	~ 92	
			20	~ 82	
			50	~ 29	
			100	~ 4	
			200	~ 7	
	Chit-AgNPs	20	0.01	~ 100	
			0.1	~ 112	
			1	~ 103	
			5	~ 95	
			10	~ 59	
			20	~ 20	
50			~ 3		
100			~ 3		
200			~ 2		
50			0.01	~ 100	
	0.1	~ 103			
	1	~ 103			
	5	~ 100			

			10	~ 97	
			20	~ 90	
			50	~ 42	
			100	~ 11	
			200	~ 7	

En la actualidad, la correlación de los resultados obtenidos de los estudios con modelos *in vitro* e *in vivo* es un problema. Especialmente en el rubro de la Nanotoxicología, se ha identificado una deficiencia en el escalamiento de resultados obtenidos con cultivos celulares a la comprensión de los efectos toxicológicos que pueden desarrollar los nanomateriales en un organismo completo (Dobrovolskaia & McNeil, 2013). En ese sentido, se ha reportado que los órganos diana descritos entre nanopartículas metálicas para diferentes modelos de roedores suele ser diferente en función de las propiedades de las nanopartículas.

Para el caso de las AgNPs, estudios previos del efecto de toxicidad y biodistribución reflejan que el hígado, el bazo, los riñones y los testículos son los principales blancos de ratones BALB/c (Loeschner et al., 2011; Moradi-Sardareh et al., 2018; Qin et al., 2015). Nuestros resultados indican que la respuesta a células aisladas de origen tisular diferente es concordante con lo que dicta la literatura, pues al comparar los resultados de viabilidad celular se identificó un efecto citotóxico para todas las formulaciones de Argovit™ en cultivos primarios de hígado (**Figura 3**), riñón (**Figura 4**) y bazo (**Figura 5**). Resultados no publicados de los efectos de la administración oral de nanopartículas de plata Argovit™ en ratones BALB/c del trabajo de Valenzuela-Salas también identifican al hígado, bazo y riñones como órganos diana. Estos resultados son concordantes con lo reportado en la literatura, pues las concentraciones detectadas de la biodistribución de AgNPs se registra con mayores concentraciones en hígado y riñón (Jiménez-Lamana et al., 2014; Loeschner et al., 2011).

Más aún, el efecto propuesto de la disminución de actividad metabólica en cultivos primarios de hígado y bazo a lo que atribuimos la sensibilidad superior de estos cultivos a los efectos toxicológicos de las formulaciones de Argovit™, pueden relacionarse directamente con los resultados de Jarak (Jarak et al., 2017), que

muestra la modulación metabólica de la administración de AgNPs en ratones. En dicho trabajo, se identificó que los órganos blanco de las AgNPs fueron el hígado y el bazo, siendo estos los órganos que mostraron mayores cambios metabólicos. Jarak sugiere que el mecanismo de defensa antioxidante, así como los metabolitos relacionados con las funciones de detoxificación e inmunoregulación del hígado y bazo los convierte en órganos más susceptibles a alteraciones metabólicas.

En conjunto, los resultados obtenidos con la evaluación de las formulaciones en los cultivos primarios de BALB/c nos permiten proponerlos como un modelo de evaluación de citotoxicidad de AgNPs, por su consistencia con lo reportado en la literatura *in vitro* y su excelente correlación con los estudios *in vivo*.

Se ha descrito que los efectos toxicológicos inducidos por las nanopartículas de plata son dependientes de las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales, por lo que pueden ser modulados a través de sus modificaciones (Das et al., 2017). Se ha conseguido una disminución de los efectos toxicológicos de AgNPs a través del recubrimiento con diferentes sustancias. Dependiendo del material y el grosor del recubrimiento, éste puede cambiar las propiedades de la nanopartícula (Fahmy et al., 2019). Se ha reportado que el tipo de recubrimiento utilizado define la estabilidad, captura y toxicidad de AgNPs en solución, sistemas biológicos y el ambiente (V. K. Sharma et al., 2014). Nuestros resultados indican que la toxicidad de las formulaciones de Argovit™ se ve modulada por el recubrimiento de PVP que poseen sus núcleos metálicos, registrando los menores daños al ser comparada con otras formulaciones con el mismo agente de recubrimiento. Atribuimos la selectividad en las diferentes células evaluadas a la proporción específica de polímero contra el de partícula metálica que presentan estas formulaciones.

Sin embargo, debido a que todas las nanopartículas de Argovit™ evaluadas en este trabajo tienen el mismo intervalo de tamaños, carga superficial (potencial Z) y diámetro hidrodinámico (**Tabla 4**), no fue posible identificar diferencias en viabilidad celular inducida por las diferencias en las propiedades fisicoquímicas. Por lo tanto, sugerimos que esta proporción única entre la cantidad de polímero y de partícula metálica no conduce a una respuesta citotóxica dependiente de las

propiedades fisicoquímicas caracterizadas en estas formulaciones (**Figura 10-12 y Figura A7-A27**).

**Tabla 4.** Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de Argovit en disolución acuosa. Adaptado de (Cruz-Ramírez, 2020).

<b>Propiedades</b>	<b>AgNP1</b>	<b>AgNP2</b>	<b>AgNP3</b>	<b>AgNP4</b>	<b>AgNP5</b>
Diámetro promedio de las partículas metálicas (nm)	16.4±8.0	25.4±13.2	19.0±9.3	16.4±8.1	30.6±23.2
Diámetro hidrodinámico (nm)	448.6	90.45	43.80	483.2	121.1
Potencial Z (mV)	-0.872	-4.56	5.13	-0.464	-1.46
Peso molecular del polímero (kDa)	8 - 12	10 - 16	10 - 16	45 - 58	12.6±2.7
Morfología	Esferoidal				
Contenido de plata metálica	12 mg/ml				
Contenido de PVP	188 mg/ml				

En resumen, el uso del modelo de cultivos primarios para evaluar la citotoxicidad de AgNPs de Argovit™ evidenció una respuesta celular específica que es dependiente del tejido, de la capacidad antioxidante y metabolismo de las células tratadas. Las propiedades fisicoquímicas particulares de las AgNPs utilizadas en este trabajo tienen una variación mínima entre ellas, que aunado a que presentan la misma relación de cantidad de agente estabilizante y plata metálica en su núcleo metálico, indican no hay una tendencia de citotoxicidad dependiente de alguna propiedad fisicoquímica. Krug y Wick (Krug & Wick, 2011), sugieren que es necesario determinar caracterizaciones específicas de tamaño, morfología, recubrimiento y estabilidad para poder establecer un sentido específico de comparación entre las propiedades de los nanomateriales utilizados y la inducción de una respuesta biológica en evaluaciones toxicológicas. En ese sentido y haciendo uso de los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos el uso de cultivos primarios de ratones BALB/c para evaluar la citotoxicidad de AgNPs y otros nanomateriales con una caracterización bien descrita, como las formulaciones de Argovit™, para identificar la respuesta biológica con una alta correlación con estudios in vivo. Sugerimos utilizar nanomateriales de control para comparar el

efecto de la variación de una sola de las propiedades fisicoquímicas en los diferentes cultivos propuestos.

## 10. Conclusiones

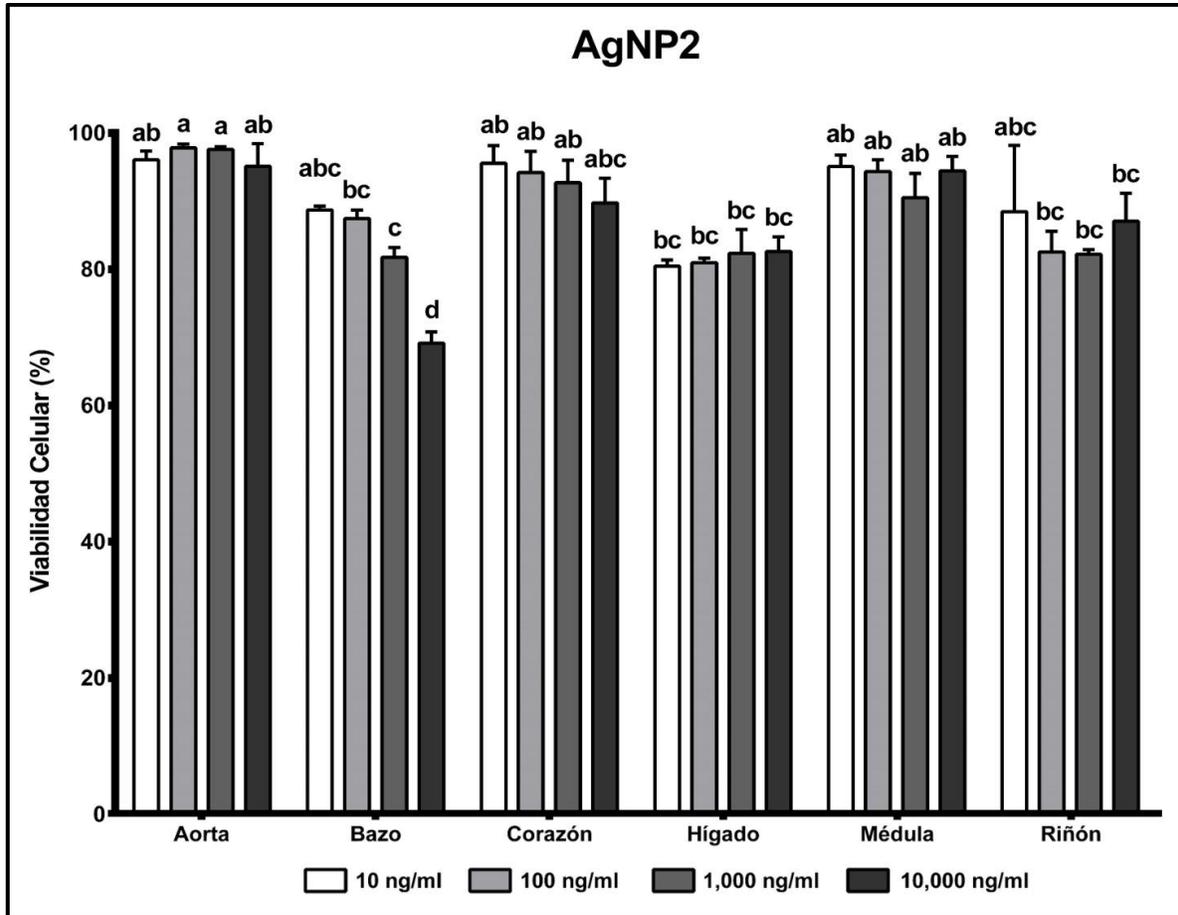
Se identificó que los cultivos primarios de ratones BALB/c presentan una sensibilidad diferente a los efectos citotóxicos de las formulaciones evaluadas de nanopartículas de plata.

Los cultivos primarios de hígado, riñón y bazo registraron los menores valores de viabilidad celular (< 85%), mientras que los cultivos primarios de aorta, corazón y médula registraron menos efectos citotóxicos.

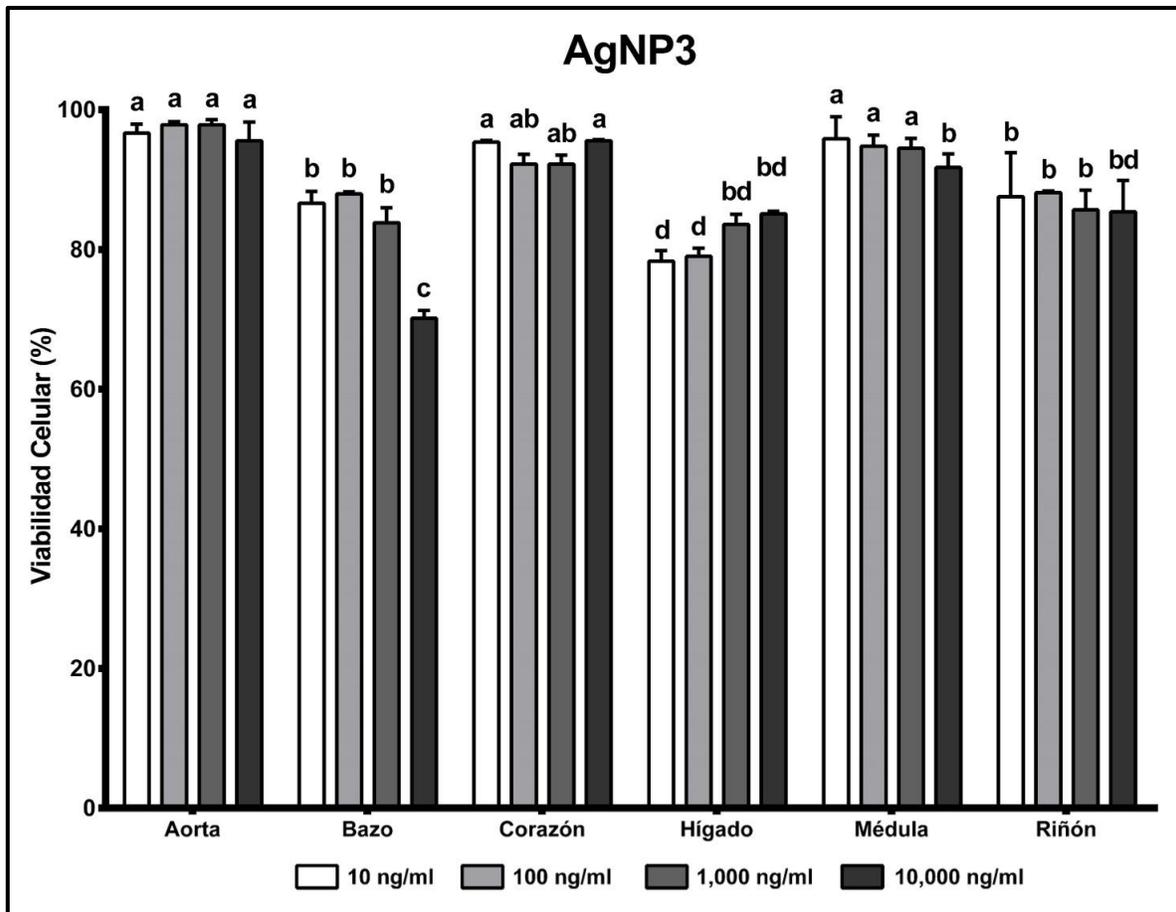
Los resultados de viabilidad celular tras 24 horas de exposición a 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag fueron determinados comparando entre dos métodos de determinación de viabilidad. En este trabajo no encontramos diferencias significativas entre la prueba de exclusión de azul tripano y la citometría de flujo.

El uso de cultivos primarios de ratones BALB/c permite identificar efectos entre células de origen y tipo distinto. Los resultados tienen correlación con lo descrito en modelos *in vivo*.

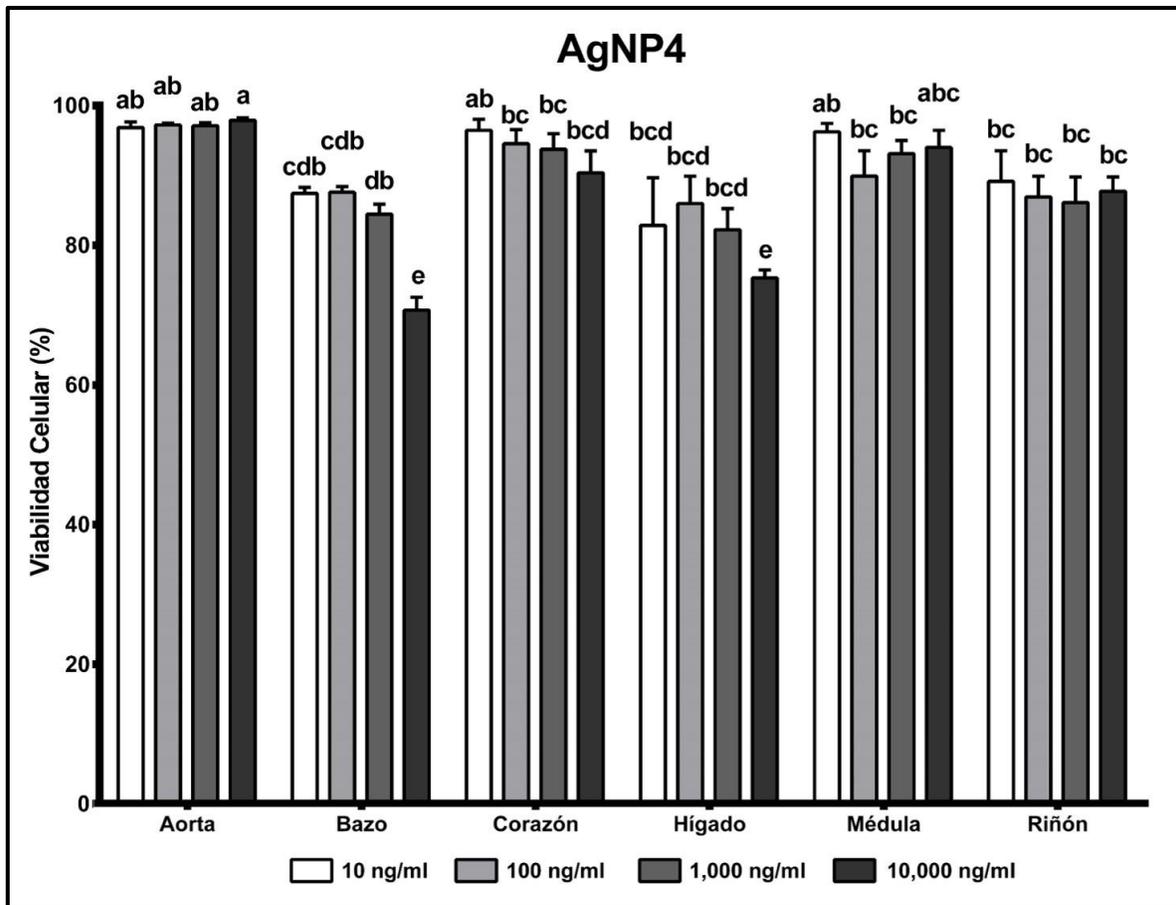
## Anexo



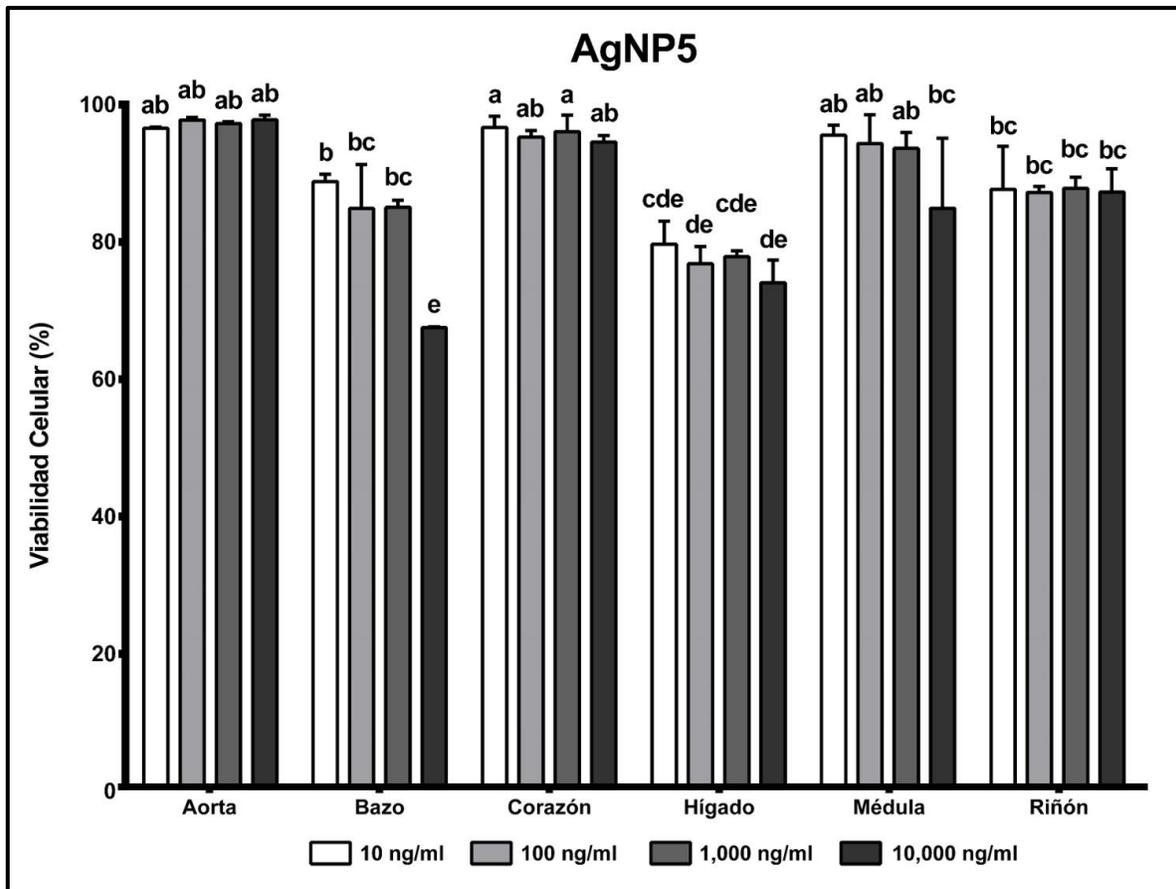
**Figura A1.** Viabilidad celular de cultivos primarios de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de la AgNP2. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



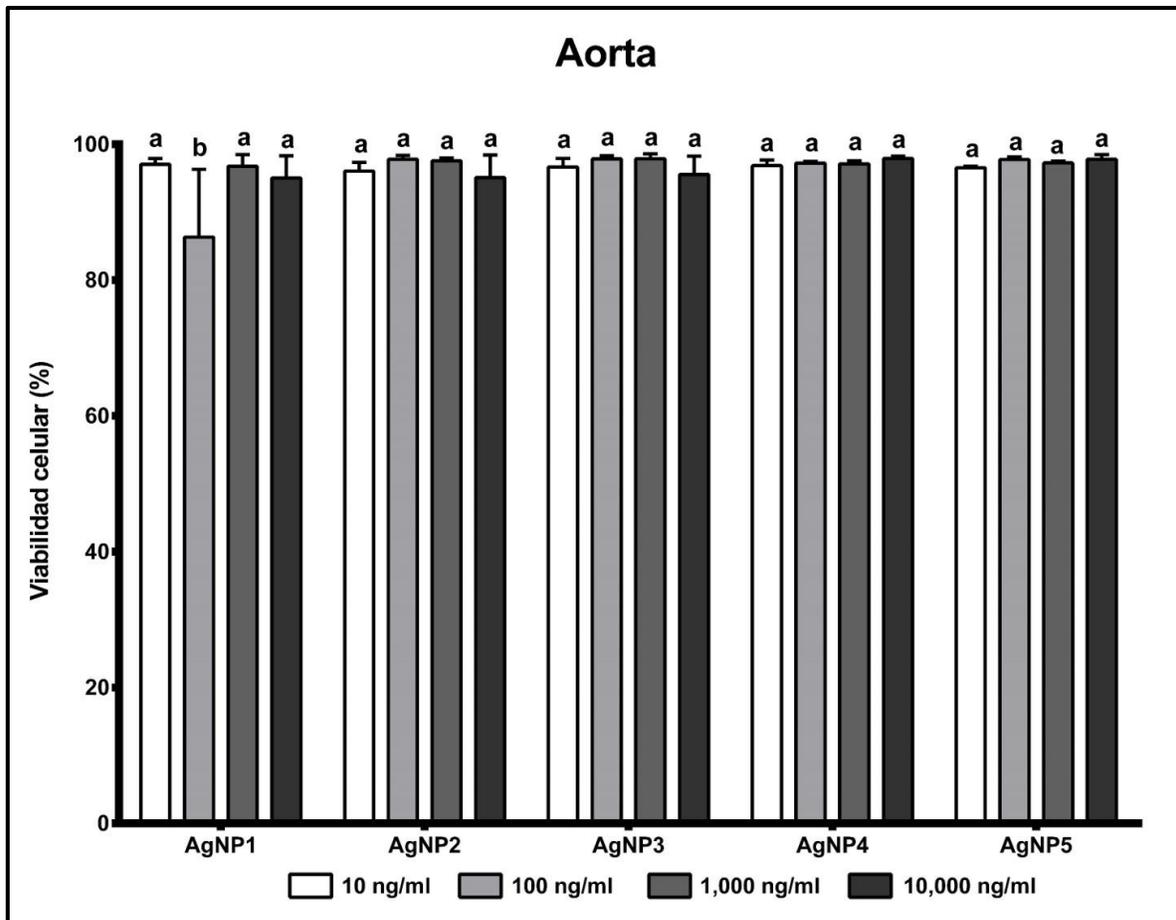
**Figura A2.** Viabilidad celular de cultivos primarios de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de la AgNP3. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



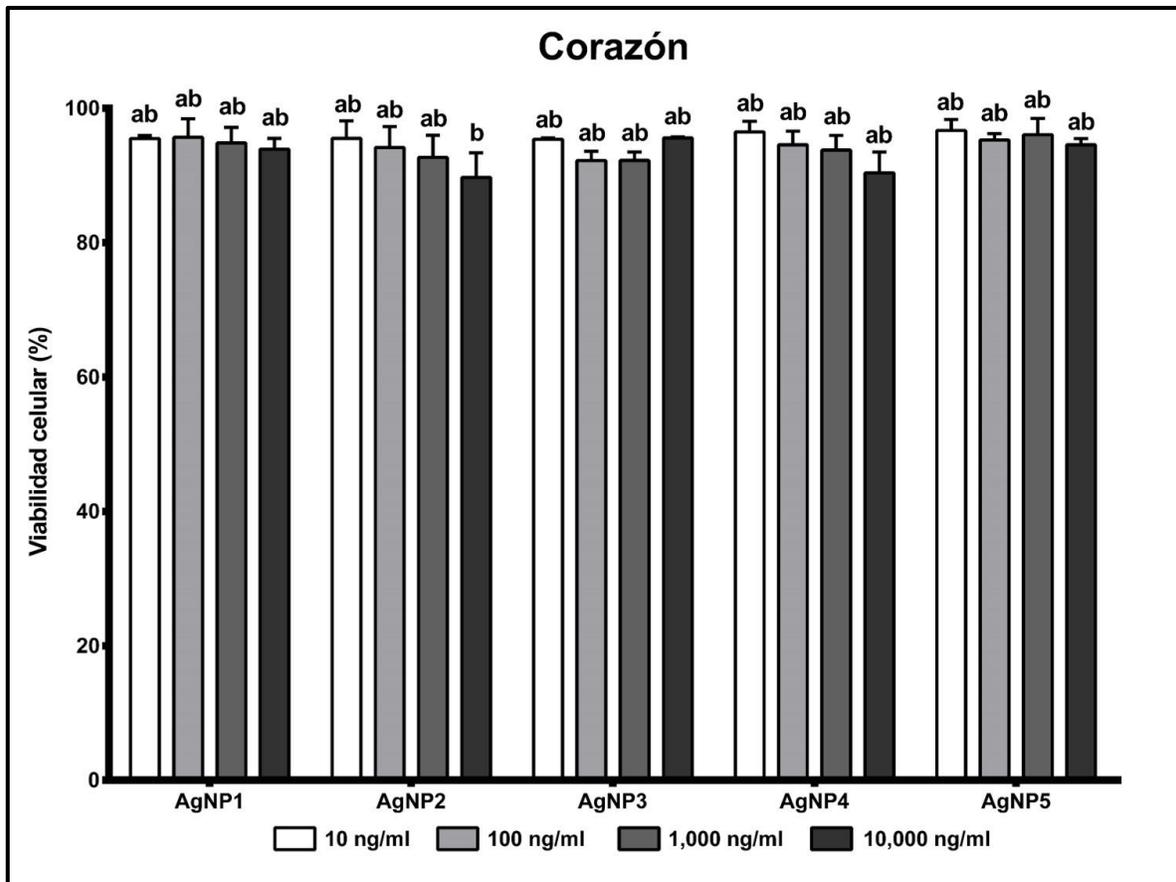
**Figura A3.** Viabilidad celular de cultivos primarios de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de la AgNP4. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



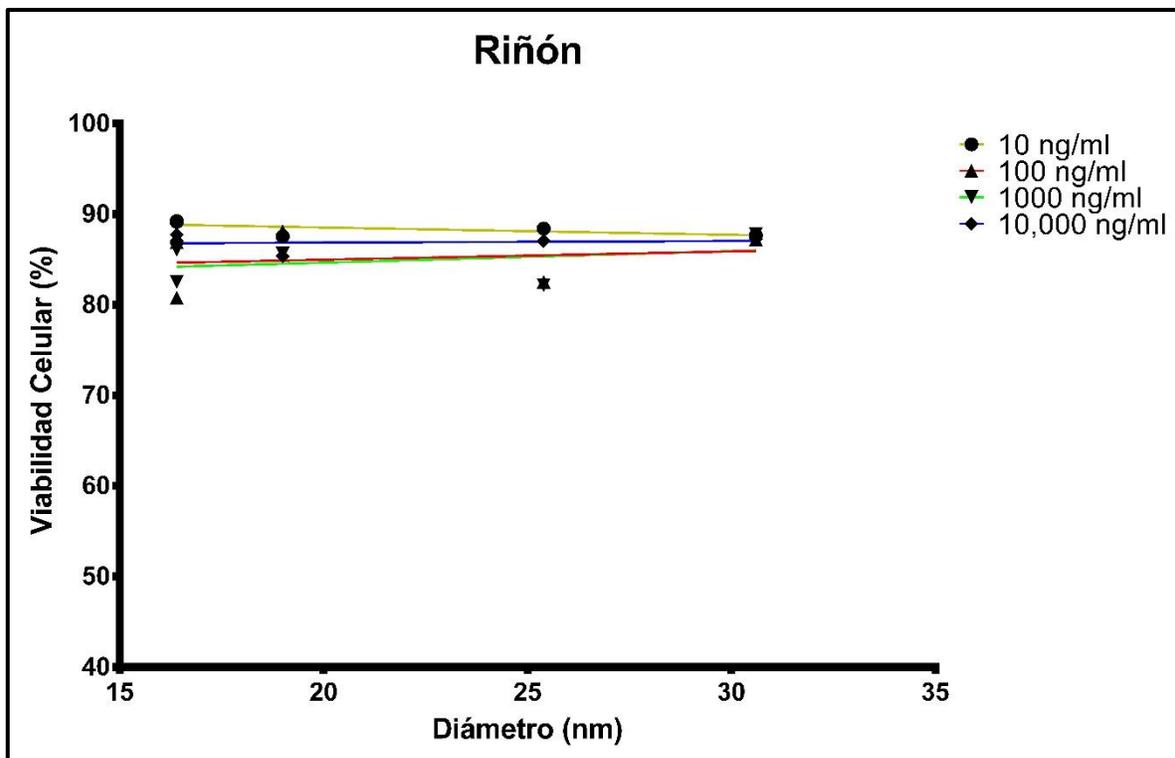
**Figura A4.** Viabilidad celular de cultivos primarios de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de la AgNP5. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



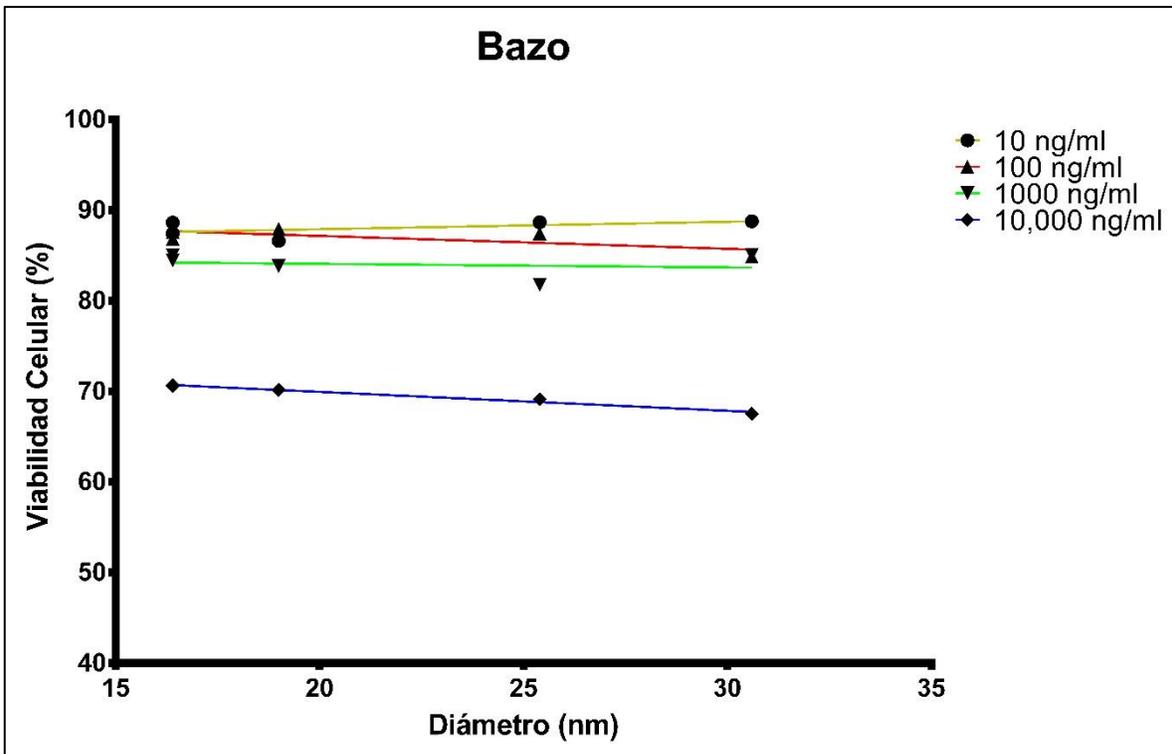
**Figura A5.** Viabilidad celular de cultivos primarios de aorta de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



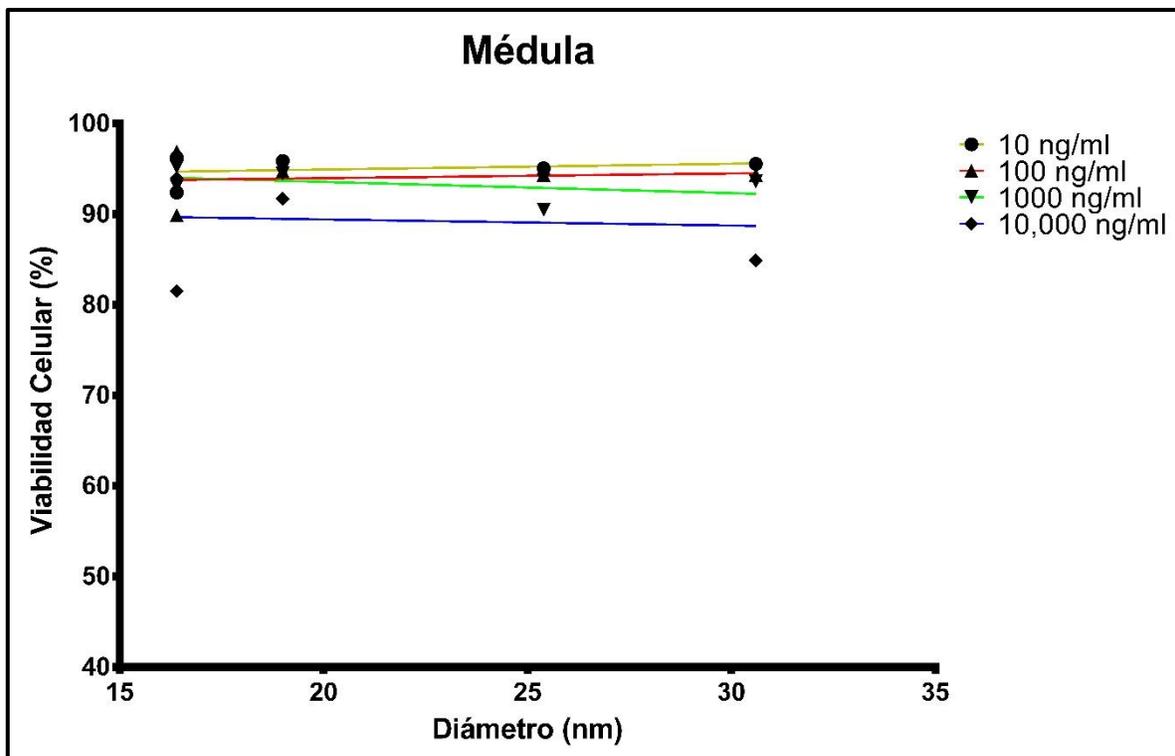
**Figura A6.** Viabilidad celular de cultivos primarios de corazón de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.



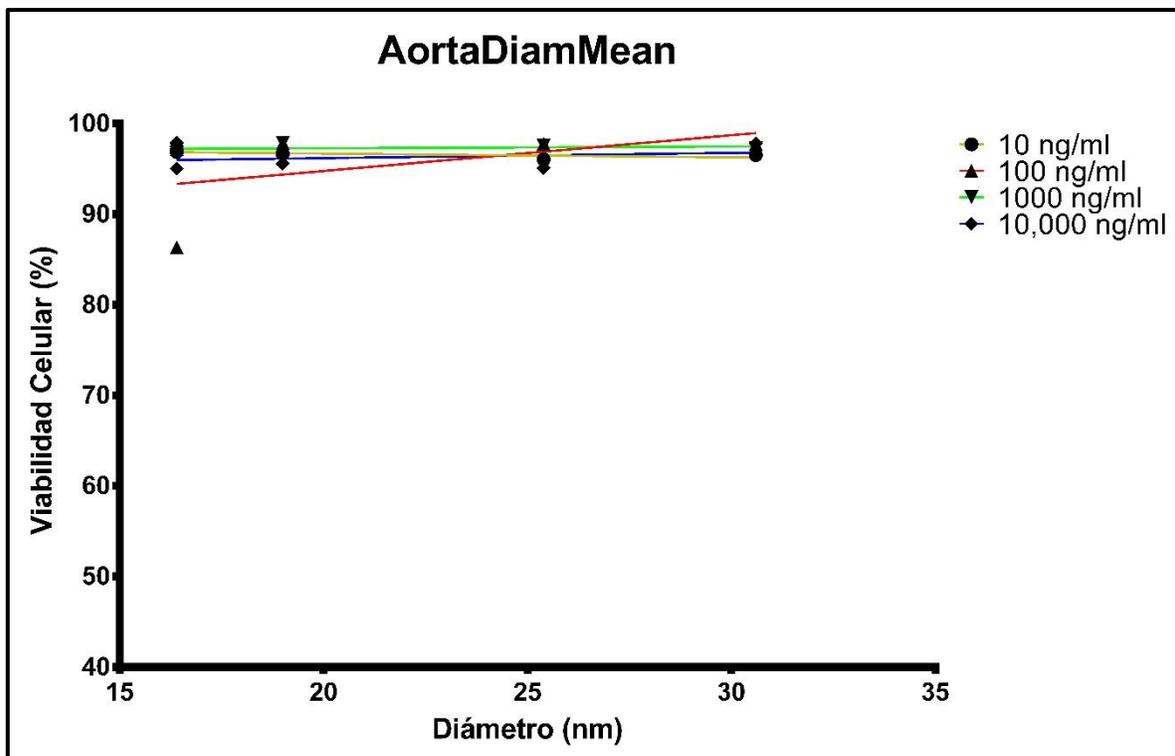
**Figura A7.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro de las partículas metálicas en cultivos primarios de riñón de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



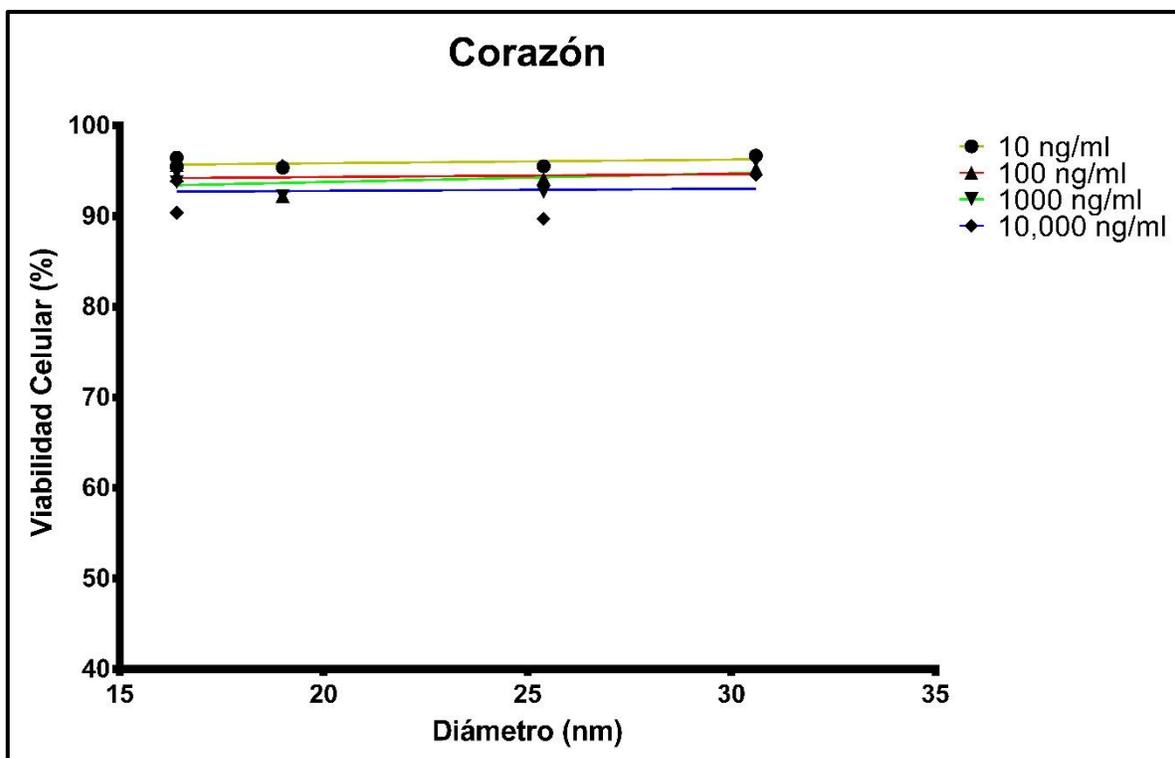
**Figura A8.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro de las partículas metálicas en cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



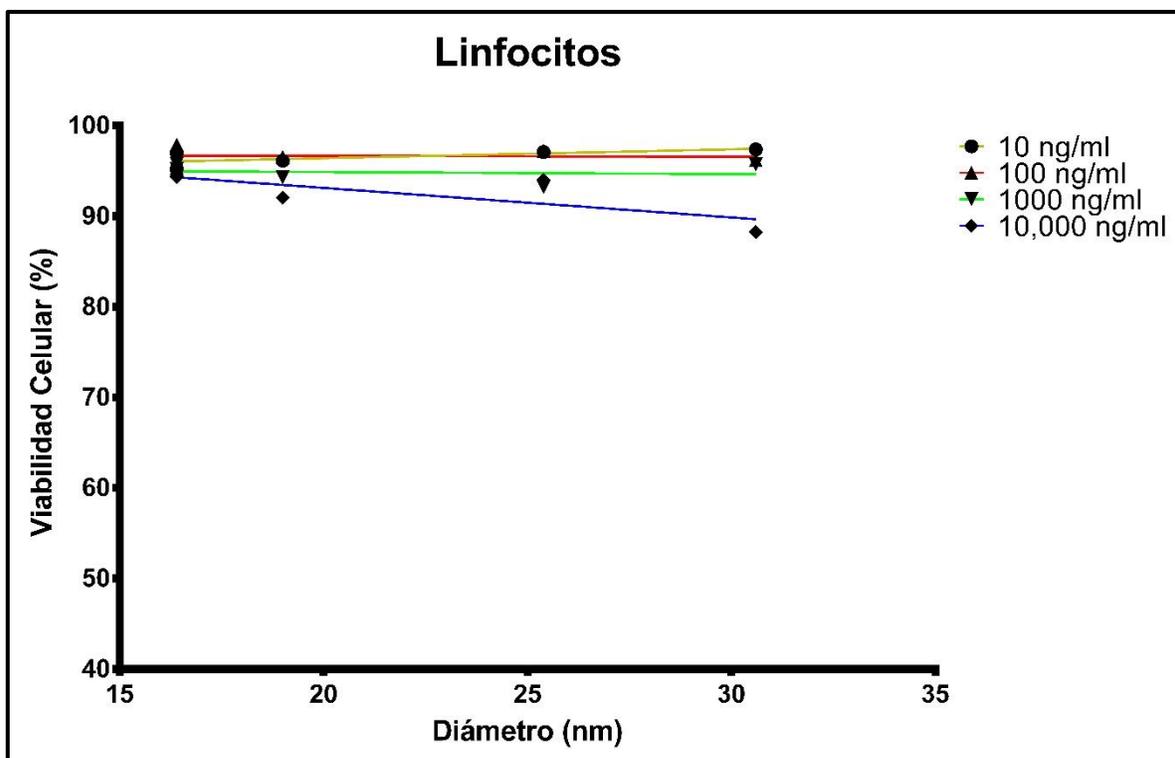
**Figura A9.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro de las partículas metálicas en cultivos primarios de médula de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



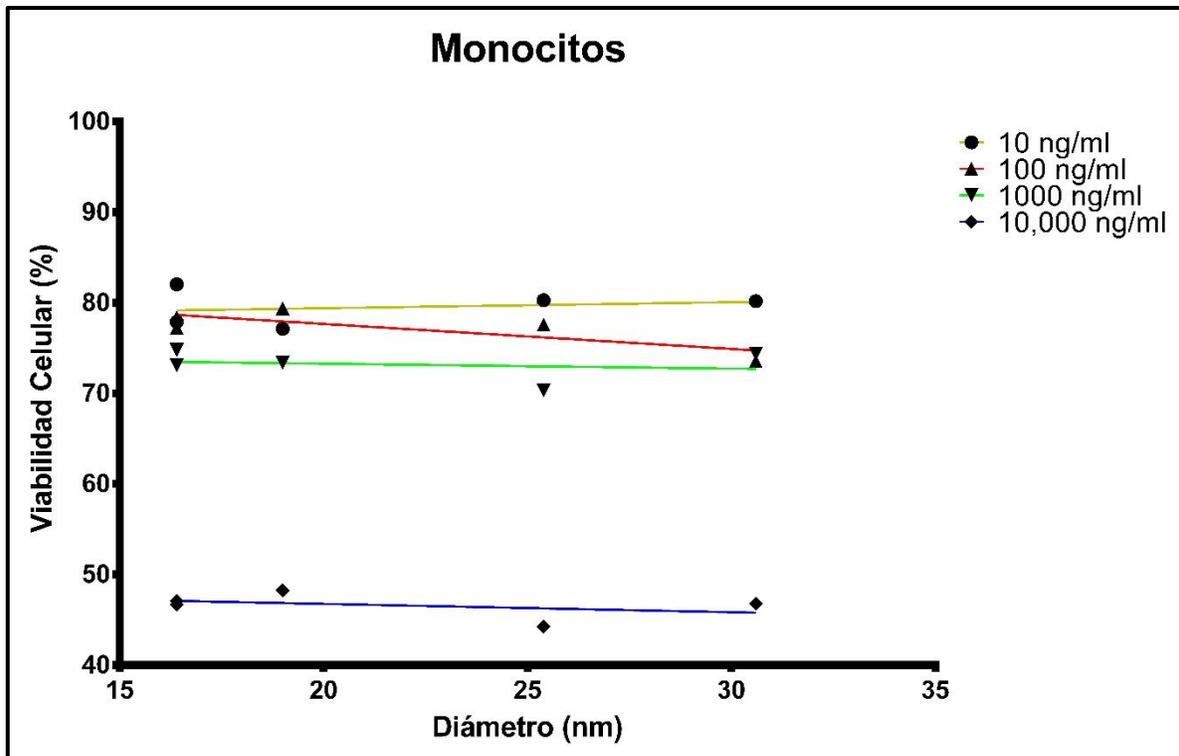
**Figura A10.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro de las partículas metálicas en cultivos primarios de aorta de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



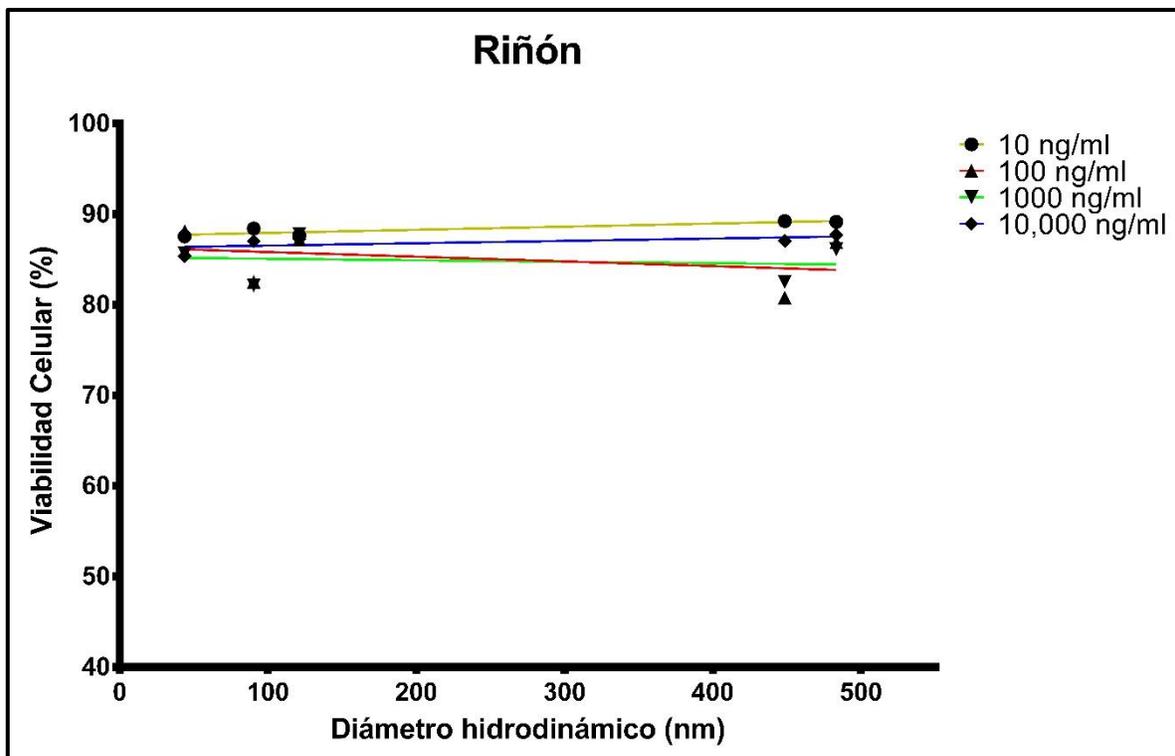
**Figura A11.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro de las partículas metálicas en cultivos primarios de corazón de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



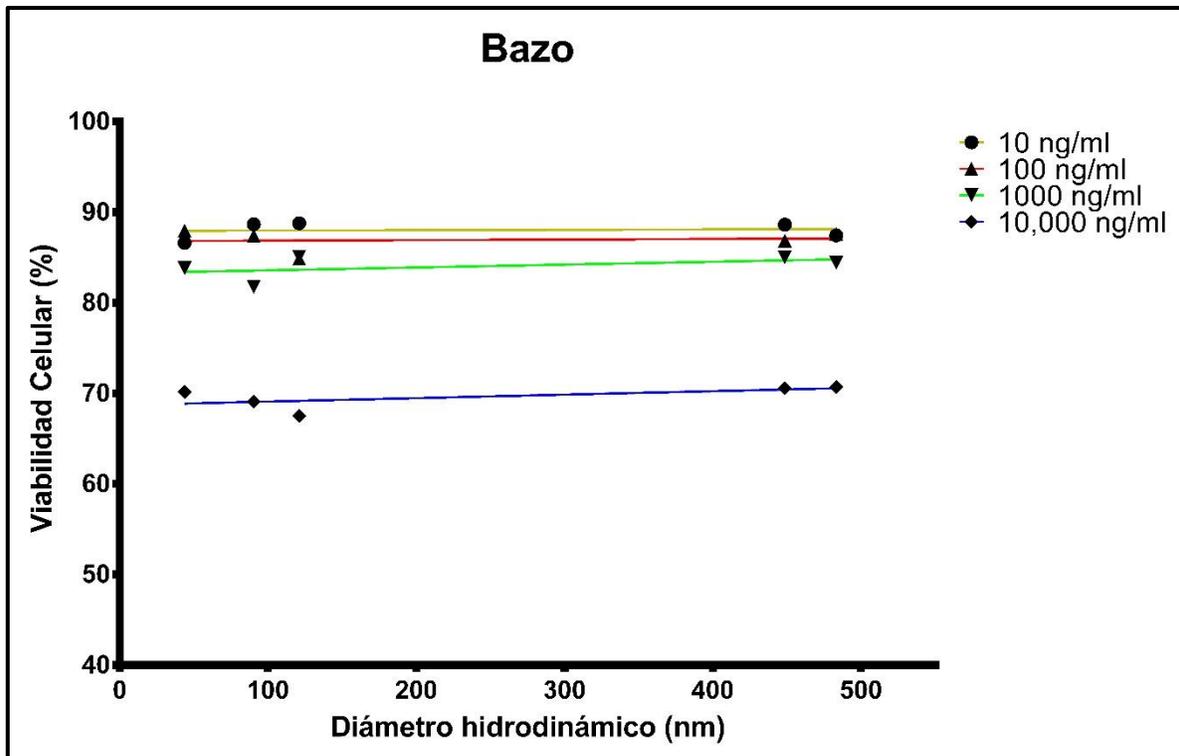
**Figura A12.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro de las partículas metálicas en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



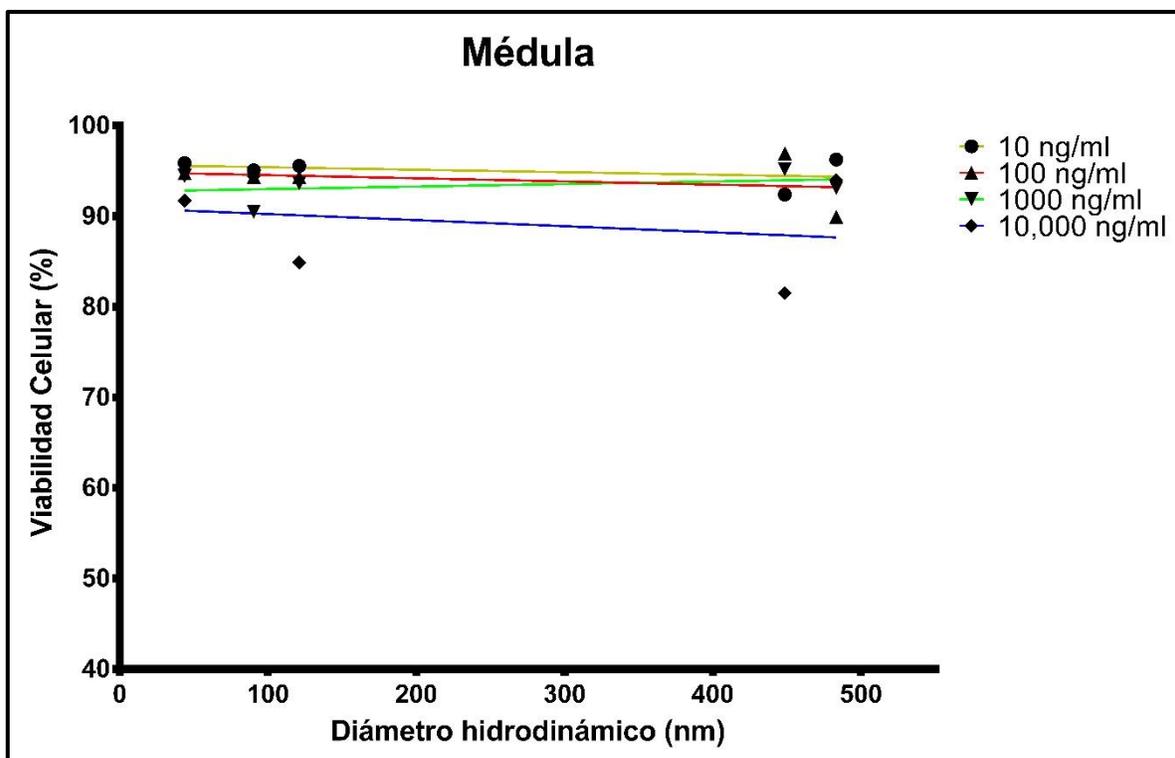
**Figura A13.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro de las partículas metálicas en monocitos de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



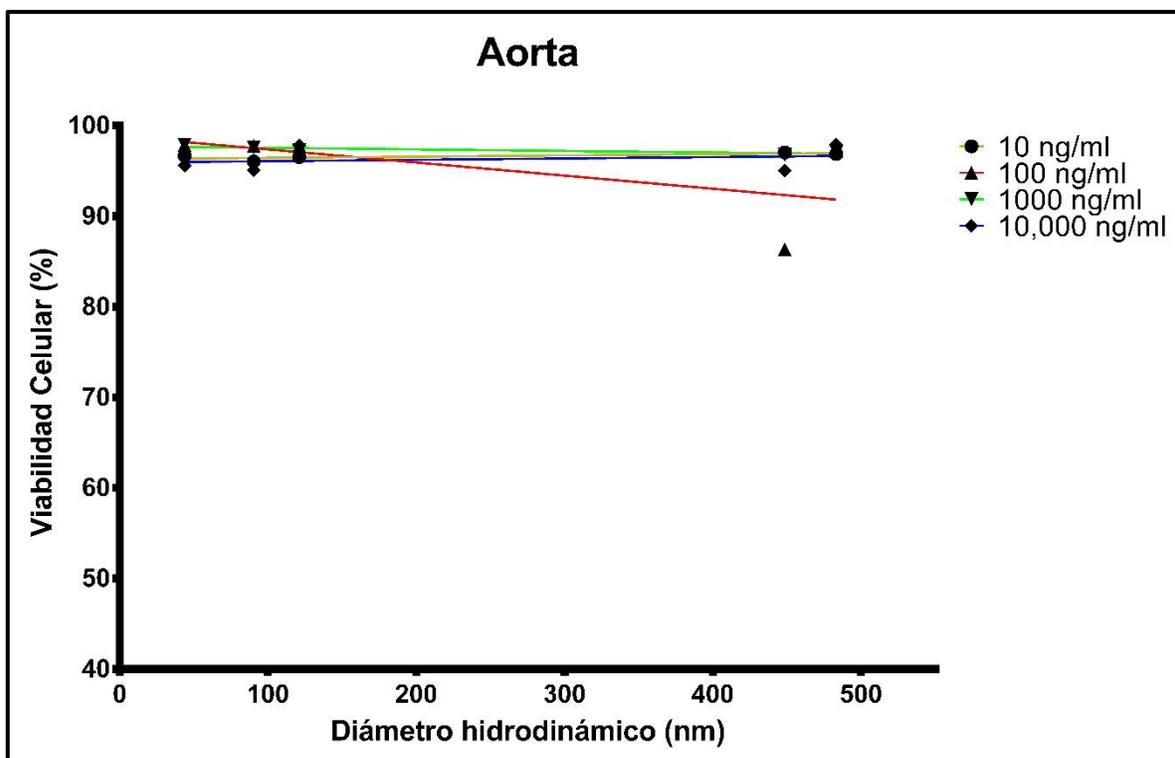
**Figura A14.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro hidrodinámico en cultivos primarios de riñón de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



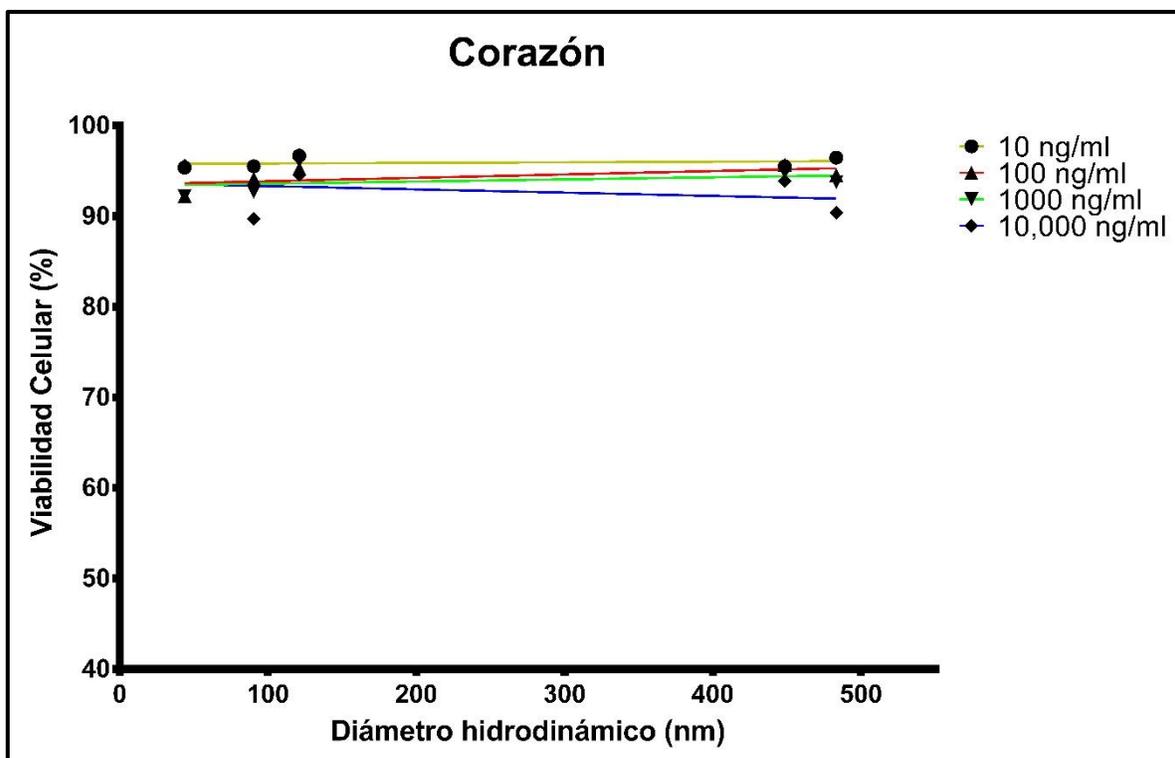
**Figura A15.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro hidrodinámico en cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



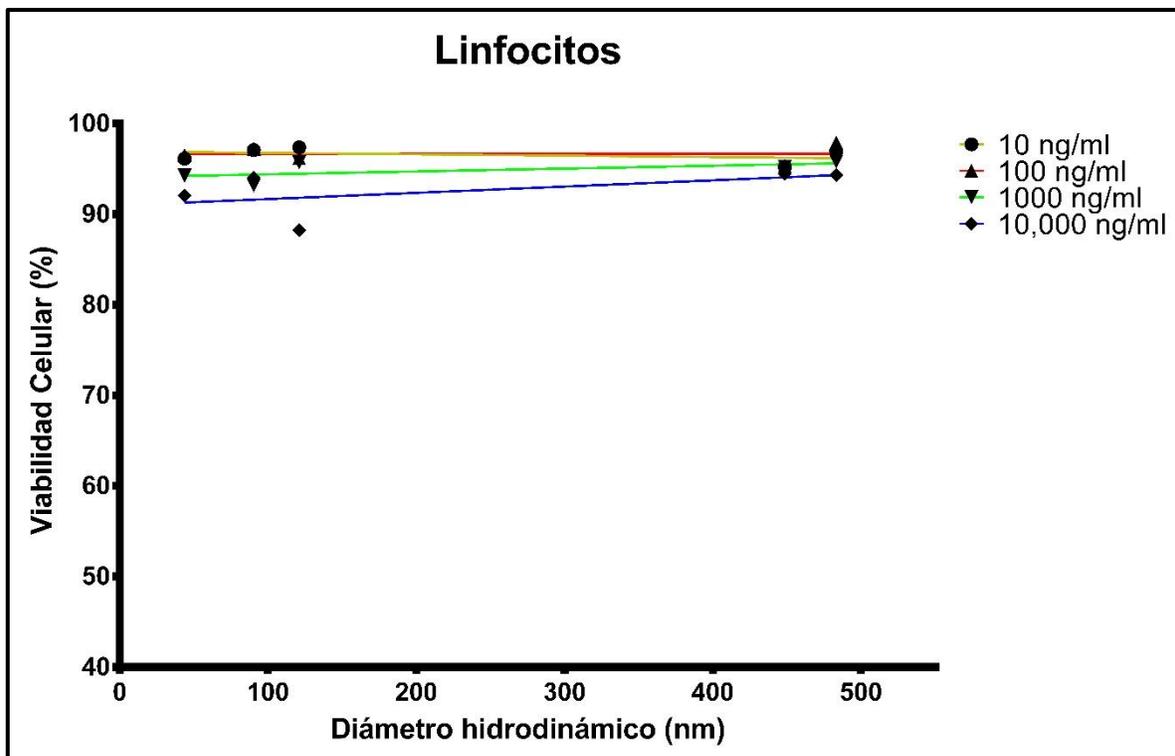
**Figura A16.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro hidrodinámico en cultivos primarios de médula de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



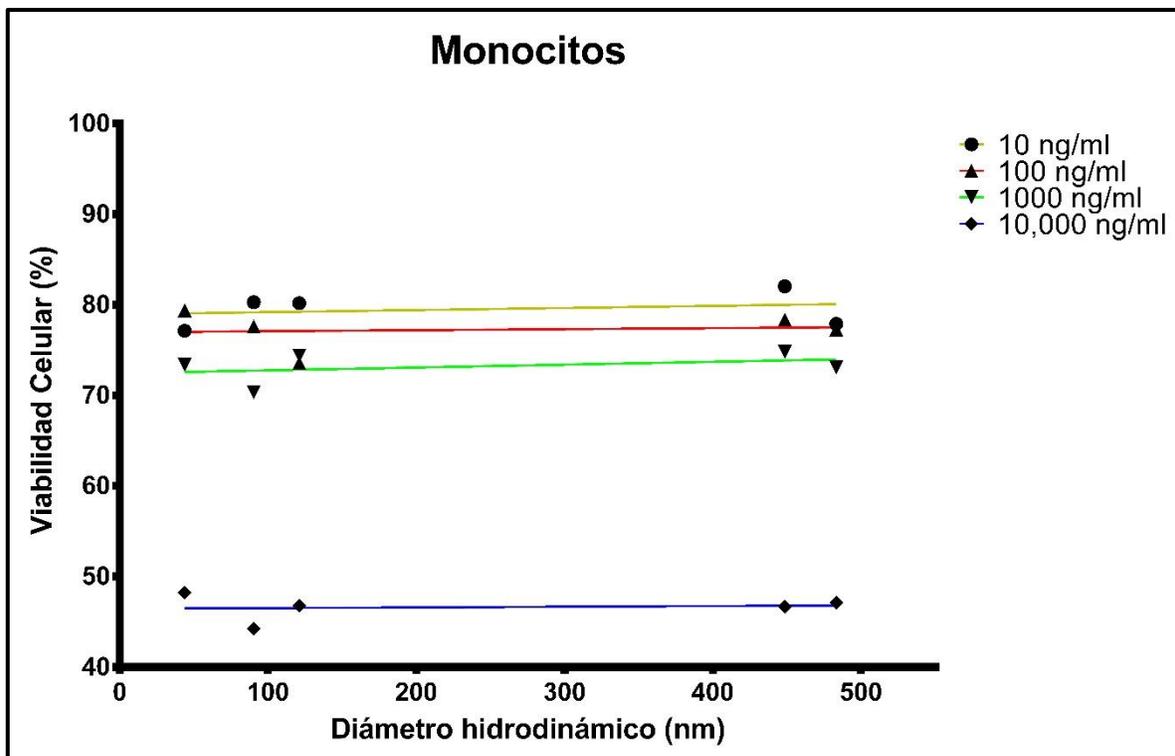
**Figura A17.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro hidrodinámico en cultivos primarios de aorta de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



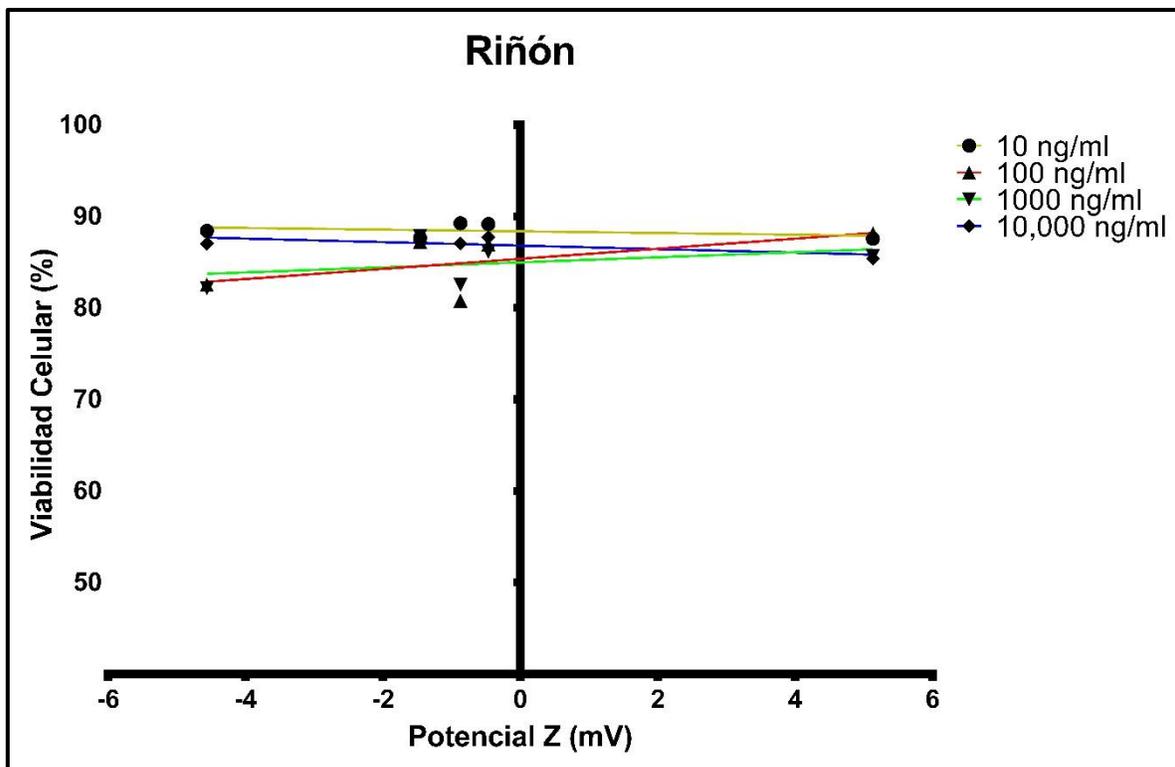
**Figura A18.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro hidrodinámico en cultivos primarios de corazón de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



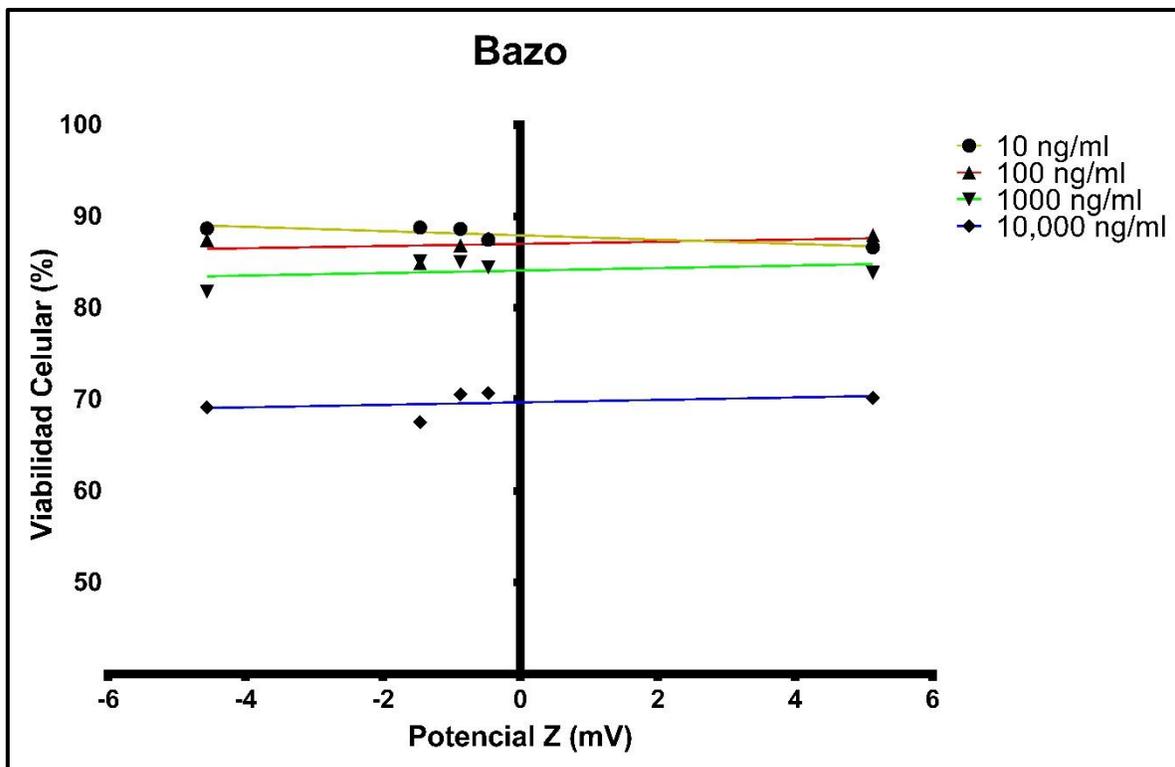
**Figura A19.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro hidrodinámico en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



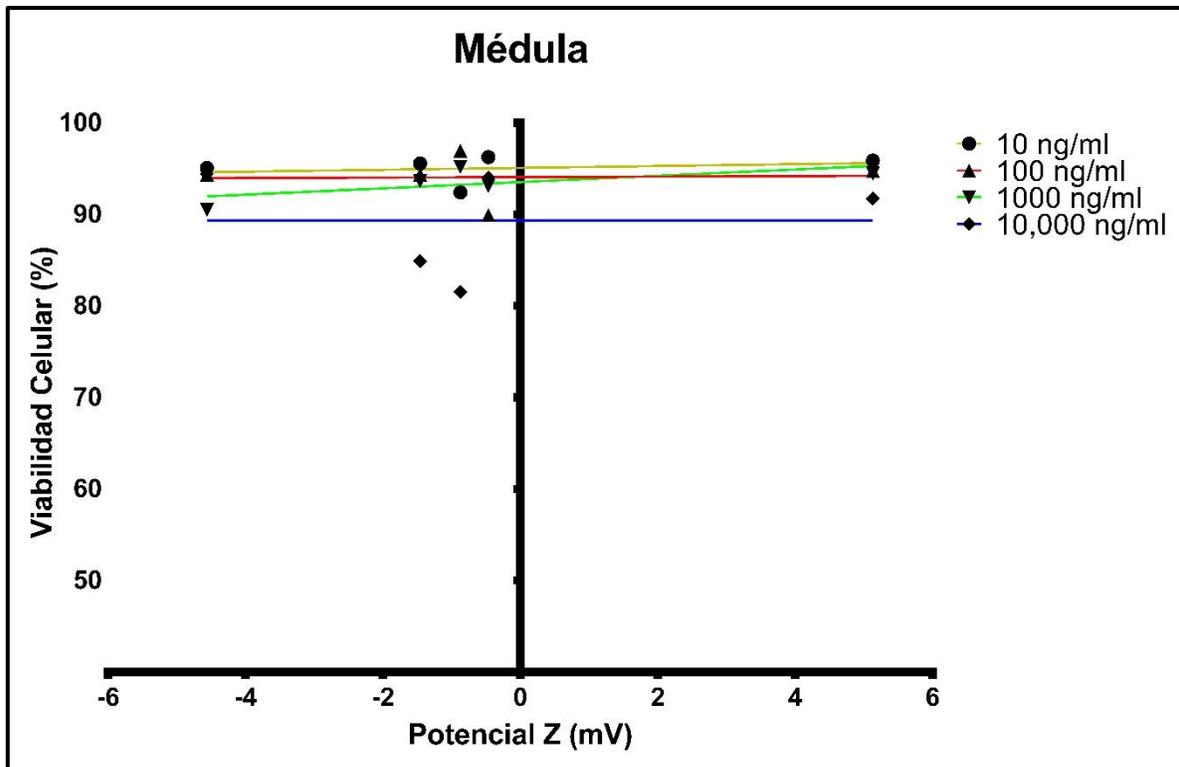
**Figura A20.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del diámetro hidrodinámico en monocitos de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



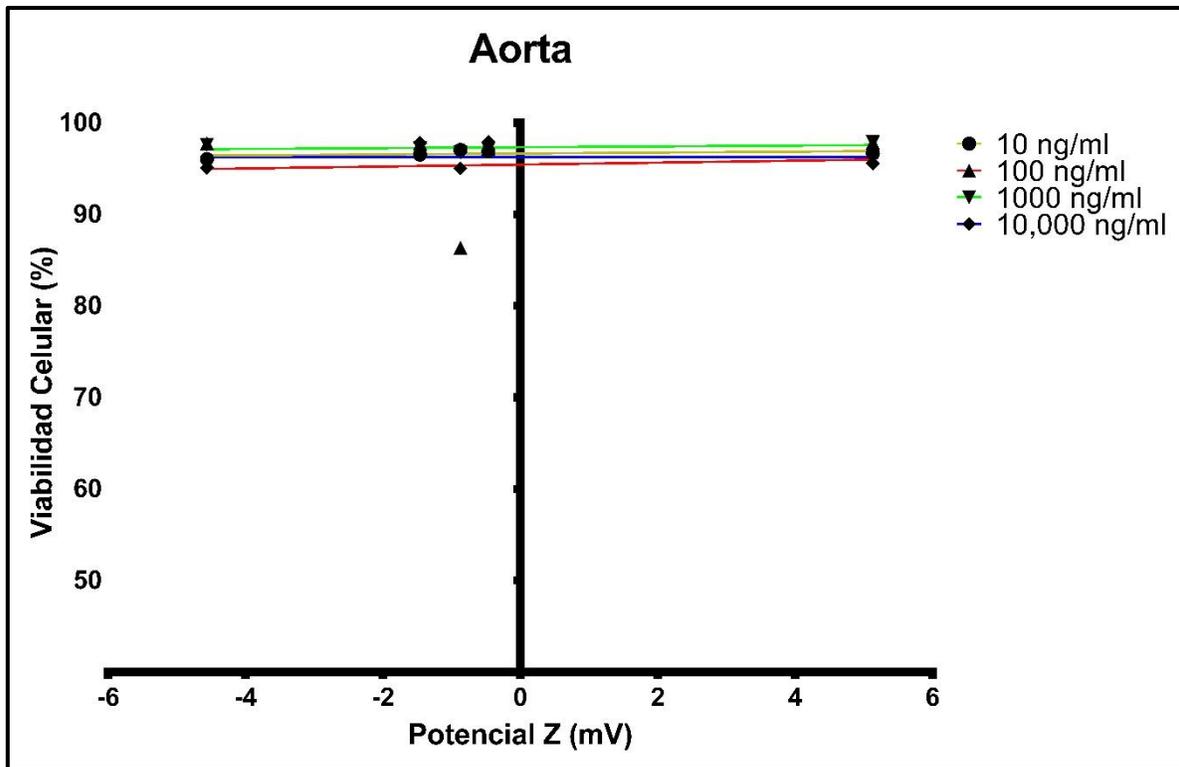
**Figura A21.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del potencial Z en cultivos primarios de riñón de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



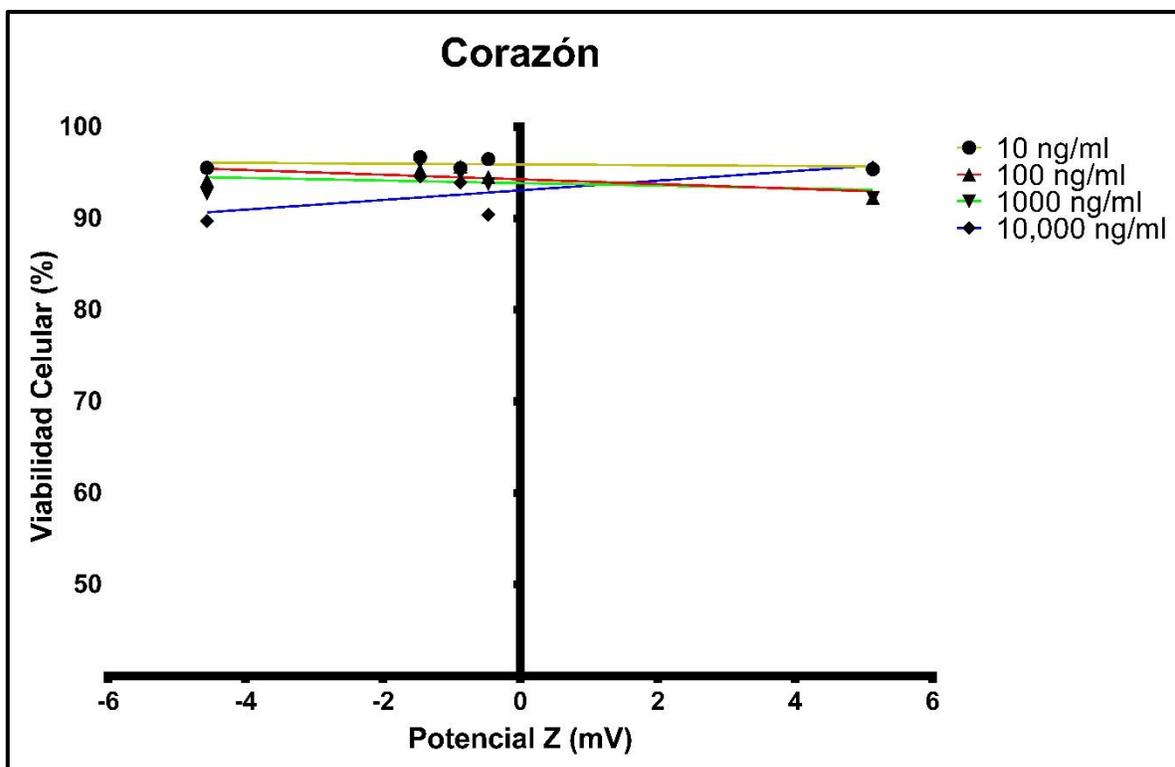
**Figura A22.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del potencial Z en cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



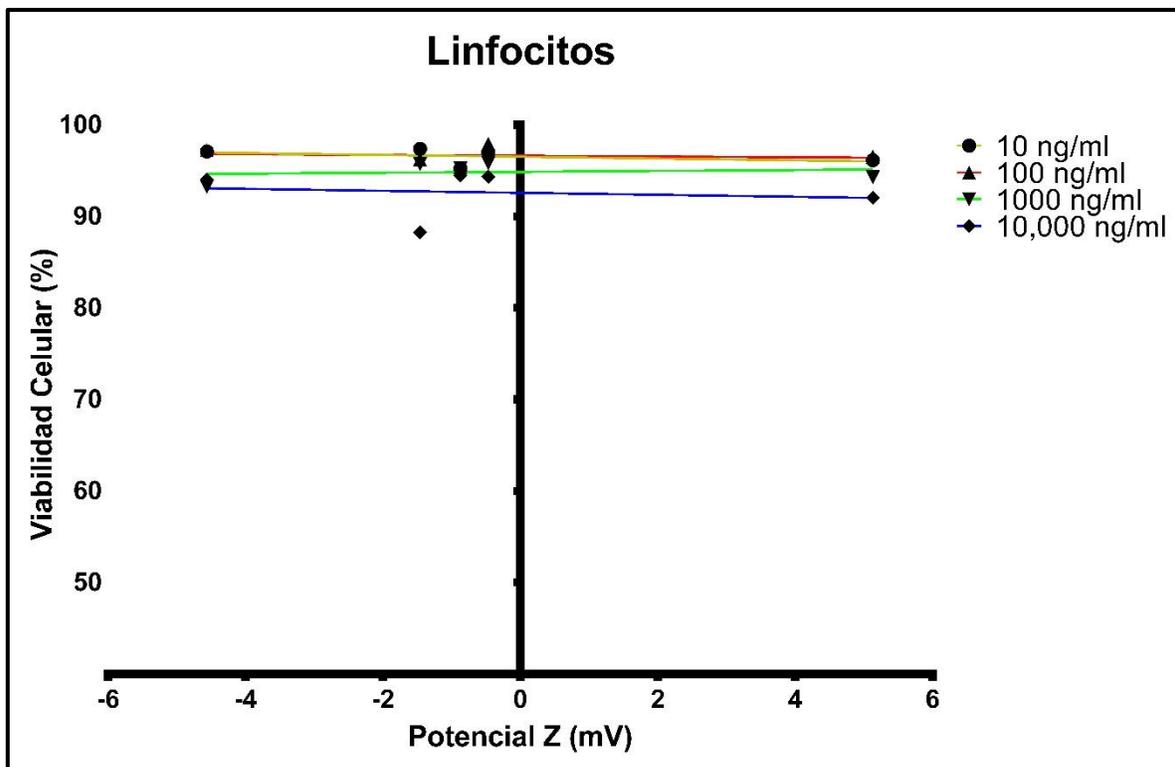
**Figura A23.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del potencial Z en cultivos primarios de médula de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



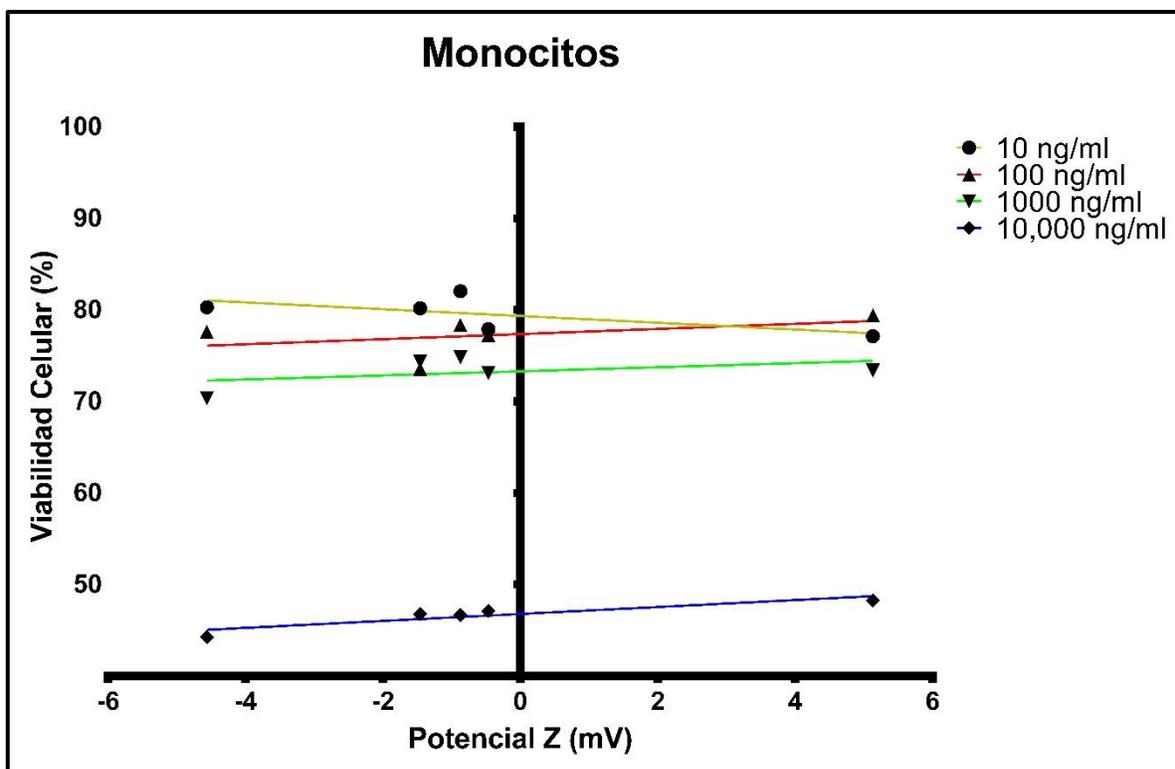
**Figura A24.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del potencial Z en cultivos primarios de aorta de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



**Figura A25.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del potencial Z en cultivos primarios de corazón de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



**Figura A26.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del potencial Z en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.



**Figura A27.** Efecto en viabilidad celular de la modificación del potencial Z en monocitos de cultivos primarios de bazo de ratón BALB/C después de 24 horas de tratamiento con 10, 100, 1000 y 10,000 ng/ml de Ag de las formulaciones de Argovit. Los puntos representan el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y las líneas las tendencias marcadas para cada una de las concentraciones evaluadas.

## Referencias

- Ali, A., Suhail, M., Mathew, S., Shah, M. A., Harakeh, S. M., Ahmad, S., Kazmi, Z., Alhamdan, M. A. R., Chaudhary, A., Damanhour, G. A., & Qadri, I. (2016). Nanomaterial induced immune responses and cytotoxicity. In *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 40–57). American Scientific Publishers. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10885>
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(3), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.02.020>
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, 1–18. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- Becton Dickinson. (2002). *Introduction to flow cytometry: a learning guide*. <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>
- BIO-RAD. (2017). *Flow cytometry basics guide*. <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2017/flow/flow-cytometry-basics-guide.pdf>
- Biotechne. (2019). *Flow cytometry handbook*. <https://info.bio-techne.com/flow-cytometry-handbook>
- BioTek. (2020). *Cell Counting*. <https://www.biotek.es/es/applications/cell-counting.html>
- Brkić Ahmed, L., Milić, M., Pongrac, I. M., Marjanović, A. M., Mlinarić, H., Pavičić, I., Gajović, S., & Vinković Vrček, I. (2017). Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 349–361.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.016>

Bronte, V.; Pittet, M. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, 39(5), 806–818.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.010>.The

Cao, Y., Gong, Y., Liao, W., Luo, Y., Wu, C., Wang, M., & Yang, Q. (2018). A review of cardiovascular toxicity of TiO<sub>2</sub>, ZnO and Ag nanoparticles (NPs). *BioMetals*, 31(4), 457–476. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0113-7>

Carlson, C., Hussein, S. M., Schrand, A. M., Braydich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(43), 13608–13619.

<https://doi.org/10.1021/jp712087m>

Castro-Gamboa, S., Garcia-Garcia, M. R., Piñon-Zarate, G., Rojas-Lemus, M., Jarquin-Yañez, K., Angel Herrera-Enriquez, M., Fortoul, T. I., Toledano-Magaña, Y., Garcia-Iglesias, T., Pestryakov, A., Eliu Castell-Rodriguez, A., & Bogdanchikova, N. (2019). Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: Implications for phenotype. *Journal of Immunotoxicology*, 16(1), 54–62.

<https://doi.org/10.1080/1547691X.2019.1584652>

Chan, L. (2020). *Why is cell viability measurement important?*

<https://www.nexcelom.com/trypan-blue-over-estimates-cell-viability/>

Chan, L. L. Y., Rice, W. L., & Qiu, J. (2020). Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLoS ONE*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227950>

Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>

- Chen, Y., Wang, M., Zhang, T., Du, E., Liu, Y., Qi, S., Xu, Y., & Zhang, Z. (2018). Autophagic effects and mechanisms of silver nanoparticles in renal cells under low dose exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166(September), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.070>
- Cruz-Ramírez, O. (2020). *Estudios preliminares para la aplicación de nanopartículas de plata en el tratamiento de cáncer de colon*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Das, B., Tripathy, S., Adhikary, J., Chattopadhyay, S., Mandal, D., Dash, S. K., Das, S., Dey, A., Dey, S. K., Das, D., & Roy, S. (2017). Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(6), 893–918. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1468-x>
- Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B., & Mcneil, S. E. (2009). Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *Journal Control Release*, 5(4), 487–495. <https://doi.org/10.1021/mp800032f.Preclinical>
- Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2013). Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 172(2), 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.025>
- Du, B., Yu, M., & Zheng, J. (2018). Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys. *Nature Reviews Materials*, 3(10), 358–374. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0038-3>
- Faedmaleki, F., Shirazi, F. H., Ejtemaeimehr, S., Anjarani, S., Salarian, A. A., Ashtiani, H. A., & Rastegar, H. (2016). Study of silymarin and vitamin E protective effects on silver nanoparticle toxicity on mice liver primary cell culture. *Acta Medica Iranica*, 54(2), 85–95.
- Faedmaleki, F., Shirazi, F. H., Salarian, A. A., Ashtiani, H. A., & Rastegar, H.

- (2014). Toxicity effect of silver nanoparticles on mice liver primary cell culture and HepG2 cell line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 235–242. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2014.1436>
- Fahmy, H. M., Mosleh, A. M., Elghany, A. A., Shams-Eldin, E., Abu Serea, E. S., Ali, S. A., & Shalan, A. E. (2019). Coated silver nanoparticles: Synthesis, cytotoxicity, and optical properties. *RSC Advances*, 9(35), 20118–20136. <https://doi.org/10.1039/c9ra02907a>
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J., & Autrup, H. (2009). PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*, 190(2), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009>
- Fuentes, M. (2014). *Hemocytometer protocol*. <https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-protocol/>
- Galbiati, V., Cornaghi, L., Gianazza, E., Potenza, M. A., Donetti, E., Marinovich, M., & Corsini, E. (2018). In vitro assessment of silver nanoparticles immunotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.023>
- Greulich, C., Diendorf, J., Geßmann, J., Simon, T., Habijan, T., Eggeler, G., Schildhauer, T. A., Epple, M., & Köller, M. (2011). Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 7(9), 3505–3514. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.030>
- Haase, A., Rott, S., Manton, A., Graf, P., Plendl, J., Thünemann, A. F., Meier, W. P., Taubert, A., Luch, A., & Reiser, G. (2012). Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: Uptake, oxidative stress and acute calcium responses. *Toxicological Sciences*, 126(2), 457–468. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs003>
- Habas, K., Brinkworth, M. H., & Anderson, D. (2018). Silver nanoparticle-mediated cellular responses in isolated primary Sertoli cells in vitro. *Food and Chemical*

*Toxicology*, 116, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.030>

Hernández-Sierra, J. F. et al. (2011). In vitro Cytotoxicity of Silver Nanoparticles on Human Peridontal Fibroblasts. *J Clin Pediatr Dent*, 36(1), 37–42. <https://doi.org/10.1166/nnl.2017.2422>

Hirsch, C.; Roeslein, M.; Krug, H.; Wick, P. (2011). Nanomaterial cell interactions : are current in vitro tests reliable? *Nanomedicine*, 6(5), 837–847.

Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., & Schlager, J. J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*, 19(7), 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.034>

Invitrogen. (2018). *Cell Culture Basics Handbook*.

Jarak, I., Carrola, J., Barros, A. S., Gil, A. M., Pereira, M. de L., Corvo, M. L., & Duarte, I. F. (2017). Metabolism modulation in different organs by silver nanoparticles: An NMR metabolomics study of a mouse model. *Toxicological Sciences*, 159(2), 422–435. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx142>

Jiménez-Lamana, J., Laborda, F., Bolea, E., Abad-Álvaro, I., Castillo, J. R., Bianga, J., He, M., Bierla, K., Mounicou, S., Ouerdane, L., Gaillet, S., Rouanet, J. M., & Szpunar, J. (2014). An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats. *Metallomics*, 6(12), 2242–2249. <https://doi.org/10.1039/c4mt00200h>

Jones, C. F., & Grainger, D. W. (2009). In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 438–456. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.005>

Kim, S. H., Ko, J. W., Koh, S. K., Lee, I. C., Son, J. M., Moon, C., Kim, S. H., Shin, D. H., & Kim, J. C. (2014). Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in cultured cerebral cortical neurons. *Molecular and Cellular Toxicology*, 10(2), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s13273-014-0019-6>

Krug, H. F., & Wick, P. (2011). Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge.

*Angewandte Chemie - International Edition*, 50(6), 1260–1278.

<https://doi.org/10.1002/anie.201001037>

Kumar, D., Mutreja, I., Keshvan, P. C., Bhat, M., Dinda, A. K., & Mitra, S. (2015). Organically Modified Silica Nanoparticles Interaction with Macrophage Cells: Assessment of Cell Viability on the Basis of Physicochemical Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(11), 3943–3951.  
<https://doi.org/10.1002/jps.24614>

Lankoff, A., Sandberg, W. J., Wegierek-Ciuk, A., Lisowska, H., Refsnes, M., Sartowska, B., Schwarze, P. E., Meczynska-Wielgosz, S., Wojewodzka, M., & Kruszewski, M. (2012). The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicology Letters*, 208(3), 197–213.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.006>

Lee, M. J., Lee, S. J., Yun, S. J., Jang, J. Y., Kang, H., Kim, K., Choi, I. H., & Park, S. (2015). Silver nanoparticles affect glucose metabolism in hepatoma cells through production of reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 55–68. <https://doi.org/10.2147/IJN.S94907>

Lewis, J. S., Barani, Z., Magana, A. S., & Kargar, F. (2019). *cepte d M us pt.* 0–31.

Li, J., Zhang, B., Chang, X., Gan, J., Li, W., Niu, S., Kong, L., Wu, T., Zhang, T., Tang, M., & Xue, Y. (2020). Silver nanoparticles modulate mitochondrial dynamics and biogenesis in HepG2 cells. *Environmental Pollution*, 256.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113430>

Loeschner, K., Hadrup, N., Qvortrup, K., Larsen, A., Gao, X., Vogel, U., Mortensen, A., Lam, H. R., & Larsen, E. H. (2011). Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Particle and Fibre Toxicology*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-18>

Lonza. (2020a). *An Introduction to Cell Culture*.

[https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/MX/en/cell-culture](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/MX/en/cell-culture)

- Lonza. (2020b). *An Introduction to Primary Cell Culture*.  
[https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/MX/en/an-introduction-to-primary-cell-culture](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/MX/en/an-introduction-to-primary-cell-culture)
- Loret, T., Rogerieux, F., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., & Lacroix, G. (2018). Predicting the in vivo pulmonary toxicity induced by acute exposure to poorly soluble nanomaterials by using advanced in vitro methods. *Particle and Fibre Toxicology*, 15(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0260-6>
- Luo, Y. H., Chang, L. W., & Lin, P. (2015). Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Research International*, 2015(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2015/143720>
- Makama, S., Kloet, S. K., Piella, J., van den Berg, H., de Ruijter, N. C. A., Puentes, V. F., Rietjens, I. M. C. M., & van den Brink, N. W. (2018). Effects of Systematic Variation in Size and Surface Coating of Silver Nanoparticles on Their In Vitro Toxicity to Macrophage RAW 264.7 Cells. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 162(1), 79–88. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx228>
- Mao, B. H., Tsai, J. C., Chen, C. W., Yan, S. J., & Wang, Y. J. (2016). Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology*, 10(8), 1021–1040. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1189614>
- McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., & Eloff, J. N. (2014). Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. In *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00008-X>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 2018(February), 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Michalopoulos, G. K. (2007). Liver Regeneration. *Journal Cellular Physiology*, 213(May), 286–300. <https://doi.org/10.1002/JCP>

- Michelle Longmire, Peter L. Choyke, M.D., and Hisataka Kobayashi, M.D., P. . (2008). Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Consideration and Caveats. *Nanomedicine*, 3(5), 703–717. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703.Clearance>
- Milić, M., Leitinger, G., Pavičić, I., Zebić Avdičević, M., Dobrović, S., Goessler, W., & Vinković Vrček, I. (2015). Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(6), 581–592. <https://doi.org/10.1002/jat.3081>
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*, 19(3), 311–330. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2747rev>
- Moradi-Sardareh, H., Basir, H. R. G., Hassan, Z. M., Davoudi, M., Amidi, F., & Paknejad, M. (2018). Toxicity of silver nanoparticles on different tissues of Balb/C mice. *Life Sciences*, 211, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.001>
- Murphy, A., Casey, A., Byrne, G., Chambers, G., & Howe, O. (2016). Silver nanoparticles induce pro-inflammatory gene expression and inflammasome activation in human monocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 36(10), 1311–1320. <https://doi.org/10.1002/jat.3315>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Park, M. V. D. Z., Neigh, A. M., Vermeulen, J. P., de la Fonteyne, L. J. J., Verharen, H. W., Briedé, J. J., van Loveren, H., & de Jong, W. H. (2011). The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(36), 9810–9817. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>
- Qin, Y., Zhou, Z. W., Pan, S. T., He, Z. X., Zhang, X., Qiu, J. X., Duan, W., Yang,

- T., & Zhou, S. F. (2015). Graphene quantum dots induce apoptosis, autophagy, and inflammatory response via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B mediated signaling pathways in activated THP-1 macrophages. *Toxicology*, 327, 62–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.10.011>
- Riaz Ahmed, K. B., Nagy, A. M., Brown, R. P., Zhang, Q., Malghan, S. G., & Goering, P. L. (2017). Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in Vitro*, 38, 179–192.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.012>
- Rosas-Hernández, H., Jiménez-Badillo, S., Martínez-Cuevas, P. P., Gracia-Espino, E., Terrones, H., Terrones, M., Hussain, S. M., Ali, S. F., & González, C. (2009). Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicology Letters*, 191(2–3), 305–313.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.014>
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Salih Istifli, E., Tahir Hüsünet, M., & Basri Ila, H. (2019). Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity. *Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds*, 1–19.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.88368>
- Sayes, C. M., Reed, K. L., & Warheit, D. B. (2007). Assessing toxicology of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicological Sciences*, 97(1), 163–180.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm018>
- Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>

- Sharma, L., Wu, W., Dholakiya, S. L., Gorasiya, S., Wu, J., Sitapara, R., Patel, V., Wang, M., Zur, M., Reddy, S., Siegelaub, N., Bamba, K., Barile, F. A., & Mantell, L. L. (2014). Assessment of phagocytic activity of cultured macrophages using fluorescence microscopy and flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 1172, 137–145. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0928-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0928-5_12)
- Sharma, V. K., Siskova, K. M., Zboril, R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 204, 15–34. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.002>
- Shubayev, V. I., Pisanic, T. R., & Jin, S. (2009). Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 467–477. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.007>
- SigmaAldrich. (2020a). *Cell Culture Protocol 6: Cell Counting using a hemocytometer*. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-quantification.html>
- SigmaAldrich. (2020b). *Primary Cell Culture Basics*. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/primary-cell-culture.html>
- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W., & Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-22>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Sun, X., Wang, Z., Zhai, S., Cheng, Y., Liu, J., & Liu, B. (2013). In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles in primary rat hepatic stellate cells. *Molecular Medicine Reports*, 8(5), 1365–1372. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1683>

- Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R. C., & Lead, J. R. (2012). Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science and Technology*, 46(13), 7011–7017. <https://doi.org/10.1021/es2038596>
- ThermoFisher. (2020). *Introduction to Cell Culture*. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html#:~:text=Cell culture refers to the,in a favorable artificial environment.&text=At this stage%2C the cells,more room for continued growth.>
- Vinković Vrček, I. (2016). Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. *Environmental Toxicology*, 31(6)(June), 679–692. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Wang, J., Che, B., Zhang, L. W., Dong, G., Luo, Q., & Xin, L. (2017). Comparative genotoxicity of silver nanoparticles in human liver HepG2 and lung epithelial A549 cells. *Journal of Applied Toxicology*, 37(4), 495–501. <https://doi.org/10.1002/jat.3385>
- Wang, M., Yang, Q., Long, J., Ding, Y., Zou, X., Liao, G., & Cao, Y. (2018). A comparative study of toxicity of TiO<sub>2</sub>, ZnO, and Ag nanoparticles to human aortic smooth-muscle cells. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 8037–8049. <https://doi.org/10.2147/IJN.S188175>
- Wiemann, M., Vennemann, A., Sauer, U. G., Wiench, K., Ma-Hock, L., & Landsiedel, R. (2016). An in vitro alveolar macrophage assay for predicting the short-term inhalation toxicity of nanomaterials. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0164-2>
- Xia, T., Kovichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., & Nel, A. E. (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters*, 6(8), 1794–1807.

<https://doi.org/10.1021/nl061025k>

Xu, F., Pielt, C., Farkas, S., Qazzaz, M., & Syed, N. I. (2013). Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. *Molecular Brain*, 6(1), 1–15.  
<https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-29>

ZenBio. (2017). *Primary Cell Culture: the game has changed*. [https://www.zen-bio.com/pdf/PrimaryCells\\_whitepaper\\_ZenBio.pdf](https://www.zen-bio.com/pdf/PrimaryCells_whitepaper_ZenBio.pdf)

Zhang, H., Wang, X., Wang, M., Li, L., Chang, C. H., Ji, Z., Xia, T., & Nel, A. E. (2015). Mammalian Cells Exhibit a Range of Sensitivities to Silver Nanoparticles that are Partially Explicable by Variations in Antioxidant Defense and Metallothionein Expression. *Small*, 11(31), 3797–3805.  
<https://doi.org/10.1002/smll.201500251>

Zhang, X. F., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: An in vitro model. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms17101603>