

LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA: MECANISMOS DE ENTRADA, TOXICIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO*

Elda María del Rocío Coutiño^{1,2}, Lucerito Ávila Lagunes³, Omar Arroyo Helguera¹

¹Instituto de Salud Pública Universidad Veracruzana, Ave. Luis Castelazo S/N CP 91190; ²Facultad de Biología, Lomas del Estadio S/N Universidad Veracruzana; ³SESSVER Unidad Inteligencia Epidemiológica Calle Ernesto Medina 3 CP 91120. Xalapa, Veracruz México, Correo E: ecoutino@uv.mx; coutinoe@gmail.com

RESUMEN

En las últimas décadas, el estudio y la aplicación de los coloides y las nanopartículas (NPs) se ha extendido notablemente en la industria y particularmente en la medicina, desarrollando la era de la nanotecnología, con gran relevancia por su biodisponibilidad y sus efectos microbianos. Sin embargo, las propiedades inherentes de las NPs, especialmente las hechas a partir de metales como la plata (AgNPs), tienen implicaciones en la salud de las poblaciones, lo cual se evidencia al analizarlas desde la perspectiva de sus características, entre ellas, el tamaño, vías de exposición, mecanismos de entrada y principalmente, sus afectaciones en el transporte de electrones debido a su afinidad con la ubiquinona, así como en la inducción del estrés oxidativo y sus efectos tóxicos (necróticos y apoptóticos) e inmunotóxicos. Especialmente, analizando por una parte el papel del blanco principal de las AgNPs, la ubiquinona, en la inducción en los marcadores del estrés oxidativo, como la hemo-oxigenasa 1 y los 8 isoprostanos, moléculas involucradas con casi todas las enfermedades crónico-degenerativas, y por otra el papel reductor de los iones sobre las uniones disulfuro y la desestabilización de las proteínas.

ABSTRACT

In the last few decades, the study and application of colloids and nanoparticles (NPs) has spread notably in industry and particularly in medicine, developing the era of nanotechnology, with great relevance for its bioavailability and microbial effects. However, the inherent properties of NPs, especially those made from metals such as silver (AgNPs), have implications for the health of populations, which is evidenced when analyzing them from the perspective of their characteristics, among them, the Size, pathways of exposure, mechanisms of entry and, mainly, their effects on electron transport due to its affinity with ubiquinone, as well as the induction of oxidative stress, and its toxic effects (necrotic and apoptotic) and immunotoxic. Particularly, analyzing on the one hand the role of the main target of AgNPs, ubiquinone, in inducing oxidative stress markers such as hemo-oxygenase 1 and 8 isoprostanes, molecules involved with almost all chronic-degenerative diseases, And on the other the role of reducing ions on disulfide bonds and the destabilization of proteins.

INTRODUCCIÓN

El auge de las nanopartículas (NPs) se debe a su tamaño, forma, estado de aglomeración, área y carga superficial, lo que les permite ser más solubles, así como tener una mejor difusión, distribución,

absorción y disponibilidad, registrándose un apogeo en sus usos, sobre todo en el caso de las nanopartículas de plata (AgNPs), a las que se ha atribuido muchos beneficios en la medicina enfocados, principalmente, en las enfermedades infecciosas y en el diagnóstico y tratamiento del cáncer (1, 2).

PALABRAS CLAVE:

Nanopartículas de plata, ubiquinona, estrés oxidativo, toxicidad, hemo-oxigenasa 1 y 8 isoprostanos.

KEY WORDS:

Silver nanoparticles, ubiquinone, oxidative stress, toxicity, hemo-oxygenase 1 and 8 isoprostanes.

Las AgNPs son partículas microscópicas suspendidas en líquido, a través de un estímulo eléctrico positivo, o bien, de forma pura la plata se encuentra suspendida en agua desionizada; su tamaño oscila entre 1 nm y 100 nm aproximadamente. En este proceso, la plata (Ag) generalmente queda con carga positiva iónica (Ag^+). Actualmente, se utiliza numerosos compuestos para estabilizar la carga y el tamaño de las AgNPs, de los cuales dependerá su actividad y toxicidad (3-7).

Los coloides de plata (Pc) están comprendidos dentro de las AgNPs y son partículas pequeñas suspendidas en un líquido, sin perder sus propiedades individuales. Las presentaciones de los Pc abarcan partículas de 15 átomos o menos de plata pura, (NPs) extremadamente pequeñas, ionizadas con carga eléctrica positiva y estabilizadas a base de proteínas como la albúmina o la gelatina vegetal en la Pc comercial utilizada como desinfectante por su gran actividad antimicrobiana. Sin embargo, en calidad de coloide se ha propuesto que puede comportarse como un antígeno xenobiótico y disruptor hormonal alterando los mecanismos de defensa y hormonales; por lo tanto, representa un riesgo para la salud, además de los efectos inmunotóxicos y genotóxicos que tenga (8). Estos efectos tóxicos dependen no solo de las propiedades inherentes de las AgNPs, sino que están asociados con las vías de exposición, así como con los mecanismos de absorción, transporte, distribución y entrada en las células.

Efectos antimicrobianos de las AgNPs

El auge en el uso de las AgNPs se debe a su potente actividad microbicida y a las ventajas conferidas a ellas tanto por su tamaño como por su facilidad para entrar a las células, transitar a través de vasos sanguíneos, traspasar la barrera hematoencefálica y alcanzar sitios donde los compuestos convencionales no llegan. Sin embargo, esta particularidad debe ser manejada con cuidado debido a los posibles efectos tóxicos que conlleva y que se analizará a lo largo del trabajo.

El uso de la Pc comercial en México se popularizó a partir de los noventas, por su fuerte actividad antimicrobiana y desinfectante (5). Existen varias presentaciones comerciales (Biopur, Mycrodyn, Silverdin, Cromin, entre otras) no obstante, la actividad microbicida se limita al grado de contaminación en las muestras. Trabajos anteriores realizados en 2004 demostraron que el solo lavado previo de las lechugas reduce el número de bacterias de igual manera que al emplear Pc en cualquier presentación en muestras no lavadas. La efectividad en la reducción bacteriana aumentó en

muestras previamente lavadas (9), por lo tanto, su uso debe evaluarse en función del costo-beneficio por sus repercusiones en la salud.

Las AgNPs tienen un gran efecto microbicida en bacterias Gram negativas y positivas, e incluso inhiben la etapa de fusión del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en la célula y con ello evitan la infección en los cultivos celulares (5, 10, 11).

Mecanismos antimicrobianos y tóxicos de las AgNPs

La acción microbicida y el resultado tóxico de las nanopartículas de plata se deben a su actuación como metal, ion o NPs (7). Su efecto antimicrobiano se relaciona con varios procesos biológicos, entre ellos, la generación de especies de oxígeno reactivas (EROS) y la inducción de estrés oxidativo (EO), por el desacoplamiento del transporte de electrones y la desactivación de enzimas, particularmente a causa de la desnaturalización de los enlaces disulfuro de las proteínas bacterianas, que conduce a la muerte celular (5, 12-16).

En las bacterias, como en las células eucariotas, el blanco principal para su toxicidad es la alteración de la pared celular y de la membrana celular bacteriana, inhibiendo los procesos de respiración e interactuando con el azufre que contiene la membrana bacteriana y con los grupos fosfatos del DNA. Así, se impide la replicación y se inactiva la enzima fosfo-manosa isomerasa encargada de catalizar la conversión de manosa-6-fosfato a fructuosa-6-fosfato, intermediario de la glucólisis, por una vía común en bacterias para llevar a cabo el catabolismo de azúcar (17-19).

No obstante, el mecanismo detonante de la toxicidad en las bacterias se debe a su interferencia con la ubiquinona o coenzima Q que en la mitocondria participa en el proceso respiratorio (20). La coenzima Q en las membranas, tiene una función antioxidante, de forma directa, contra la formación de lipoperóxidos o de manera indirecta, a través del reciclado de otros antioxidantes lipídicos como la vitamina D. La consecuencia del efecto de la Ag^+ sobre la ubiquinona es el desacoplamiento del transporte iónico de sodio y potasio entre otros, de ahí su gran toxicidad y afectación, principalmente en el nivel del sistema nervioso.

No es fortuito que la toxicidad, en la mayoría de los modelos celulares de las eucariotas, esté relacionada con los efectos y la toxicidad en la mitocondria, a causa del posible origen endosimbiótico de este organelo a partir de bacterias.

En la mitocondria ocurre el transporte de electrones y es el sitio donde se generan las EROS y

el EO durante la respiración oxidativa. Asimismo, se transfieren cuatro electrones que originan productos naturales como oxígeno, agua y ATP. Con la participación de las flavoproteínas, se capta dos electrones y dos protones (H^+), los citocromos transfieren un electrón, la ubiquinona transfiere tanto dos electrones como dos protones y una proteína hierro-azufre transfiere un electrón, evento acoplado con la succinato deshidrogenasa del ciclo de Krebs ligada a la membrana externa de la mitocondria, capaz de transferir un electrón a la ubiquinona -aquí se puede desacoplar el transporte de electrones por parte de la Ag^+ - y ésta, de transferir dos electrones al ubiquinol y a la citocromo c reductasa.

Si en la cadena de electrones solo se transfiere un electrón, se forman EROS como el ion superóxido que, con la superóxido dismutasa, produce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ion hidroxilo, generando el EO asociado con los efectos citotóxicos acoplados de las AgNPs.

- La plata inhibe la actividad de la ubiquinona-10, reguladora del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y también de la bomba sodio-potasio en membranas celulares.
- Particularmente, pertenece al Complejo I la NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidoreductasa, que capta dos electrones del NADH y los transfiere a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q). El producto reducido, que se conoce con el nombre de ubiquinol (QH_2), se puede difundir libremente por la membrana. Al mismo tiempo, el Complejo I traslada cuatro protones a través de la membrana, produciendo un gradiente de protones.
- La toxicidad de las AgNPs se asocia con el estrés oxidativo (20).

Toxicidad de las AgNPs en los organismos

El efecto tóxico de las AgNPs se ha demostrado en diversos modelos de estudio (*in vitro* e *in vivo*), más complejos y en organismos completos (1, 21-25). La toxicidad está vinculada con las vías de exposición, absorción, transporte, distribución y acumulación en los organismos, así como con los mecanismos de entrada en el nivel celular.

Vías de exposición, de absorción y mecanismos de entrada celulares

A pesar de que se ha estudiado los efectos tóxicos de las AgNPs en los organismos, se desconoce los mecanismos precisos de su entrada, el lugar

exacto de bioacumulación, su metabolismo celular y la manera en que el cuerpo los elimina. En este sentido, estudios efectuados en ratones y ratas han demostrado que las AgNPs, independientemente de la vía de exposición y absorción -inhalada, dérmica u oral-, logran entrar a la circulación sanguínea, acumularse en macrófagos y distribuirse sistémicamente llegando a diversos órganos y afectándolos. Dañan principalmente el hígado, riñón, corazón y bazo e incluso el cerebro y la piel (25). La afectación depende de la vía de exposición.

En humanos, la exposición a las AgNPs tiene lugar primordialmente por medio de los alimentos, del aire y del contacto por la piel (Fig. 1). Estas formas, asociadas con las correspondientes vías de absorción, -respiratoria, oral, y dérmica- son las más relevantes, aunque otras están aumentando en importancia, por ejemplo, a través del tracto genital femenino, debido a la incorporación de AgNPs, en la higiene materna, etcétera (1, 26-28).

Los efectos tóxicos causados por las distintas exposiciones dependen de la vía de absorción.

Vía respiratoria

Los efectos más sobresalientes se dan por la vía de exposición inhalatoria y la absorción pulmonar. La inhalación de partículas ultrafinas, como las AgNPs, provenientes de procesos industriales, aerosoles entre otros, está relacionada con efectos pulmonares y cardiovasculares severos, incremento del pulso cardiaco, disminución en la oxigenación capilar, silbidos al respirar, estornudos frecuentes, falta de aire, flujo nasal, dolor de garganta, presión en el pecho y hasta procesos inflamatorios crónicos severos como efisema (29).

Tras la inhalación, las AgNPs se depositan en la cavidad nasal, la región alveolar y los ganglios linfáticos de los pulmones, generando una respuesta inflamatoria, de modo que la fagocitosis de estas partículas conduce a la activación de macrófagos alveolares y a la liberación de quimiocinas, citoquinas, EROS entre otros mediadores de inflamación (31). La eliminación de las AgNPs o de cualquier NP por la vía pulmonar se hace, generalmente, a través del sistema mucociliar y del sistema linfático, pero también a partir de la disolución de las NPs para incorporarse al torrente sanguíneo y por la vía sistémica. Pueden, de igual modo, terminar en el tracto digestivo y se sigue los mecanismos de distribución y eliminación propios de la vía oral.

Por tanto, después de la inhalación de AgNPs además de que se acumulan en pulmón pueden liberarse y pasar a la vía sistémica y localizarse en otros órganos como riñones, páncreas, corazón,

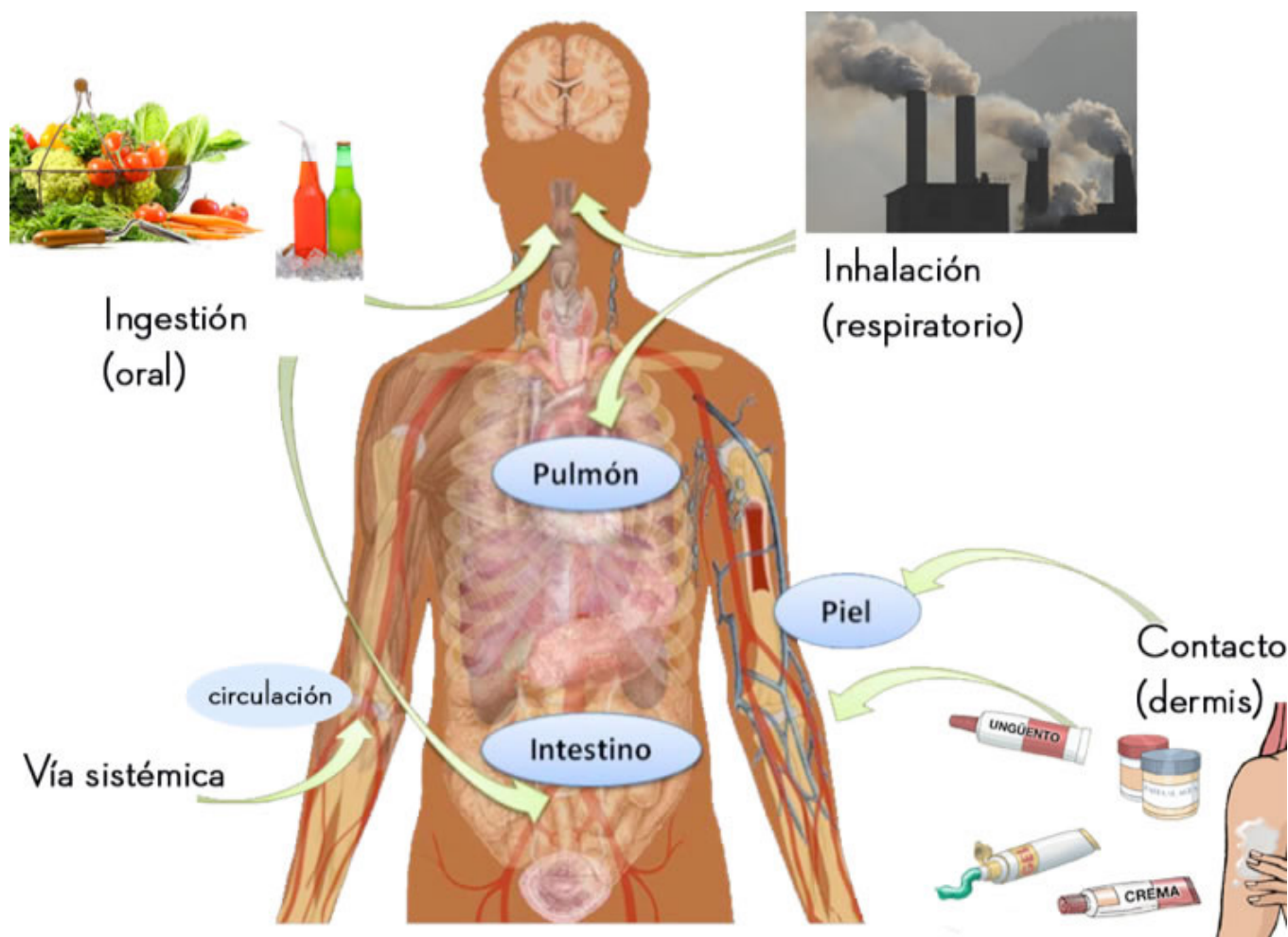


Figura 1. Principales vías de exposición y absorción de AgNPs. Elaborado a partir de la referencia (1).

bulbo olfatorio y cerebro participando en procesos inflamatorios y cáncer (29-31).

Vía oral

La ingestión de NPs, entre ellas las AgNPs, está relacionada con daños severos en el tracto gastrointestinal como las úlceras intestinales, además de argiria y afectación al hígado y al riñón. Posiblemente, el pH del estómago favorezca su incorporación al torrente sanguíneo así, pasan a la vía sistémica y se distribuyen en todos los órganos.

La absorción en el nivel gastrointestinal genera dolor abdominal y efectos renales notorios en el aspecto bioquímico, como disminución de la creatinina y el incremento en la excreción de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa en orina, en tanto que en la sangre aumenta la hemoglobina y se reducen las células rojas. En el nivel ocular, causa granulares en la conjuntiva y en la córnea, además de argiosis que provoca baja en la visión nocturna.

Asimismo, la absorción por la vía oral se asocia con la acumulación de granos de plata en la piel que ocasionan argiria y argiosis en riñones, cerebro, pulmones y testículos (20, 25, 32) y causan severos daños en el hígado al acumularse en macrófagos del sistema reticuloendotelial y en los queratocitos de la piel, principales responsables de eliminar las AgNPs.

Vía dérmica

La vía de exposición dérmica es muy controvertida ya que, a pesar de que el estrato de la capa córnea de la epidermis es una barrera muy fuerte que le confiere una limitada penetración de partículas, los productos textiles y apósitos que contienen derivados de AgNPs permiten que entren en contacto directo con la piel y se ha visto, tras la exposición a ellos, la producción de argiria.

Existen evidencias de su penetración transdermal a través de la piel intacta además, la fagocitosis

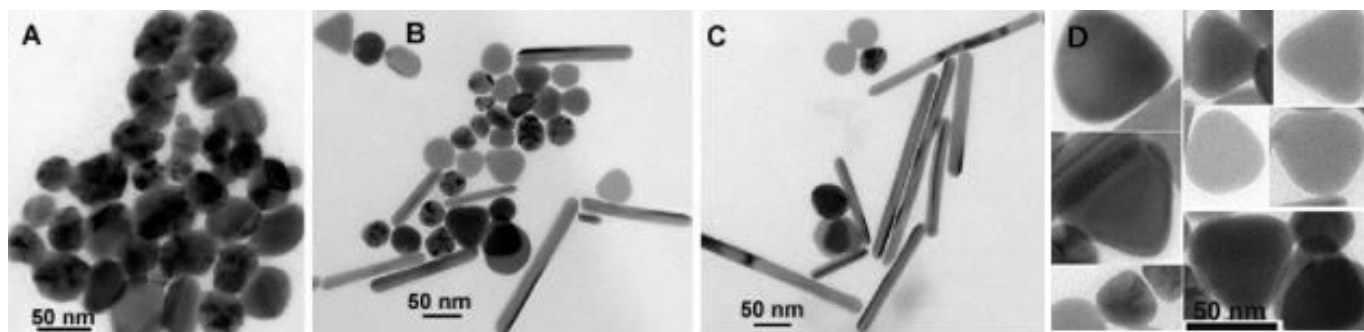


Figura 2. Diferentes formas de las AgNPs de imágenes de microscopía electrónica de transmisión y de energía filtrada (TEM) y (FETEM). (A) Nanopartículas esféricas sintetizadas por reducción del citrato. (B) Nanopartículas de diferentes formas. (C) nanopartículas purificadas en forma de barilla D) Partículas truncadas purificadas tomada de la referencia (40).

de las NPs por los queratinocitos desencadena una respuesta inflamatoria (33) Igualmente, se ha observado un aumento de las enzimas hepáticas que sugiere daño al hígado por el tratamiento, lo que pone en evidencia que también mediante la vía dérmica se alcanza la vía sistémica (34), aunque aún no está del todo claro cómo atraviesan las AgNPs el estrato córneo y llegan a la circulación sistémica.

Por otro lado, se ha detectado, por efecto de las AgNPs, alteraciones en las células somáticas del testículo (espermatogénesis), causando toxicidad en células madre de la línea germinal *in vitro*, lo que conduce a la esterilidad (21, 35). De la misma forma, inducen el desarrollo de tumores y afectan la respuesta inmune, de tal manera que la exposición dérmica está más asociada con alergias y dermatitis.

Otros efectos reportados en estudios selectivos y específicos realizados con las células endoteliales, han demostrado que las AgNPs actúan de dos formas: a bajas concentraciones actúan como factores anti proliferativos/vasoconstricción, es decir perjudican la producción de óxido nítrico (NO), y a altas concentraciones estimulan la proliferación/vasorrelajación mediada por la producción del NO, lo que indica que de acuerdo a la concentración será el efecto tóxico, así como el tener otros efectos fisicoquímicos (36).

Independientemente de la vía de exposición, los compuestos de plata como las AgNPs y los Pc alcanzan la circulación sanguínea y se distribuyen sistémicamente, por tanto, los efectos son prácticamente los mismos o semejantes a los reportados para cualquiera de las vías -inhalatoria, oral o dérmica- los cuales dependerán de la concentración, tiempo de exposición y de otros factores inherentes a las AgNPs, siendo el hígado el órgano blanco más afectado (1).

Factores intrínsecos de las AgNPs involucrados en la toxicidad

Los efectos tóxicos de la exposición a las AgNPs se deben a su tamaño, ya que esto ayuda a la distribución celular y a la penetración dermal e intestinal.

Las formas más tóxicas se han observado con las AgNPs más pequeñas y con el aumento de la superficie específica. El tamaño y la superficie específica están relacionados estrechamente. Al disminuir el primero, la segunda incrementa dejando un mayor número de átomos expuestos superficialmente que estarán disponibles para las reacciones redox, reacciones fotoquímicas, interacciones fisicoquímicas con las células y para fomentar la aglomeración o la liberación del material, como cuando se liberan los iones de plata (Ag^+) que son potencialmente las formas más tóxicas (1, 37, 38) Por lo tanto, los efectos tóxicos de las AgNPs, en bacterias y microorganismos, dependerán de la forma iónica o metálica y del tamaño o los aglomerados formados (1, 7, 39).

Algunos reportes demuestran que el área superficial de las NPs influye en la producción de EROS pues, a la misma concentración, las AgNPs de 15 nm produjeron mayores niveles de EROS en macrófagos que las de 50 nm (39).

Otro factor implicado en la toxicidad es la forma de las AgNPs (Fig 2), las de triángulo truncado son las más tóxicas que las de las formas esféricas y alargadas, en este aspecto el contenido de caras parece participar (40). Posiblemente, las truncadas activen varios mecanismos de señalización porque interactúan con varios receptores, mientras que las esféricas entran por pinocitosis disminuyendo el efecto.

La estabilidad de las AgNPs también influye en la toxicidad. Éstas tienden naturalmente a formar aglomerados y agregados que pueden tener menor

área superficial y, por tanto, ser menos tóxicos (1, 41).

Del mismo modo, la carga superficial de las AgNPs es otro factor en la toxicidad. Las estabilizadas por medio de citrato, con cargas negativas, son menos tóxicas que las AgNPs con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilamina ramificada; igualmente, aquellas estabilizadas que no presentan carga son aún menos tóxicas.

Finalmente, las propiedades toxicológicas propias y específicas de las AgNPs también se afectan por otros factores inherentes a éstas o a los fluidos biológicos, como su solubilidad, pH y concentración de sales. Al disolverse, pierden dichas propiedades, pues disueltas y libres siguen consideraciones toxicológicas semejantes a otros contaminantes, como los fármacos o xenobióticos, con efectos sistémicos. No obstante, la liberación de Ag^+ a partir de AgNPs aún es difícil de interpretar y más aún la toxicidad, ya que no está del todo claro si ésta se debe a la forma de AgNP o a los Ag^+ , y no se conoce mucho sobre su liberación ni sobre el paso de Ag^+ a metálica Ag^0 por efectos oxidorreductores, como cambios en el pH que favorezcan su absorción, distribución, bioacumulación, neutralización o eliminación.

Efectos citotóxicos en modelos eucariotes

Los daños van desde cambios en la viabilidad celular hasta toxicidad celular de tipo necrótico y apoptótico, genotoxicidad, inmunotoxicidad, entre otros. La toxicidad de las AgNPs, en los distintos modelos eucariotes experimentales *in vitro* e *in vivo*, es muy semejante a la encontrada en las bacterias, lo que depende del diámetro y tamaño de las NPs, estabilización, carga iónica y concentración, asociados con su solubilidad y con los mecanismos de entrada (5, 12, 21, 39, 44-51).

Los mecanismos de entrada en las células eucariotas

Si consideramos la célula como la unidad principal de la vida que realiza los procesos biológicos de cualquier ser vivo, las NPs como las AgNPs podrían seguir los mismos mecanismos que las vías inhalatoria, oral y dérmica de los organismos.

La vía oral en el nivel celular correspondería a la endocitosis y la pinocitosis, donde las vesículas alcanzan los lisosomas que actúan de forma semejante al sistema digestivo. La difusión pasiva sería la vía inhalatoria, que concerniría a la respiratoria, y por este medio se llegaría a la mitocondria, donde se llevan a cabo los procesos respiratorios celulares. La vía dérmica en los organismos, es un

mecanismo poco claro y en la célula no se puede hablar como tal, no hay información acerca de que en la célula ocurra un proceso semejante, no obstante, la entrada de manera inespecífica por difusión pasiva por toda la membrana plasmática semejante a la absorción por piel y, en todos los casos, alcanzarían al sistema de endomembranas internas, que correspondería a la vía sistémica, encargada de distribuir y transportar las partículas o NPs a los distintos organelos membranosos y eventualmente arribar al núcleo.

Sin embargo, los factores implicados en los mecanismos de entrada de las NPs no son exclusivos de éstas, sino que son aplicables a todos los compuestos químicos. Así, dependiendo de la carga, tamaño, carga superficial, presión atmosférica, solubilidad, superficie específica y su aglomeración o agregación con material orgánico, o bien, con proteínas transportadoras, será su mecanismo de entrada en los organismos e internalización en el nivel celular y, por lo tanto, sus efectos, que también dependerán de la concentración, el tiempo de exposición, la afinidad a las células, el estado de la célula y el momento en que éstas se encuentran, es decir, la fase del ciclo celular.

Aquí, sin duda, cualquiera de los mecanismos propuestos de entrada de las AgNPs involucra a la membrana, uno de los más importantes es la difusión, que ocurre con las NPs más pequeñas y los iones metálicos sin carga, y el efecto dependerá de la concentración. Las partículas se distribuirán por todo el sistema de endomembranas, alcanzando las mitocondrias, los lisosomas y eventualmente el núcleo. Tales organelos celulares son, precisamente, los que acumulan más NPs y por lo tanto, éstas resultan más tóxicas, debido al EO producido principalmente por el daño a la mitocondria, responsable del estrés oxidativo de la citotoxicidad apoptótica (22, 23, 29, 39, 42, 43).

Por otra parte, el rango de escala de 1-100 nm es muy importante para las interfaces biológicas, ya que objetos menores de 12 nm de diámetro pueden atravesar la barrera hematoencefálica, objetos menores de 30 nm pueden entrar por endocitosis y los de ambos rangos lo hacen por pinocitosis (24). Además, también las NPs o moléculas más grandes y a concentraciones más altas entrarían por este mecanismo y lo mismo sucede si presentan afinidad con receptores, debido a la endocitosis mediada por receptores, es decir, por vesículas pinocíticas y endocíticas, que eventualmente alcanzan los lisosomas responsables de la lisis celular o muerte necrótica.

Se ha documentado suficientemente la citotoxicidad apoptótica y necrótica por efecto de las AgNPs, lo que sugiere que tanto las mitocondrias

como los lisosomas se ven afectados sugiriendo que el tamaño, no es homogéneo o bien, depende de la concentración.

Finalmente, otro mecanismo de entrada, para el caso de la forma libre o iónica de la plata, son los canales o bombas, desacoplando y afectando tanto el transporte de electrones como la conductividad eléctrica; por ello, la alta toxicidad de Ag^+ se daría por la liberación de éstos de las AgNPs. Existe aún controversia acerca de si las AgNPs o la Ag^+ son responsables de los efectos citotóxicos; sin embargo, esto depende de la liberación de los iones y se asocia quizás con los microambientes celulares. Algunos autores proponen que la toxicidad es la misma para ambas formas, pero otros han demostrado que la forma iónica es la más tóxica (44).

Efectos tóxicos y mecanismo de toxicidad de las AgNPs

Membrana celular

El blanco principal e inicial para desencadenar un efecto tóxico, por cualquier compuesto incluyendo las AgNPs, son las membranas celulares y el daño depende de los factores intrínsecos de éstas como el tamaño, (1, 37, 45, 46), siendo las partículas más pequeñas de las AgNPs las formas más activas que causan el daño celular más severo, al igual que la forma iónica de la Ag, debido a que presentan una mayor difusión, disponibilidad y distribución, favorecidas por su solubilidad y afinidad a proteínas, entre ellas la albúmina, las metalotioneínas y las metaloproteasas (1, 24, 47-49), encargadas del transporte e inactivación de los metales y los iones (Fig. 3), difundiéndolos por la vía sistémica a los órganos y en el nivel celular, a través del sistema de endomembranas.

Estudios realizados (50, 51) en células de riñón PC-12, tratadas con NPs de manganeso, detectaron un encogimiento e irregularidades en los bordes de las membranas celulares, así como una disminución en la actividad mitocondrial, dependiente de la concentración, además de la depleción de la dopamina. Mientras tanto, en otros estudios se demuestra que las AgNPs trastornan los esenciales procesos de señalización celular; entre los daños se incluye alteraciones en la viabilidad celular y muerte de la célula, siendo las NPs de 40 a 50 nm las más dañinas (52).

En células epiteliales de retina porcina expuestas a AgNPs, se detectó la inducción de la permeabilidad celular por la activación de la vía de las MAPS cinasas, así como la inhibición del factor

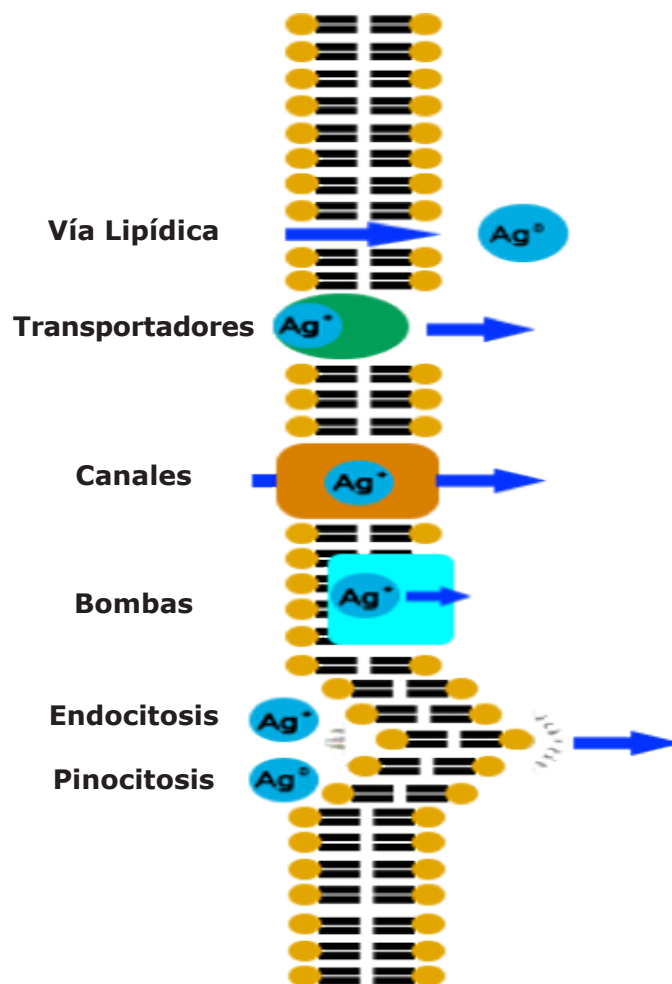


Figura 3. Esquema de los mecanismos de entrada de los metales como la plata, por la vía lipídica directa o por proteínas (transportadores, canales, bombas, endocitosis mediada por receptor), va a depender de la carga, tamaño y la concentración. Generalmente los metales se unen a proteínas de bajo y alto peso molecular así como a las metalotioninas y metaloproteasas y actuar como haptenos e inducir respuesta inmune o disminuir su toxicidad, y dentro de las células se acumulan en lisosomas o gránulos y se exocitan, y también actúan como factores de transcripción y como iones alteran las vías de transporte de electrones de todo el sistema de endomembranas (retículo endoplásmico liso, mitocondria, lisosomas, núcleo), principalmente por su afinidad y afectación de la ubiquinona o CoQ, prostaglandina, posiblemente al sistema NADPH oxidoreductasa y, que conduce a estrés oxidativo.

de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la interleucina 1 involucrada en procesos inflamatorios (53). También, en fibroblastos de pulmón y células de glioblastoma humanas, las AgNPs, con un tamaño de 6-20 nm, se localizaron dentro de la mitocondria y el núcleo; esto implica su participación directa en la toxicidad mitocondrial, lo que

ocasiona la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial y de la síntesis de ATP. En este caso, las células cancerígenas de glioblastoma cesaron su proliferación, en cambio, las células de pulmón se recuperaron (22, 23).

En el cultivo de células neuronales y astrocitos, con AgNPs de un tamaño de 20-40 nm y concentraciones de 5-100 µg/mL, la morfología de estas últimas células se altera a bajas concentraciones, mientras que las neuronas se afectan a altas concentraciones, con un incremento de EROS y de calcio, alterando la transducción de señales neuronales mediadas por éste; además, se encontró que las NPs más tóxicas fueron las pequeñas (54).

Mitocondria y estrés oxidativo

La mitocondria es la diana que desencadena la toxicidad de las AgNPs, que participan en la producción de EROS y de EO, el cual provoca cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, centro importante de señalización para la muerte celular por apoptosis, ya que se induce la liberación del citocromo c al citosol. Éste provoca la inducción de la caspasa-9 y la caspasa-3 activando la vía intrínseca del proceso de apoptosis (55) mecanismo regulado por muchas vías de señalización, entre ellas la c-Jun quinasa, perteneciente a la familia de las quinasas (JNK), activada por mitógenos; por ello, las AgNPs también tienen actividad proliferativa. Sin embargo, las JNK quinasas poseen una función proapoptótica en respuesta al estrés oxidativo celular, (56) y están implicadas en enfermedades asociadas a éste. Probablemente, la producción de EROS mantiene activada la JNK (55), ya que además el EO induce TNF α , que causa la activación de JNK y la muerte, debido igualmente a la inhibición de las MAP quinasas fosfatasa (57).

De tal manera, la disrupción de la cadena respiratoria mitocondrial por parte de las AgNPs, la producción de EROS y la interrupción de ATP están relacionadas con el daño provocado al DNA y la generación de genotoxicidad, (23) eventos muy estudiados en varios modelos (20, 29, 38, 43, 58).

La mitocondria es, por tanto, el organelo que produce mayor generación de EROS y EO le siguen el retículo endoplásmico liso y la membrana plasmática, donde precisamente se localizan la ubiquinona o CoQ, el citocromo c y el receptor de prostaglandina, principales blancos propuestos para los compuestos y derivados de plata como las AgNPs. Quizás el poder reductor de la Ag y otros metales participe en la oxidación de lípidos esenciales en las membranas, desencadenando el EO en cascada.

Se ha detectado el efecto de las AgNPs en la inducción de EO en varios modelos experimentales, como el cultivo de células mononucleares o linfocitos, a través del incremento de los marcadores de EO como el malonil-dialdehído (MDA), marcador de la lipoperoxidación (LPO), e hidroperóxidos, así como el 8 isoprostano (8 iso-p), marcador de la oxidación del ácido araquidónico, particularmente a baja concentración de 0.036 µg/mL y tiempos de exposición (30 min) a plata coloidal, marcadores asociados con la disminución en la viabilidad celular (16, 59), implicando un efecto inicial en el nivel de la membrana plasmática.

Por tanto, la exposición continua a los coloides y a las NPs de Ag representa un serio problema de salud pública, ya que generan EO y es bien conocido que éste está asociado con el desarrollo de las enfermedades crónico-degenerativas no infecciosas, posicionadas dentro de las primeras 10 causas de mortalidad y morbilidad tanto en la población mexicana como en la mundial, entre ellas, las neurodegenerativas, el Alzheimer y el Parkinson, (60) y además por los efectos tóxicos derivados del EO, como los genotóxicos, los inmunotóxicos y la desregulación hormonal, pues se ha propuesto que actúan como disruptores hormonales (61, 62).

Efectos genotóxicos de las AgNPs

Los efectos genotóxicos de las AgNPs en células humanas se deben a daños en el DNA (23, 29, 43, 52, 63, 64).

Estudios en fibroblastos de pulmón y células de glioblastoma humanas expuestas a AgNPs mostraron la inducción de aberraciones cromosómicas y la interrupción del ciclo celular en la fase G2 (23, 58).

También, después del tratamiento con AgNPs, se ha detectado que conllevan rupturas en el DNA y aberraciones cromosómicas; de igual forma, en células meristemáticas de cebolla y en el cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica, expuestos a diferentes concentraciones de Pc, se detectó que concentraciones bajas de 0.036-0.36 µgr/mL inducen el índice mitótico e incrementan el número de profases, es decir, promueven el paso de la fase G2 a mitosis y favorecen la condensación de la cromatina, detectándose la inducción de la proteína cinasa CDC2, encargada de este paso. En tanto, concentraciones mayores de 3.6 µgr/mL inhibieron el índice mitótico y la actividad de la CDC2; paralelamente, aumentó la actividad de la caspasa-3, (65) lo que indica un efecto de hormesis dual proliferativo y tóxico, posiblemente por efecto EO y EROS, a los que se atribuye la dualidad (2).

Por otra parte, se ha reportado que las AgNPs sobreexpresan P53; su activación está relacionada con daño al ADN y la inducción de Rad 51, responsable de la reparación del DNA y de la fosforilación de la H2AX inducidas por la ruptura de las cadenas de ADN, lo cual sugiere que las AgNPs son capaces de estimular daño al DNA pues se causa rupturas en el mismo y aberraciones cromosómicas (41, 58, 63, 66, 67).

En células nerviosas, se detectó un efecto citotóxico dual apoptótico y necrótico (20, 55, 58). Igualmente, en el cultivo de linfocitos, las AgNPs presentaron un efecto citotóxico de tipo necrótico a concentración dependiente y, a concentración mayor, se indujo apoptosis debido a la actividad de las caspasas-3; asimismo, en los linfocitos se causa aglomeraciones o aglutinaciones celulares, posiblemente por alteraciones en el nivel de la membrana celular o por una respuesta inmunológica (68).

El efecto dual apoptótico necrótico, resultado de las AgNPs, se ha observado en diversos modelos de estudio. Como ya se mencionó, sugiere cambios en la permeabilidad y el potencial no solo de la membrana mitocondrial, sino de los lisosomas, de tal manera que, dependiendo de su llegada a la mitocondria o al lisosoma, habrá un efecto apoptótico o necrótico, respectivamente, que conlleva un efecto inmunocitotóxico.

La Pc en sus presentaciones comerciales, expuesta en el cultivo primario de linfocitos, también indujo la actividad de la caspasa-3 y la sulfatasa ácida, enzimas marcadoras de los mecanismos de apoptosis y necrosis (65). Con respecto a la sulfatasa ácida se ha reportado que se encuentra involucrada, elevada en procesos inflamatorios como el asma y, a la baja, en procesos alérgicos.

Se considera que la necrosis participa activamente en procesos inflamatorios, mientras que la apoptosis, por ser un evento programado genéticamente, no desencadena respuesta inflamatoria, ya que forma parte de la homeostasis celular; sin embargo, trastornos en la regulación de la apoptosis por diferentes vías (intrínseca y extrínseca) están presentes en la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes degenerativas, de tal manera que ambos procesos necrótico-apoptóticos, también por este efecto, tienen implicaciones en la salud, pues repercuten en la defensa inmune y en la homeostasis celular.

Efectos inmunotóxicos

Se ha demostrado que las AgNPs tienen un efecto en la proliferación de linfocitos, macrófagos, etcétera, y en la respuesta inflamatoria, ya que inducen la

liberación de una serie de marcadores proinflamatorios asociados con el EO, principalmente el factor de necrosis tumoral (TNF), TNF α , además del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (69) y citosinas como las interleucinas, tanto en células madre mesentéricas viables (hMSCs), con la liberación de IL-1, IL-6, TNF- α , (70, 71) como en macrófagos J774 A1, con la liberación de IL-6 e IL-8/IL-11 (72), y en células mononucleares de sangre periférica, con IL-5, INF- γ y TNF- α (71). La IL5 participa en la diferenciación del linfocito B a célula plasmática esto es producción de anticuerpos y la IL1 en la inducción de las ligeras cadenas *kappa*. Se ha propuesto que, al igual que los metales, las NPs como las AgNPs son inmunotóxicas, todo ello principalmente asociado con el EO (8, 73-76).

Los efectos inmunotóxicos, genotóxicos y citotóxicos por la exposición a NPs como las AgNPs, a consecuencia del EO, inducen la síntesis de enzimas antioxidantes, como catalasa superóxido dismutasa, hemo-oxigenasa (HO-1) (54, 59, 77), etcétera. La HO-1 es inducida no solo por el EO, sino también por metales. El EO induce factores de transcripción como NF- κ B y NFR2, involucrados en la inmunotoxicidad y en la inducción de enzimas antioxidantes como HO-1 (78).

Inducción de enzimas antioxidantes ante el EO

Existe una inducción de enzimas antioxidantes ante el estrés oxidativo originado por las AgNPs (79). Estas partículas, en células de cerebro de ratón, producen oxidación de proteínas y lípidos, el aumento de la actividad de catalasa, así como la liberación excesiva de ácido glutámico y óxido nítrico. Por su tamaño, poseen mejor movilidad; esto les permite entrar al sistema nervioso central (SNC) atravesando la barrera hematoencefálica, lo cual puede deberse a la difusión pasiva o a la endocitosis mediada por un receptor. Incluso, estas partículas son absorbidas directamente en el cerebro por transporte trans-sináptico, o bien, simplemente compiten por los transportadores iónicos de sodio y potasio o con la bomba de H⁺ probablemente, las células microgliales (macrófagos en el cerebro) estén involucradas en el manejo de las AgNPs que llegan al SNC, pues se sabe que los macrófagos del sistema reticuloendotelial son los que más las acumulan, al igual que los queratocitos de la piel, y se cree están implicados en su eliminación (27, 48).

Además, el cerebro de las ratas es uno de los blancos más sensibles para EO por la exposición a AgNPs y por la inducción, en células neuronales, de las enzimas catalasa y hemo-oxigenasa 1 (HO-1) (54). Mientras tanto, en *Drosophila melanogaster* se indujo la proteína de choque térmico 70 (HSP 70) (66), detectando que presenta una alta similitud

en la secuenciación de aminoácidos a la proteína HO-1. También, en el cultivo de linfocitos *in vitro*, se demostró la inducción de la HO-1 por efecto de la plata coloidal (80).

La vida media biológica de las AgNPs en el SNC, quizás por su solubilidad en lípidos o su afinidad por tioles de las proteínas, es más larga que en otros órganos; por tanto, algunas funciones fisiológicas importantes, riesgos y consecuencias en el cerebro, como enfermedades neurodegenerativas, pueden deberse a la exposición prolongada a éstas, aun a bajas concentraciones.

La inducción de enzimas antioxidantes, al igual que los otros parámetros, está asociada con la carga y el tamaño de las NPs. Aquellas por debajo de los 20 nm, respecto a las de arriba de 40 nm, son más dañinas y severas; de igual forma, el efecto depende del tiempo de exposición y es más severo en los lapsos cortos, como lo demuestran los estudios en células neuronales *in vitro*, donde a los 3-6 minutos de exposición a AgNPs se presenta una respuesta fuerte de calcio (Ca^{2+}) intracelular, que altera los procesos de transducción de señales neuronales e induce la actividad de la HO-1.

Asimismo, en el cultivo de células mononucleares o linfocitos expuestos a Pc, se demostró un incremento de marcadores de EO como el MDA, hidroperóxidos y 8-iso-p, vinculados con la inducción de la HO-1 y la catalasa, a 30 minutos de exposición, mientras que a dos y 24 horas, hay un aumento no significativo pero consistente y sostenible de hidroperóxidos y MDA, así como en la concentración de proteínas (16, 80). Del mismo modo, hay una disminución de la HO-1 y la catalasa, relacionadas con la viabilidad celular; también se mostró una correlación negativa de la HO-1 en función del tiempo y de la concentración de Pc. Sin embargo, un dato muy importante es la correlación positiva de 0.9 entre los 8 iso-p y la actividad de la HO-1, lo que corrobora o apunta a un efecto inicial en el nivel de la membrana y, nuevamente, se debe focalizar la ubiquinona o la coenzima Q, derivados isoprénicos que generan estructuras cíclicas o no del tipo benzoquinonas, o prostanoïdes como la CoQ y la prostaglandina, y el propio NAD, respectivamente; ambos son blancos de los derivados o compuestos de plata.

Finalmente, la HO-1 es una enzima inducible por metales y por EO, la cual está asociada con una gran cantidad de enfermedades crónico degenerativas (78). Además, ésta se encuentra relacionada un 90% con los 8 iso-p, es decir EO, y dado el continuo contacto con xenobióticos como las AgNPs, que son metales, y sabiendo además de su efecto en la inducción de EO y HO-1, su exposición representa un problema serio de salud pública para el desarrollo de las mencionadas enfermedades.

Posible mecanismo de acción

El efecto tóxico de las AgNPs en bacterias y células se debe principalmente a la forma iónica y su afectación en el transporte de electrones y la interrupción de la cadena respiratoria, por su principal blanco, la ubiquinona o coenzima Q en las membranas de las bacterias, y de las mitocondrias de células eucariotas que junto con el receptor de prostaglandina localizado en las membranas, son derivados del metabolismo del ácido araquidónico, compuestos del tipo isoprénico o prostanoïde. Algunos derivados de la oxidación del araquidónico, entre ellos el 8 iso-p, son marcadores de EO. Sin embargo, es muy probable que 8 iso-p, a causa de su naturaleza polar, se difunda y por ello sea difícil encontrarlo dentro de la célula, ya que normalmente se ha ubicado en el plasma y la orina de fumadores, asmáticos y personas con insuficiencia renal; por tanto, se utiliza como marcador de estrés oxidativo (59).

Las membranas celulares son ricas en lípidos algunos derivados del ácido araquidónico. El efecto de la plata coloidal en la inducción de LPO, EROS y RL ocasiona que la célula pierda propiedades limitantes por cualesquiera que sean sus mecanismos propuestos de entrada de los metales y de las AgNPs (Figs. 3 y 4); por otra parte, la Ag o Ag^+ libres del coloide o el mismo coloide, como ya sabemos, no solo afectan a los derivados lipídicos como los de los isoprenos, sino también a las proteínas. Posee alta afinidad por los grupos tioles y las uniones disulfuro presentes en los receptores de membrana ricos en dominios de éstos. Otro caso sería el del receptor de prostaglandinas, uno de los blancos principales de los compuestos de plata. En las células eucariotas, al unirse específica o inespecíficamente a éste, dichas partículas podrían transportarse por la vía del sistema vesicular como la endocitosis mediada por receptor o por pinocitosis fluida, o bien, dependiendo de la carga y el tamaño, entrar libremente por difusión o a través de vesículas de caveolina; en el caso de la plata iónica, el proceso se haría por medio de transportadores iónicos, en el caso de las AgNPs, de acuerdo con el tamaño y la carga de las AgNPs, habrá un mecanismo de entrada y un efecto, como muchos autores sugieren, sin embargo las mismas propiedades que hacen únicas a las Ag NPs son las responsables de los efectos tóxicos, por la mayor superficie de contacto con los iones, pues se considera que el efecto tóxico se debe a la forma iónica por la liberación de los iones plata (1, 40, 49, 81).

En el nivel de las proteínas, entre ellas las de los receptores de membrana y nucleares, el efecto de las AgNPs primordialmente se debe a los cambios en la relación SH y S-S de proteínas de la membrana en cascada, que serían los responsables de modificar en

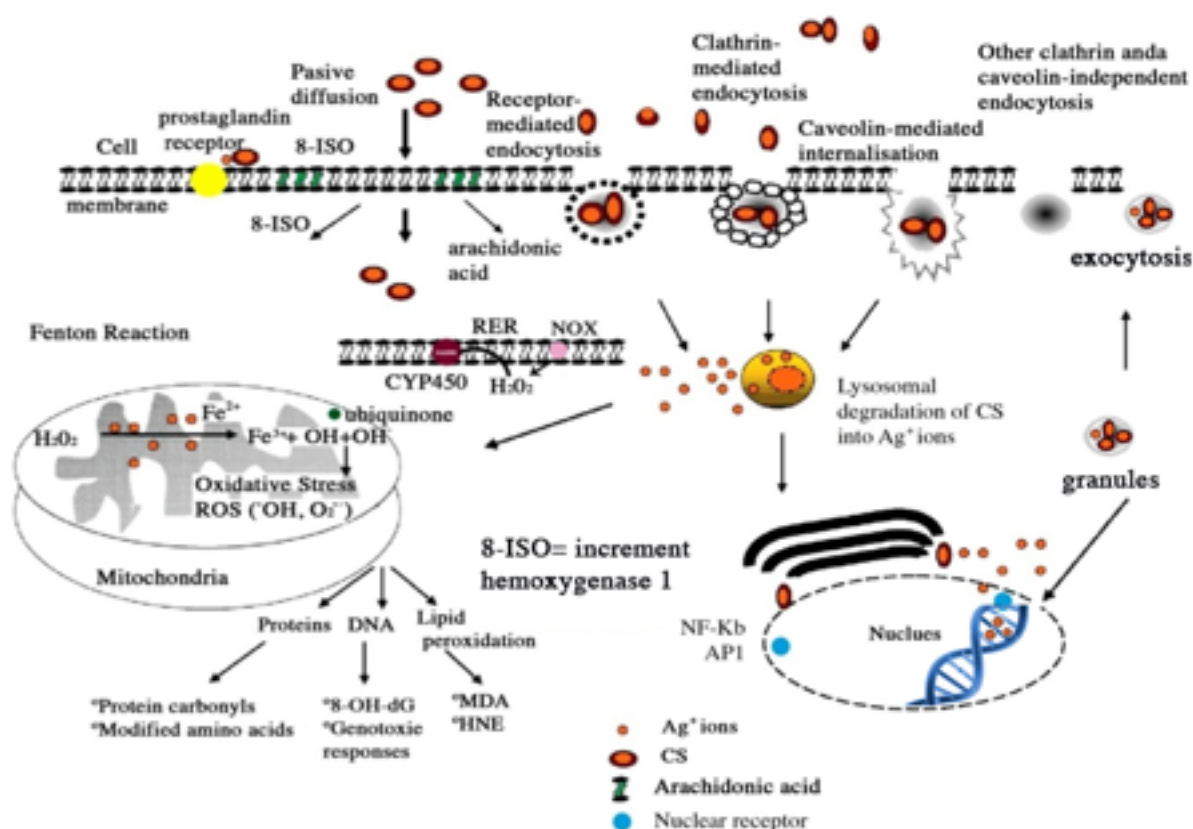


Figura 4. Esquema propuesto de los mecanismos de entrada de las AgNPs y sus posibles efectos. Entren por los mismos caminos que los metales, los efectos dependen de la carga, tamaño, la concentración, vía de entrada y van desde cambios en la permeabilidad de la membrana, de las vías de señalización, del transporte de electrones, de los marcadores de estrés oxidativo y de la expresión de genes, y alterando la homeostasis celular que conducen a citotoxicidad tipo necrosis o apoptosis.

Agradecimiento a Ana Gabriela Muñoz Coutiño por el apoyo en la edición de las figuras.

cascada otras proteínas o los lípidos con la energía liberada, por el efecto reductor que tiene el calcio sobre las uniones S-S. Quizás también pasaría con los metales como la plata, o bien, las AgNPs al despolarizar la membrana o interactuar con receptores acoplados con canales, induzcan la apertura de canales iónicos, entre ellos el calcio, altera la relación de SH y S-S, incrementan el aumento de los tioles libres provocando un aumento en la permeabilidad por la apertura de poros y desencadenando los mecanismos de señalización para la toxicidad, factor común para las NPs y muchos otros compuestos químicos liposolubles, como los disruptores hormonales persistentes, que comparten efectos similares (8, 82).

Los efectos del calcio en muchos procesos celulares han sido ampliamente estudiados. En tanto, la apertura de canales de calcio también ha sido documentada para todos aquellos compuestos con propiedades despolarizantes, lo que genera ciclos de movimientos internos de calcio que pueden conlle-

var desde cambios iniciales leves de la membrana, asociados con alteraciones en la permeabilidad de la misma y que inducen proliferación, hasta concentraciones internas altas que modifiquen el potencial de membrana de la mitocondria y del retículo endoplásmico. Ambos son reservorios de calcio y su liberación conduce a muerte celular y apoptosis o necrosis si involucra a la mitocondria o al lisosoma.

Uno de los efectos más conocidos de la exposición a la plata y sus compuestos es la generación de argiria y argiriosis. La primera es la acumulación de plata en la piel y la otra, en distintos órganos. La argiria se considera un proceso de eliminación o reducción del metal y se debe a la fuerte afinidad que tienen los metales, especialmente la plata, por los grupos sulfhídricos tioles de la cisteína presente en proteínas de interés de las células y también al poder reductor sobre las uniones disulfuro de las proteínas, de los iones divalentes como el calcio; si bien la plata no es un ion divalente, bajo ciertas condiciones se comporta como tal (5, 8).

Por su parte, una de las causas del efecto tóxico de las AgNPs sería el hecho de alterar la relación de SH y S-S de proteínas esenciales, principalmente de los receptores membranales y nucleares, generando reacciones en cadena que afectan los procesos de señalización; originan cambios en la permeabilidad de las membranas plasmáticas y de orgánulos como mitocondria, lisosomas y retículo endoplásmico hasta el núcleo, y, como consecuencia, producen un desarreglo estructural y el deterioro en los procesos bioquímicos del metabolismo, desestabilizando la homeostasis celular y la reproducción. Además, se trastorna la expresión genética, es decir, se induce la síntesis de algunas proteínas, entre ellas, las de defensa química (CYP450), las enzimas antioxidantes y la IgG, así como los inmunomoduladores; también hay alteraciones en los ácidos nucleicos (DNA y RNA) (8, 38, 43, 83), todo ello asociado con la producción en cascada de los radicales libres (RL), 97 los EROS y el EO, vinculados a su vez con la relación tioles-disulfuro (86) y con el metabolismo de los sulfatos.

De tal manera, los mecanismos de entrada a las células (Fig. 4) de las NPs como las AgNPs dependerán mucho del tamaño, forma, carga y concentración; sin embargo, los efectos serán básicamente en los sistemas de membranas.

El mecanismo de acción estribará en las formas de entrada:

1.- Por difusión pasiva, puede alterar el transporte de electrones modulado por los citocromos dependientes de enzimas NADH oxidoreductasas o NADH oxidasa (NOX), localizadas en sistemas de membranas del retículo endoplásmico o en las membranas plasmáticas, o la membrana interna de la mitocondria. Para entrar por transporte pasivo, las NPs deberán ser muy pequeñas y neutras, es decir, sin carga. Se difundirán rápidamente a lo largo del sistema de endomembranas, principalmente a la mitocondria, en el caso de la plata, alterando el transporte de electrones por su afinidad a la ubiquinona e induciendo tanto radicales libres como especies reactivas de oxígeno, lo que modifica el potencial y, con ello, la liberación de factores proapoptóticos y apoptóticos para conducir a la apoptosis. Igualmente, se puede despolarizar la membrana e inducir movimiento de calcio. El poder reductor de éste altera las dobles ligaduras de los ácidos grasos o proteínas, y las uniones disulfuro, modificando también la estructura de las proteínas.

2.- Si la NP tiene carga, afectará el transporte iónico desacoplando los canales y las bombas, como se ha descrito para los metales (Figs. 3 y 4) y que dependiendo de la carga, pueden ser de sodio, de potasio y de hidrógeno, o bien, de calcio de la membrana

plasmática, o el transporte de electrones de la mitocondria o de protones del lisosoma, modificando el potencial de membrana y, con ello, su funcionalidad, e induciendo también estrés oxidativo, así como muerte apoptótica o necrótica, entre otros tipos.

3.- Las NPs de mayor tamaño, dependiendo de su polaridad, entrarán por distintos tipos de vesículas:

- Si las NPs tienen afinidad por receptores, entrarán gracias a la endocitosis mediada por receptores, ingresaran por vesículas de clatrina donde eventualmente alcanzarán el lisosoma.
- Las NPs muy grandes y con cierta polaridad entrarán por pinocitosis fluida, por vesículas lisas e igualmente alcanzarán los lisosomas.
- En el caso de que la NP sea grande, sin carga y de naturaleza liposoluble que no entre por difusión, ingresará por vesículas de caveolina; así, por su naturaleza liposoluble, quizás alcance el lisosoma, la mitocondria y principalmente al núcleo como las moléculas liposolubles.

4.- Podrían acumularse en los lisosomas y formar gránulos que eventualmente fueran vertidos al núcleo o exocitados dependiendo quizás de la fase del ciclo celular en que ocurrió su internalización.


Ahora bien, en las membranas o dentro de las vesículas o los organelos se podrán liberar los iones de las NPs y desacoplar el transporte iónico de la membrana lisosomal, expulsando su contenido e induciendo necrosis, o el de la mitocondria, llevando a la apoptosis, o bien, en el núcleo causando daño en el nivel de los receptores nucleares y afectaciones en el DNA, con lo que se altera la expresión genética. También los iones unidos a proteínas actúan como factores de transcripción.

Por otro lado, el efecto en el transporte iónico induce estrés oxidativo y con ello la producción de peróxido de hidrógeno y de iones hidroxilo, los cuales son capaces de inducir factores de transcripción como el NFK β , AP1, Nrf2 y TNF α , involucrados en la expresión de genes relacionados con la defensa química y la defensa inmune, y asociados a su vez con los efectos genotóxicos e inmunotóxicos detectados por exposiciones continuas a metales o compuestos químicos (8).

De esta manera, el estrés oxidativo inducido por muchos compuestos, especialmente los iones metálicos como de sus NPs, representa un riesgo permanente para la salud no sólo laboral sino de la población(84), particularmente por el contacto incrementado con las NPs como las AgNPs, ya que desconocemos los niveles de exposición a través de los alimentos, bebidas, suplementos alimenticios y cosméticos.

A partir de marzo de 2011, se encontraron NPs en 1,317 productos comercialmente disponibles; así, las personas pueden estar expuestas a NPs, como las AgNPs contenidas en ropa, aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas y alimentos, pinturas para paredes y productos cosméticos; a nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂) en cosméticos y protectores solares, e incluso nanopartículas de arcilla en botellas de cerveza.

Por ello, en los últimos años, el campo de la nanotoxicología ha crecido significativamente en respuesta a las preocupaciones, tanto públicas como reglamentarias, sobre la tan controvertida era de la nanotecnología, debido a la posibilidad de un mayor incremento en usos médicos, industriales,

alimenticios y comerciales (85) y por lo tanto una mayor exposición, que traerá consecuentemente un aumento de enfermedades crónico degenerativas asociadas al estrés oxidativo desencadenado en el caso de las AgNPs, debido a su afinidad con los transportadores de electrones (ubiquinona o coenzima Q, NAPH oxidorreductasas y oxidasas) que corrobora o apunta a un efecto inicial en el nivel de la membrana plasmática y sistemas de membranas internas, y debe focalizarse en la inducción del estrés oxidativo a los derivados isoprénicos que generan estructuras no cíclicas como el ácido araquidónico o cíclicas el tipo benzoquinonas, como el propio NADH y del tipo prostanoïdes como la CoQ y la prostaglandina, principales blancos de los derivados y compuestos de plata, como las AgNPs. 

REFERENCIAS

1. Avalos A, Haza, AI, Mteo, D, y Morales, P (2013) Nanopartículas de plata. Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*;7(2):1-23.
2. Ivo Iavicoli EJCyMAN (2010) Exposure to nanoparticles and hormesis. Dose-response: An International Journal;8(4):501-17.
3. Magdalena - Stevanovic BK, Jana Pethovic, Metka Filipie and Dragan Oskokovic (2011) Effect of poly α, γ L-glutamic acid as a capping agent on morphology and oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine*;6:2837.
4. Elda Maria del Rocio Coutiño Rodríguez (2011) Defensa Química y CYP450: relación con la defensa Inmune *Revista de Investigación Médica de la Uv. [Original y revisión]*.11(2):53-63.
5. Elda Maria del Rocio Coutiño Rodríguez RAPG, Rebeca García Román, Luis Alfredo Herbert Doctor (2010) Plata coloidal y salud *Universalud*;6 (12):56.
6. Savolainen K, Alenius, H. H., Norppa, H., Pylikänen, L., Toumi T., Kasper, G. (2010) Risk assessment of engineered nanomaterial and nanotechnologies-A review *Toxicology. Potential hazard of nanoparticles Properties: From to Biological & Environmental Effects*;269:94-104.
7. Chernousova S, Epple, M. (2013) Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angew Chem Int Ed*;52: 1636-53.
8. Coutiño R, Elda maria del Rocio (2015) Plata coloidal: Xenobiótico, Antígeno y disruptor hormonal *REB* 34(1):10-25.
9. Jazmín Elizabeth García Vicencio ERRCOL, y R. Coutiño Rodríguez (2004) Efecto Bactericida de los derivados de plata coloidal, cal y cloro, en lechuga romana sin y con lavado. *Higiene*;VI(150-151).
10. Sondi I S-SB (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*;271(1):177-82.
11. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, et al. (2005) Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology*;3:6.
12. Thurman RB GC, Bitton G (1989) The molecular mechanism of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit Rev Environ Control*;18:295-315.
13. Slawson RM LH, Trevors JT. (1990) Bacterial interactions with silver. *Biometals*;3(3):151-4.
14. Liao S. RD PW, Furr J., Russell A (1997) Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in applied microbiology*;25:279-83.
15. Coutiño- Rodríguez Elda Maria del Rocio AP, Rocio Anaís Pérez Gutiérrez (2007) Plata y sus compuestos. *Altepepaktli. [Difusión]*.3 (5):29-39.
16. Marin-Llera J, O, Arroyo-Huelguera y Coutiño- Rodríguez EMR (2012) Efecto de la Plata Coloidal en la lipoperoxidación de

- linfocitos humanos. *Universalud* (antes Altepel kli);8(16):26-31.
17. Klasen HJ (2000) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*;26(2):131-8.
 18. Silver S PL, Silver G. (2006) Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*;33(7):627-34.
 19. Bhattacharya R MO (2008) Biological properties of naked metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*;60(11):1289-306.
 20. Kim SC, J. E.Choi, J.Chung, K. H.Park, K.Yi, J.Ryu, D. Y. (2009) Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* Sep;23(6):1076-84.
 21. Braydich-Stolle L HS, Schlager JJ, Hofmann MC. (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicology Science*;88(4):412-419.
 22. Asharani PV, Hande MP, Valiyaveetil S (2009) Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol*;10:65.
 23. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* Feb 24;3(2):279-90.
 24. Alkilany AMM, C.J. (2010) Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res*;12(7): 2313.
 25. Van der Zande MV, R. J.Van Doren, E.Kramer, E.Herrera Rivera, Z.Serrano-Rojero, C. S.Gremmer, E. R.Mast, J.Peters, R. J.Hollman, P. C.Hendriksen, P. J.Marvin, H. J.Peijnenburg, A. A.Bouwmeester, H. (2012) Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* Aug 28;6(8):7427-42.
 26. Zhang S, Bian Z, Gu C, Zhang Y, He S, Gu N, et al. (2007) Preparation of anti-human cardiac troponin I immunomagnetic nanoparticles and biological activity assays. *Colloids Surf B Biointerfaces* Apr 1;55(2):143-8.
 27. Z. Yang ZWL, R.P.Allaker, P.Reip, J, Oxford, Z. Ahmad and G Ren (2010) A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *JRSoc Interface*;7:S411-S22.
 28. Johnston H, Hutchison,G, Christensen, FM, Peters,S, Hankin, S and Stone V (2010) A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanism responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol*;40:328-46.
 29. Kyung-Taek Rim S-WS, Hyeon-Yeong Kim (2013) Oxidative DNA Damage from Nanoparticle Exposure and Its Application to Workers' Health: A Literature Review. *Safety and Health at Work*;4:177-86.
 30. Sung J, Ji,JH, Park,JD, Yoon, JU, Kim,DS, Jeon,KS, Song,MY, Jeong,J, Jan BS, Han JH, Chun,YH, Chang, HK, Lee,JH, Cho,MH, Kelman,BJ, y Yu,IJ (2009) Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 108:452-61.
 31. Takenaka S, Karg, E, Roth,c, Schulz H, Ziesenis,A, Heinzmann, U, Schramel P, Heyder J (2001) Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine, silver particles in rats. *Environment Health Perspectives*;4:547-51.
 32. Van Hasselt P GB, Ahmad J. (2004) Colloidal silver as an antimicrobial agent: fact or fiction?. *J Wound Care*;13(4):154-5.
 33. Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE (2005) Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett Mar* 15;155(3):377-84.
 34. Trop M (2006) Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma Oct*;61(4):1024.
 35. Braydich-Stolle LK LB, Schrand A, et al (2010) Silver nanoparticles disrupt GDN/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. . *Toxicol Sci*;116(5):577-589.
 36. Rosas-Hernandez HJ-B, S.Martinez-Cuevas, P. P.Gracia-Espino, E.Terrones, H.Terrones, M.Hussain, S. M.Ali, S. F.Gonzalez, C. (2009) Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett Dec* 15;191(2-3):305-13.
 37. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B Oct* 30;112(43):13608-19.
 38. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, et al. (2008) DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol Dec* 15;233(3):404-10.
 39. Cho W, S., Cho,M., Jeong, J.,Choi,M, Cho,H:Y., Han,B.S., Kim,S.H, Kim, H.O. Lim,Y.T., Chung,B.H., Jeong J (2009) Acute toxicity and pharmacokinetics of 13nm-seized PEG. coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*;236:16-24

40. Pal S TY, Song JM (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73:1712-20.
41. Gálvez VyTC (2010) Toxicología de las nanopartículas. Seguridad y salud en el trabajo;56:6-12.
42. Jiang X, Foldbjerg R, Miclaus T, Wang L, Singh R, Hayashi Y, et al. Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicol Lett* Sep 12;222(1):55-63.
43. Klien KaG-CJ (2012) "Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on in vivo studies". *Archiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*;63(3).
44. Milic ML, G.Pavicic, I.Zebic Avdicevic, M.Dobrovic, S.Goessler, W.Vinkovic Vrcek, I. (2015) Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. *J Appl Toxicol Jun*;35(6):581-92.
45. Dandan Chen TXaJB (2007) Biological effects induced by nanosilver particles: in vivo study. *Biomedical Materials*;2:S126-S8.
46. Chithrani B, Ghazani,AA, Chan WCE (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake by mammalian cells *Nano Letter*;7:1542-50.
47. Drake PI HK (2005) Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann Occup Hyg*;49(7):475-85.
48. Foldbjerg RW, J. Beer, C.Thorsen, K.Sutherland, D. S.Autrup, H. (2013) Biological effects induced by BSA-stabilized silica nanoparticles in mammalian cell lines. *Chem Biol Interact Jun* 25;204(1):28-38.
49. D Lapuente J RD, Poderron C, Di Guglielmo C , Borrás M (2010) In vitro cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles. *J Toxlet*;196:S284.
50. Hussain SMH, K.L, Gearhart,J.M, Geiss,K.T., Schhlager ,J.J (2005) In vitro toxicity of nanoparticlwa in BRL3A rat liver cells. *ToxicolIn Vitro, Thirteenth International Workshop on In Vitro Toxicology Thirteenth Workshop on In Vitro Toxicology* 19:975-83.
51. Hussain SM, Javorina, A. K., Schrand, A. M., Duhart, H. M., Ali, S. F. & Schlager, J. J (2006) The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci*;92:456-63.
52. Jiang W KB, Rutka JT, Chan WC (2008) Nanoparticle-mediated cellular response in size-dependent. *Nat Nanotechnol*;3:145-50.
53. Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Venkataraman D, Eom SH, Park J, Gurunathan S (2009) Silver nanoparticles inhibit VEGF- and IL-1beta-induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *J Nanobiotechnology*;7:8.
54. Haase AR, S.Mantion, A.Graf, P.Plendl, J.Thunemann, 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. *Toxicol Sci Apr*;126(2):457-68.
55. Hsin YH, Chen, Cf; Huang, S Shic TS, Lai,PS,y Chueh, PJ (2008) The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS-and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett*;179:130-9.
56. Shen HM, Liu ZG (2006) JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med Mar* 15;40(6):928-39.
57. KamataH, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M (2005) Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell Mar* 11;120(5):649-61.
58. Kim Y, Yang SI, Ryu JC (2010) Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cells lines. *Mol Cell Toxicol*;6:119-25.
59. AvilaLagunes L (2013) Determinación de la Plata coloidal en la inducción de la Hemoxigenasa 1 [Maestria en Investigacion Biomédica]. Xalapa Veracruz: Universidad de Veracruz.
60. Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I, et al. (2008) A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience Apr* 22;153(1):120-30.
61. Saavedra OMyc (2010) "Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico degenerativas". . *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*:32-9.
62. Konigsberg FM (2008) "Radicales Libres y Estrés Oxidativo". Editorial El Manual Moderno SAdCV, editor. México D.F
63. Ghosh M MJ, Sonai- S, et al. (2012) In Vitro and In Vivo genotoxicity of silver nanoparticles *Mut Res*;749(1-2): 60-9.
64. Ha Ryong Kim YJP, Da Young Shin, Seung Min Oh, Kyu Hyuck Chung (2013) Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. *Enviromental Health and Toxicology*;28:1-8.

65. Elda Maria del Rocio Coutiño Rodríguez AP, Rocio Anais Pérez Gutiérrez. Plata Coloidal repercusiones en la salud CongresoXXVII Nacional de Bioquímica Mérida, Yucatan2008.
66. Ahamed Myc (2010) "Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*". . Toxicology and Applied Pharmacology;242:263-9.
67. Ahamed MySM (2007) Low level lead exposure and oxidative stress. Current opinion in ClinChim Acta 387:5764.
68. Regalado S, Ana Lilia, Coutiño Rodriguez Elda Maria del Rocio. Plata coloidal induccion de la defensa inmune primaria en linfocitos humanos en cultivo. Congreso Nacional de Bioquímica en México; Oaxaca Oaxaca2012.
69. Nishanth RP, Jyotsna RG, Schlager JJ, Hussain SM, Reddanna P Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: role of ROS-NFkappaB signaling pathway. Nanotoxicology Dec;5(4):502-16.
70. Greulich C, Kittler S, Eppe M, Muhr G, Koller M (2009) Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). Langenbecks Arch Surg May;394(3):495-502.
71. Seung- Heon Shin MKY, Hae-Sic Kim, Hyung-Suk Kang (2007) The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. International Immunopharmacology;7:1813-8.
72. Yeng HJ HS, Tsai CL. (2009) Citotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of different Sizes. Small;5(13):1553-61.
73. Boraschi D, Constantino, L., Italiani, P (2011) Interaction of nanoparticles with immunocompetent cells: nanosafety considerations. Nanomed;7:121-31.
74. Angela Veraldini ASC, Vanessa Bolejack, Lucia Miligi, Paolo Vineis, and Henk Van Loveren (2006) Immunotoxic Effects of Chemicals: A matrix for Occupational and Environmental Epidemiological Studies. American Journal of Industrial Medicine;49:1046-55.
75. Armando Vega-López MLD-L, Luís Jiménez-Zamudio y Ethel García-Latorreb INMUNOTOXICIDAD, PROTOCOLOS PARA SU ESTUDIO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Jorge Ortiz Reyes, Jacinto Elías Sedeño, Eugenio López López 2009. Available from: <http://m.ipn.mx/pdf/ENCB/ENCB/WPS/WPS/WCM/CONNECTI/2DA7F980462>
76. Klippstein R F-MR, Castillo PM, Zaderenko AP, Pozo D, editor. Silver Nanoparticles Interactions with the Immune System: Implications for Health and Disease, : Pozo Perez D, Ed.; 2010.
77. Haase AM, A.Graf, P.Plendl, J.Thuenemann, A. F.Meier, W.Taubert, A.Luch, A. (2012) A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems. Arch Toxicol Jul;86(7):1089-98.
78. Avila- Lagunes Lucerito O, Arroyo Huelguera y Elda Maria del Rocio, Coutiño-Rodriguez (2013) Hemooxigenasa 1: Su importancia en los mecanismos de oxidación y su relación con enfermedades no infecciosas. UniverSalud (antes Altepeli);9(17):56- 61.
79. Piao MJ, Kang, K.A., Lee, I.K., Kim, H.S., Kim, S., Choi, J.Y., Choi, J., Hyun, J.W (2011) Silver nanoparticles induce oxidative damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. Toxicology Letters;201:92-100.
80. Avila Lagunes yEMdRC, editor. Colloidal Silver: Induction of heme oxygenase 1 and its association with 8 isoprostanes. 20th Annual Meeting of the Society for Free Radicals Biology and Medicine; 2013; Grand Hilton in San Antonio Texas USA: Free Radical Biology and Medicine
81. Borm P. J. A. RD, Haubold S. et al. (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC". . Part Fiber Toxicol;3:22.
82. Coutino RR (1979) Analysis of anaphase in cell culture: an adequate test system for the distinction between compounds which selectively alter the chromosome structure or the mitotic apparatus. Environ Health Perspect Aug;31:131-6.
83. Velázquez PM, Prieto- Gomez Berta y Contreras Perez Rocio. (2004) El envejecimiento y los radicales libres. . Ciencias 75:36-43.
84. Lydia Gutiérrez González MJHJyLMB (2013) Daños para la salud tras la exposición laboral a nanopartículas Medicina y Seguridad en el trabajo;59(231):276-96.
85. Sara A. Love MSAL, Melissa A. Maurer-Jones, John W. Thompson, Yu-Shen Lin, and Christy L. Haynes (2012) Assessing Nanoparticle Toxicity. Annu Rev Anal Chem 5:181-205.