

# Micronúcleos en Reticulocitos de Ratones Balb/c Tratados de Forma Oral con Nanopartículas de Plata

Castañeda-Yslas I Y<sup>1</sup>, Ruiz-Ruiz B<sup>1</sup>, Arellano-García M E<sup>1</sup>, Juárez-Moreno K<sup>2</sup>, Torres-Bugarín O<sup>3</sup>, Bogdanchikova N<sup>2</sup>, Pestryakov A<sup>4</sup>, Radilla-Chávez P<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, KM. 106 Carr. Tijuana-Ensenada, 22800  
[idalia.castaneda@uabc.edu.mx](mailto:idalia.castaneda@uabc.edu.mx), [bruiz@uabc.edu.mx](mailto:bruiz@uabc.edu.mx), [evarista.arllano@uabc.edu.mx](mailto:evarista.arllano@uabc.edu.mx)

<sup>2</sup> Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara

<sup>4</sup> Universidad Politécnica de Tomsk, 634050, Rusia

<sup>5</sup> Escuela de Medicina Ensenada, Universidad Autónoma de Baja California

**Autor de correspondencia:** Idalia Yazmin Castañeda Yslas, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, KM. 106 Carr. Tijuana-Ensenada, 22800. Ensenada, Baja California, México. E-mail: [idalia.castaneda@uabc.edu.mx](mailto:idalia.castaneda@uabc.edu.mx).

**Resumen.** El estudio de la genotoxicidad en modelos murinos es útil para responder las dudas relacionadas con la seguridad por el uso de nanomateriales, sobre todo cuando se pretende el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad genotóxica de AgNPs Argovit™ a partir de la técnica de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratones, prueba ampliamente utilizada para conocer el potencial genotóxico de diferentes agentes. Las nanopartículas de plata se suministraron en dosis terapéuticas por vía oral (indicadas para perros como tratamiento para el moquillo) durante tres días a un grupo conformado por siete ratones y a otros dos grupos con igual número de ratones se administró respectivamente agua inyectable y arabinosa C. Los especímenes fueron medidos, pesados antes y después del experimento. También se tomaron diariamente muestras de sangre periférica mediante un corte en la punta de la cola para posteriormente realizar extendidos sobre portaobjetos para la prueba de micronúcleos en reticulocitos. Los frotis se fijaron en etanol al 80 % y se tñieron con anaranjado de acridina para posteriormente leer en 1000 reticulocitos la presencia de micronúcleos con microscopio de fluorescencia. Los resultados preliminares muestran diferencias significativas en el número de micronúcleos en reticulocitos entre los tres grupos, por lo que se requiere comprobar este resultado con otro tipo de modelos *in vitro*.

**Palabras clave** Nanopartículas de Plata; Micronúcleos; Reticulocitos; Genotoxicidad.

**Abstract.** - *The purpose of this work was to evaluate the genotoxic capacity of AgNPs Argovit™ with the micronucleus technique in mouse peripheral blood reticulocytes. Argovit™ is administered orally in therapeutic doses (indicated for dogs as treatment for distemper) for three days to an experimental group with seven mice. Another two groups with an equal number of mice were administered with injectable water and arabinose C, respectively. The specimens were measured and weighed before and after the experiment. Peripheral blood samples were also taken daily by a cut at the tip of the tail and then extended on slides for micronucleus test in reticulocytes. The smears were fixed in ethanol at 80 % and stained with acridine orange, after that, the presence of micronuclei was identified in 1000 reticulocytes counted by fluorescence microscopy. Preliminary results show significant differences in the number of micronuclei in reticulocytes between the three groups, so its necessary to compare this result with another type of in vitro models.*

**Keywords:** Silver Nanoparticles; Micronuclei; Reticulocytes; Genotoxicity.



## 1. Introducción

Las nanopartículas de plata (Ag-NPs) son muy utilizadas en aplicaciones biomédicas. El número de investigaciones sobre la toxicidad de las Ag-NPs va en aumento y poco se ha concluido sobre los factores que inciden en su toxicidad a nivel celular [1, 2], pero sigue persistiendo controversias respecto al entendimiento de las vías del daño en líneas celulares, en lo referente a las pruebas experimentales y el tamaño de las nanopartículas [3]. Desde 2004, las nanopartículas de plata Argovit™ se estudian por su actividad antiviral en contra de rinotraqueítis infecciosa y diarrea viral bovina [4]. Argovit™ usada para el tratamiento de otitis humana mostró remisión de los síntomas y reepitelización de los tejidos [5]. La administración oral en perros de Argovit™ registró una muy alta tasa de recuperación para tratar el moquillo [6]. En pruebas *in vivo* con modelos murinos se probó la eficacia de Argovit™ contra el virus de la fiebre del Rift [7] y en cuanto a su efecto inmunológico, se reveló que no hay efecto tóxico en las células inmunes y los órganos de ratones [8]. Se ha mostrado que las nanopartículas de plata Argovit™, presenta efectos citotóxicos en ocho líneas de células de cáncer e induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [9].

El presente trabajo explora la genotoxicidad de nanopartículas de plata Argovit™, y el antineoplásico arabinosa C. (Ara-C) el cual evita la reparación del ADN y causa citotoxicidad, en contraste con un control de agua. Aquí se presentan los resultados preliminares de estos experimentos que muestran en general una menor genotoxicidad de las AgNPs en comparación con Ara-C.

## 2. Metodología

Tres grupos de ratones balb/c se usaron para probar el efecto genotóxico mediante la prueba de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratón posterior a la administración de AgNPs de la

marca Argovit™ y el fármaco antineoplásico arabinosa-C.

### 2.1 Diseño experimental

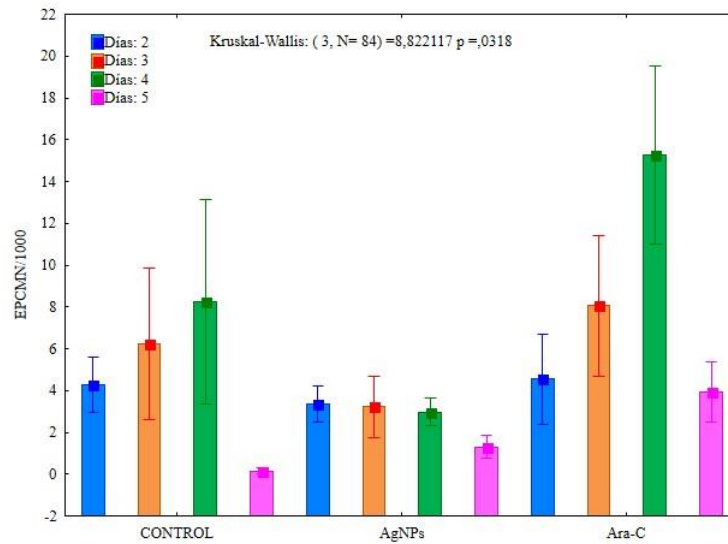
21 ratones balb/c de 5-6 semanas de edad, con peso de  $\bar{X}$  = 19.94 gramos, formaron aleatoriamente 3 grupos de 7 ratones cada uno. Al primer grupo se le administró solamente agua inyectable intraperitonealmente, el segundo se trató con 6mg/kg de Arabinosa-C intraperitoneal y al tercero Argovit™ 6 mg/kg con cánula de alimentación vía oral, estos tratamientos se repitieron por tres días consecutivos. Se prepararon frotis de sangre caudal por duplicado cada día después del segundo día posterior a la aplicación, y se practicó eutanasia al séptimo día [10].

### 2.2 La prueba de micronúcleos

A cada uno de los organismos de cada grupo se les tomó una muestra de sangre diariamente mediante el corte de la punta de la cola a partir de las 48 horas de iniciados los experimentos. Se realizaron dos frotis con la sangre de cada animal y se analizaron para determinar el daño acumulado con el número de reticulocitos con micronúcleo (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC). Para observar el efecto del tratamiento después de 24 a 48 horas post-tratamiento, se toma en cuenta que la presencia de EPCMN demostrarían que existe genotoxicidad reciente (en las últimas 24 horas). Los conteos de diferentes tratamientos se codificaron y se analizaron estadísticamente mediante la prueba H de Kruskal-Wallis.

## 3. Resultados

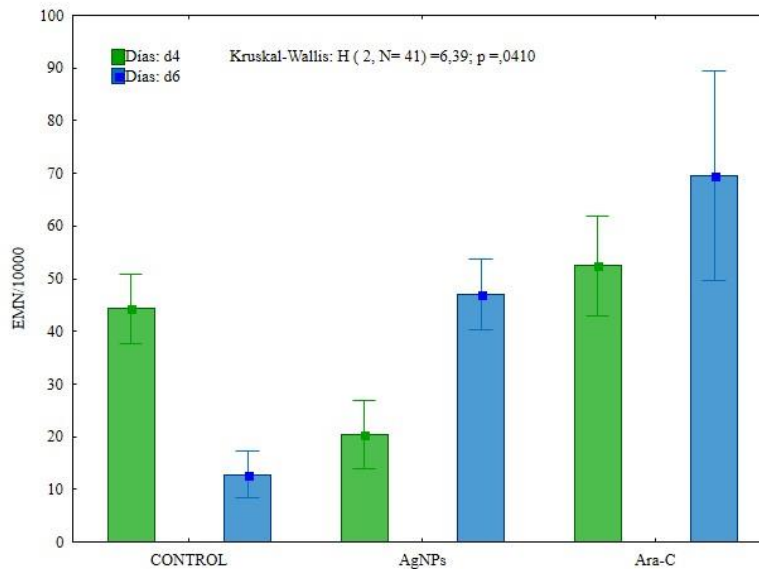
Las AgNPs Argovit™ produjeron menos genotoxicidad que el aneoplásico Ara-C ya que indujeron menos EPCMN. En los primeros tres días después de tratar a los ratones con AgNPs, se produjo menos daño incluso que el grupo control al que solo se le administró agua ( $p < 0.05$ ), aunque se advierte un ligero aumento en el día 5 (Fig 1).



**Figura 1.** Eritrocitos policromaticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromaticos.

El efecto de la genotoxicidad acumulada se muestra en la figura 2 y conforme a la prueba H de Karuskal-Wallis, las AgNPs Argovit™ no incrementaron significativamente el número de

micronúcleos en 10000 eritrocitos, en comparación con el grupo control. En cambio, el antineopásico Ara-C, si muestra efectos genotóxicos acumulativos al sexto día de aplicación ( $p < 0.05$ ).



**Figura 2.** Eritrocitos micronucleados en 10 000 eritrocitos totales.



#### 4. Conclusiones

La administración de Arabinosa-C produce mayor genotoxicidad, ya que causa daños morfológicos en el núcleo y fragmentación en el ADN, que pueden atribuirse a la formación de especies reactivas de oxígeno.

De acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis los resultados indican que el fármaco Ara-C induce mayor genotoxicidad que las AgNPs después de 24 horas de administrarlas, al igual que el efecto acumulativo después de 5 días de aplicación. Aunque

estos resultados son preliminares se advierte, como se esperaba, que las AgNPs Argovit™ en las concentraciones probadas son potencialmente no genotóxicas para este modelo de ratón. Lo que ofrece las primeras evidencias de la seguridad toxicológica de las AgNPs Argovit™.

**Agradecimientos:** a todas la instituciones involucradas, así como a los proyectos PAPIIT-UNAM IT200114, Proyecto CONACYT 270242, Proyecto del CONACYT de Redes No. 293417. En especial Vector-Vita Ltd., por proporcionar las nanopartículas de plata.

#### Referencias

- [1] B. Nowack, H. F. Krug, y M. Height, “120 years of nanosilver history: Implications for policy makers”, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, núm. 4, pp. 1177–1183, 2011.
- [2] L. Ge, Q. Li, M. Wang, J. Ouyang, X. Li, y M. M. Q. Xing, “Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity”, *International Journal of Nanomedicine*, vol. 9, núm. 1. pp. 2399–2407, 2014.
- [3] Y. Li *et al.*, “Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay”, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 745, núm. 1–2, pp. 4–10, 2012.
- [4] A. G. Glotov, T. I. Glotova, A. A. Sergeev, T. V. Belkina, y A. N. Sergeev, “[Antiviral activity of different drugs in vitro against viruses of bovine infectious rhinotracheitis and bovine diarrhea]”, *Vopr Virusol*, vol. 49, núm. 5, pp. 43–46, 2004.
- [5] F. V. Semenov y K. M. Fidarova, “[The treatment of the patients presenting with chronic inflammation of the trepanation cavity with a preparation containing silver nanoparticles following sanitation surgery of the open type]”, *Vestn. Otorinolaringol.*, núm. 6, pp. 117–119, 2012.
- [6] N. Bogdanchikova *et al.*, “Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs”, *Int. J. Nanotechnol.*, vol. 13, núm. 1/2/3, p. 227, 2016.
- [7] B. Borrego *et al.*, “Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo”, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 12, núm. 5, pp. 1185–1192, 2016.
- [8] O. V. Kalmantaeva *et al.*, “Silver-nanoparticle exposure on immune system of mice depending on the route of administration”, *Nanotechnologies Russ.*, vol. 9, núm. 9–10, pp. 571–576, 2014.
- [9] K. Juarez-Moreno *et al.*, “Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines.”, *Hum. Exp. Toxicol.*, p. 960327116675206, 2016.
- [10] Committee, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. 2011.