

Pruebas toxicológicas para la evaluación de nanomateriales: Artículo de revisión Toxicological tests for the evaluation of nanomaterials: Review article

F. del C. Salinas-Pérez ^a, A. Garrido-Hernández ^a, I. Gómez-Alonso ^b, M. del S. Ruíz-Palma ^a
G. García-Domínguez ^a, L. Chávez-Güitrón ^{a*}

^a Universidad Tecnológica de Tecámac. Carretera Federal México-Pachuca Km. 37.5 Predio Sierra Hermosa, Tecámac, C.P. 55740, Estado México, México.

^b Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Manuel Carpio Plutarco Elías Calles, Miguel Hidalgo, C.P. 11350, Ciudad de México, México.

Resumen

En la actualidad, los nanomateriales son una parte importante para el desarrollo de nuevas aplicaciones esto gracias a que a tamaños nanométricos sus propiedades físicas, químicas y biológicas cambian. Los nanomateriales se clasifican de acuerdo con su tamaño, morfología en 0D, 1D, 2D y 3D. Estos materiales han encontrado aplicaciones diversas, desde la reducción de contaminantes orgánicos en agua hasta su uso como transportadores de fármacos y biomarcadores para la detección de cáncer, así como en la encapsulación de nutrientes. Aunque estos avances prometen beneficios significativos, la reducción de tamaño plantea inquietudes respecto a su interacción con el cuerpo humano. Las principales vías de exposición, como la inhalación, el contacto directo e ingestión, han suscitado la necesidad de regular la bioseguridad en el uso de nanomateriales en los últimos años. En este contexto, la evaluación de la toxicidad de estos materiales se presenta como un aspecto esencial, destacando su importancia crítica en diversas áreas tecnológicas y médicas. Este trabajo se centra en una exhaustiva revisión bibliográfica de las pruebas toxicológicas, subrayando la imperiosa necesidad de evaluar los efectos tóxicos de las nanopartículas para garantizar su uso seguro y sostenible en diversas aplicaciones.

Palabras Clave: pruebas, citotoxicidad y nanopartículas.

Abstract

Currently, nanomaterials play a crucial role in the development of new applications, thanks to the fact that their physical, chemical, and biological properties change at nanoscale dimensions. Nanomaterials are classified based on their size and morphology in 0D, 1D, 2D, and 3D. These materials have found diverse applications, ranging from the reduction of organic pollutants in water to their use as drug carriers and biomarkers for cancer detection and nutrient encapsulation. Although these advancements hold significant promise, concerns arise regarding the impact of size reduction on their interaction with the human body. Primary exposure routes, such as inhalation, direct contact, and ingestion, have prompted the need to regulate biosafety in the use of nanomaterials in recent years. In this context, the evaluation of the toxicity of these materials emerges as an essential aspect, underscoring its critical importance in various technological and medical fields. This work focuses on a comprehensive literature review of toxicological tests, emphasizing the urgent need to assess the toxic effects of nanoparticles to ensure their safe and sustainable use in diverse applications.

Keywords: tests, cytotoxicity and nanoparticles.

1. Introducción

La cuarta revolución industrial ha demandado el diseño de nanomateriales, esto ha propiciado que se sinteticen materiales

con composiciones específicas, tamaños y formas bien definidas y diversas.

Un nanomaterial (NM), es aquel material que al menos una de sus dimensiones tiene un tamaño de partícula entre 1 a 100 nm, (Hussain et al., 2015). Dependiendo del tamaño de

*Autor para la correspondencia: lmchavez@yahoo.com

Correo electrónico: biotflorencia@yahoo.com.mx (Florencia Salinas-Pérez), ari_teogh@hotmail.com (Aristeo Garrido-Hernández), itziasidey@gmail.com (Itzia Gómez-Alonso), mruizp@uttecamac.edu.mx (M. Del Socorro Ruiz-Palma), ggarciad@uttecamac.edu.mx (Giovanni García-Domínguez), lmchavez@yahoo.com (Lorena Chávez-Güitrón).

Historial del manuscrito: recibido el 07/10/2023, última versión-revisada recibida el 16/11/2023, aceptado el 15/11/2023
Publicado el 15/12/2023. DOI: <https://doi.org/10.29057/icbi.v11iEspecial5.11825>



partícula y morfología, las propiedades físicas, químicas y biológicas cambian (Gagner et al., 2012), esto contribuye a que los nanomateriales presentan ventajas en ciertas aplicaciones, por ejemplo, al disminuir el tamaño de partícula se incrementa la propiedad de adsorción, mostrando una alta utilidad en la remoción de contaminantes orgánicos en aguas residuales

El empleo de nanomateriales se ha utilizado para aumentar la dureza en metales, también en nutrición para la encapsulación de nutrientes para incrementar la biodisponibilidad, en salud como liberadores de fármacos, así como en el diseño de materiales que promuevan la cicatrización y regeneración de tejidos.

En la actualidad las aplicaciones industriales empleando nanopartículas (NPs) ha ido en aumento debido a la versatilidad en que se pueden obtener. La morfología de los nanomateriales se refiere a la forma y estructura tridimensional de las partículas a una escala nanométrica, es decir, a nivel de nanómetros. Los NMs pueden tener diferentes dimensiones, y se clasifican en base a su forma (Barnard, 2010). Nanomateriales 0D (cero dimensiones); estructuras nanométricas que no tienen una dimensión predominante. Son de tamaño similar en todas las direcciones, lo que significa que tienen una forma más bien esférica u octaédrica. Dentro de los nanomateriales más utilizados se incluyen partículas metálicas, como las de oro o plata. Las NPs de oro pueden ser utilizadas en terapias fototérmicas, para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer de piel. Se pueden activar con luz láser para generar calor y destruir las células cancerosas. Al utilizar nanopartículas de oro funcionalizadas se ha demostrado su capacidad para transportar y liberar fármacos de manera controlada en sistemas biológicos (Vines, 2019).

Los nanomateriales de acuerdo a sus dimensiones se clasifican en 0D, 1D, 2D y 3D. La tabla 1 muestra las características, clasificación y aplicaciones de estos nanomateriales.

La relación entre NPs y NMs es que las nanopartículas son componentes estructurales fundamentales de los nanomateriales. Por lo que a lo largo de este trabajo se refiere con el término NP cuando se estudia de forma directa las propiedades del componente del nanomaterial.

Para definir la aplicación de las nanopartículas (NPs) es importante considerar la superficie por masa de ésta, ya que ello permite que sea más activa biológicamente que partículas de mayor tamaño de la misma composición, además la superficie y el número de partículas permiten predecir mejor las respuestas inflamatorias de stress oxidativo (Gagner, et al., 2012).

Las razones por las cuales las nanopartículas (NPs) más pequeñas exhiben una mayor actividad biológica en comparación con partículas de mayor tamaño de la misma composición. En primer lugar, en tamaños nanométricos aumenta significativamente la relación superficie-masa, lo que implica una mayor área expuesta en proporción a su masa. Esta característica intensifica las interacciones biológicas en la superficie de las NPs, manifestándose en una actividad biológica más acentuada. En segundo lugar, las nanopartículas

más pequeñas destacan por su mayor capacidad de penetración, facilitando su acceso a membranas celulares y tejidos biológicos. Este fenómeno facilita la entrada eficaz en células y organelos, de las NPs lo que les permite sean utilizadas en aplicaciones biomédicas, como en la administración de fármacos y la terapia génica. A continuación, se describen las razones por las cuales las nanopartículas (NPs) más pequeñas exhiben una mayor actividad biológica en comparación con partículas de mayor tamaño de la misma composición. En primer lugar, a tamaños nanométricos aumenta significativamente la relación superficie-masa, lo que implica una mayor cantidad de superficie expuesta en proporción a su masa. Esta característica intensifica las interacciones biológicas en la superficie de las partículas, manifestándose en una actividad biológica más pronunciada. En segundo lugar, las nanopartículas más pequeñas destacan por su mayor capacidad de penetración, facilitando su acceso a membranas celulares y tejidos biológicos. Este fenómeno facilita la entrada eficaz en células y organelos, potenciando su utilidad en aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos y la terapia génica. Zhdanov 2019).

Otro aspecto que se debe considerar dentro de la nanotoxicología es la biocinética de las NPs, que estudia los movimientos o cambios de posición en organismos vivos, ya que en el caso de que la NPs se inhalen se depositan en el tracto respiratorio y evaden la respuesta inmune específica estas se translocan fuera del tracto por endocitosis y transcitosis. En la piel, las NPs entran por la dermis y posteriormente se translocan por vía linfática y ganglios regionales. Las que se ingieren, son captadas por la linfa y se excretan por las heces. Las que entran por vía sanguínea son absorbidas por el hígado, bazo, médula ósea, corazón y otros órganos (Oberdörster et al., 2005).

Por lo tanto, el creciente interés por la evaluación toxicológica de las NPs se debe en gran medida a sus diversas aplicaciones, principalmente en las áreas de la salud, alimentación e industrial. Para poder emplear las NPs en estas aplicaciones antes citadas es necesario determinar su toxicidad, por medio de pruebas toxicológicas, las cuales en organismos vivos evalúan los fluidos corporales y órganos internos para detectar la presencia de sustancias químicas o lesiones agudas o crónicas y en modelos *in vitro* el daño celular (Juárez-Moreno *et al.*, 2020). El uso de NPs en diversas aplicaciones requiere el apoyo de la nanotoxicología, que de acuerdo con Oberdörster et al., 2005, es la ciencia que estudia los efectos tóxicos de las NPs sobre el medio ambiente y seres vivos, ya que la diversidad de estas y sus posibles efectos plantea la necesidad de evaluar la exposición humana y ambiental durante su fabricación y uso.

Debido a la creciente preocupación que involucra el manejo de las NPs, se requiere evaluar los riesgos y para este estudio se deben responder las siguientes preguntas: ¿Las nanopartículas tienen efectos adversos? ¿Cómo se relaciona la dosis respuesta?, ¿Cómo son los niveles ocupacionales/ambientales en diferentes medios? ¿Cuál es el riesgo calculado? (Oberdörster et al., 2005, Moya et al., 2011).

Tabla 1. Clasificación, características, ejemplos y aplicaciones de los nanomateriales.

DIMENSIONES	DEFINICIÓN	EJEMPLO	APLICACIÓN	REFERENCIA
Cero dimensiones	Estructuras nanométricas que no tienen una dimensión predominante. Son de tamaño similar en todas las direcciones (esferas u octaedros).	Nanopartículas de oro	Tratamiento de ciertos tipos de cáncer de piel.	(Vines, 2019)
		Nanopartículas de plata	Transporte y liberación de fármacos.	
Una dimensión	Tienen una dimensión predominante, son alargadas en una dirección mientras que las otras dos dimensiones son mucho más pequeñas.	Nanotubos de carbono	Marcadores de enfermedades de la piel.	(Lalwani, 2015)
			Sustrato para crecimiento celular.	
Dos dimensiones	Tienen dos dimensiones predominantes, son planas y tienen un espesor muy pequeño en comparación con su longitud y anchura	Grafeno	Monitoreo de parámetros en pacientes.	(Farrera, 2017)
Tres dimensiones	Tienen un tamaño similar en todas las direcciones y mantienen una forma tridimensional.	Nanopartículas de sílice	Liberación controlada de activos	(Manzano, 2020)

Se han desarrollado diversas pruebas y métodos para evaluar la nanotoxicidad de la NPs, algunas de estas pruebas son: inflamación y estrés oxidativo, biodistribución y metabolismo, genotoxicidad, citotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo, biodistribución y metabolismo, evaluación de toxicidad de modelos *in vivo*, hemocompatibilidad, ecotoxicidad, estudios epidemiológicos, pruebas de toxicidad en piel y en modelos celulares *in vitro*.

La evaluación de la toxicidad de las nanopartículas (NPs) ha adquirido una importancia significativa, especialmente en el contexto de su aplicación en diversas áreas tecnológicas y médicas. La manipulación precisa de las propiedades fisicoquímicas de los NMs ha permitido la obtención de materiales con características únicas y altamente prometedoras, pero también ha planteado importantes interrogantes sobre su seguridad ambiental y biológica. En este sentido, la evaluación rigurosa de la toxicidad de las NPs a través de pruebas toxicológicas representa una necesidad apremiante para asegurar su implementación de manera responsable. En esta revisión bibliográfica se presentan diferentes pruebas toxicológicas que permiten identificar y evaluar la toxicidad de las NPs.

2. Pruebas de inflamación y estrés oxidativo

Evalúan el potencial de las NPs para inducir inflamación y estrés oxidativo en células y tejidos. Esto puede incluir la

medición de marcadores inflamatorios y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las EROS incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Estos se forman de manera natural del oxígeno y tienen un papel importante en la señalización celular (Vicenta et al., 2015).

En 1954 Rebeca Gerschman propone la toxicidad de radicales libres y sugiere que su presencia provoca enfermedades (Gershman, 1954). El oxígeno es esencial para la vida en organismos aerobios, por un lado, participa en la respiración celular como aceptor terminal de electrones. Por el otro lado, provoca daño celular conocido como "estrés oxidativo", este se presenta por un desbalance en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y la defensa antioxidante, causando cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular (Pérez & Pérez, 2000).

Dentro de los métodos directos, una técnica utilizada es la espectrometría de la resonancia de la rotación (espín) de electrones, esta mide las EROs. La prueba se basa en el hecho de que los metales de transición, una vez liberados de su forma quelante, estado en el que generalmente se encuentran en plasma y dentro de las células, tienen la capacidad de catalizar reacciones del tipo REDOX, cuyos productos son atrapados por derivados fenólicos, que resultan en la formación de una

sustancia desarrolladora de color que sea sensible a la medición espectrofotométrica (Pérez & Pérez, 2020).

En las pruebas indirectas para determinar las EROS, es posible determinar productos terminales de la acción oxidante. Existen pruebas que determinan de forma indirecta algunas de las EROS mediante los productos terminales de su acción oxidante sobre proteínas, ADN y lípidos. La peroxidación lipídica, consiste en que los ácidos grasos no saturados de los fosfolípidos en las membranas celulares son atacados por radicales, lo que provoca la formación de

hidroperóxidos, los cuales se degradan rápidamente, sin embargo, la lipoperoxidación permite determinar la función de los radicales libres en caso de daño celular, y existen algunas formas de medirla, entre ellas: medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, medición de aldehídos procedentes de la lipoperoxidación, medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado, medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación (Pérez-Gastell & Pérez de Alejo 2000).

Otras pruebas son: la medición de la concentración de antioxidantes, ya que estos pueden aumentar o disminuir por diferentes enfermedades, lo que permite dar un seguimiento terapéutico.

Por otra parte, también se pueden evaluar antioxidantes de tipo no enzimáticos como las vitaminas C, A y E y la ubiquinona (Lagendik et al., 1996; Pacifici et al., 1991), y antioxidantes de segunda línea como son: enzimas reparadoras del daño del ADN (Fraga et al., 1990), redox endonucleasas.

3. Pruebas de biodistribución y metabolismo

Las pruebas de biodistribución y metabolismo rastrean cómo las NPs son absorbidas, distribuidas, metabolizadas y excretadas por el cuerpo. Estas pruebas pueden incluir técnicas de imagenología como la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones (PET).

Cheng et al., (2014), en este estudio mediante la fusión de distintos nanocristales de Au, Pt e IONP a través de interfaces de estado sólido y la modificación selectiva de distintas superficies se construyeron nanotrimeros híbridos para combinar agentes de contraste ponderados en T1 y T2 en un nanocompuesto con la forma y el tamaño deseados para la resonancia magnética dual, manipularon la disposición espacial de cada componente con el fin de controlar la distancia entre las especies T1 y T2 para reducir el acoplamiento magnético y potenciar sinérgicamente ambos efectos de contraste T1/T2. En esta investigación se concluye que las nuevas nanoestructuras con efectos de contraste tanto positivos como negativos pueden utilizarse potencialmente como nanosondas moleculares para el diagnóstico de tumores y aplicaciones terapéuticas con excelente precisión y fiabilidad.

4. Evaluación de la toxicidad de nanopartículas en modelos celulares *in vivo*

Estas pruebas evalúan *in vivo* o *in vitro* los efectos de la administración de las NPs. Estos estudios pueden evaluar la exposición aguda o crónica de las NPs determinando signos y lesiones *en modelos in vivo* o efecto citotóxico *en modelos in vitro*.

Las pruebas de toxicidad incluyen la evaluación de los efectos de los materiales en animales de laboratorio, administrando el medicamento o la NPs por un largo tiempo, registrando las anomalías fisiológicas y bioquímicas. A pesar de los cambios en la normatividad con respecto a la utilización de animales en investigación, el modelo animal es probable que siga vigente por la variedad de ventajas que ofrece, por ejemplo, la constitución genética definida, así como la posibilidad de controlar la exposición y su duración, otra ventaja es la posibilidad de revisar los órganos (después de la necropsia). Las pruebas que evalúan toxicidad pueden realizarse *in vivo* (utilizando el animal completo), *in vitro* (probando en células o tejidos aislados) o por computadora (Bruinen de Bunin et al., 2009).

Los productos cosméticos que contienen sustancias químicas pueden provocar lesiones en piel o en ojos, como se usan con frecuencia debe verificarse que sean inocuos, no deben causar sensibilización o irritación dérmica u ocular. Las primeras pruebas se efectuaron utilizando como modelo animal conejos, realizando pruebas de irritación dérmica y ocular (prueba de Draize). Esta última prueba consiste en aplicar la sustancia o NPs en la conjuntiva del animal y observar si se presentan lesiones en ese órgano (Madariaga et al., 2006). A finales de los años 70 se inició un movimiento en contra del método, y se ha promovido la búsqueda de nuevas alternativas (Vinardell, 1994). Para sustituir a la prueba de Draize se planteó la prueba en membrana corioalantoidea en embrión de pollo (MCA). Esta prueba, conocida como HET-CAM por su nombre en inglés (hen's egg test on chorioallantoic membrane) fue propuesta por Lüepke 1985, y modificada por Spielmann 1992 y por Steiling, estima la irritación que provocan las sustancias a nivel ocular *in vitro*. Itagaki et al., 1995 propusieron una variante a esta técnica, utilizando un colorante que evalúa la viabilidad celular, esto permite la lectura espectrofotométrica de la muestra, lo que evita el carácter subjetivo del resultado. Esta prueba ha sustituido a la prueba de Draize, y se han realizado estudios de validación de la prueba HET-CAM (Bells et al., 1999 y Knight and Breheny 2002).

García-Domínguez et al., (2021), evaluaron la irritación dérmica en conejos machos de la raza Nueva Zelanda, provocada por la administración de hidroxiapatita sintetizada por vía hidrotermal en forma de varilla y reportaron que no se observaron lesiones de irritación dérmica.

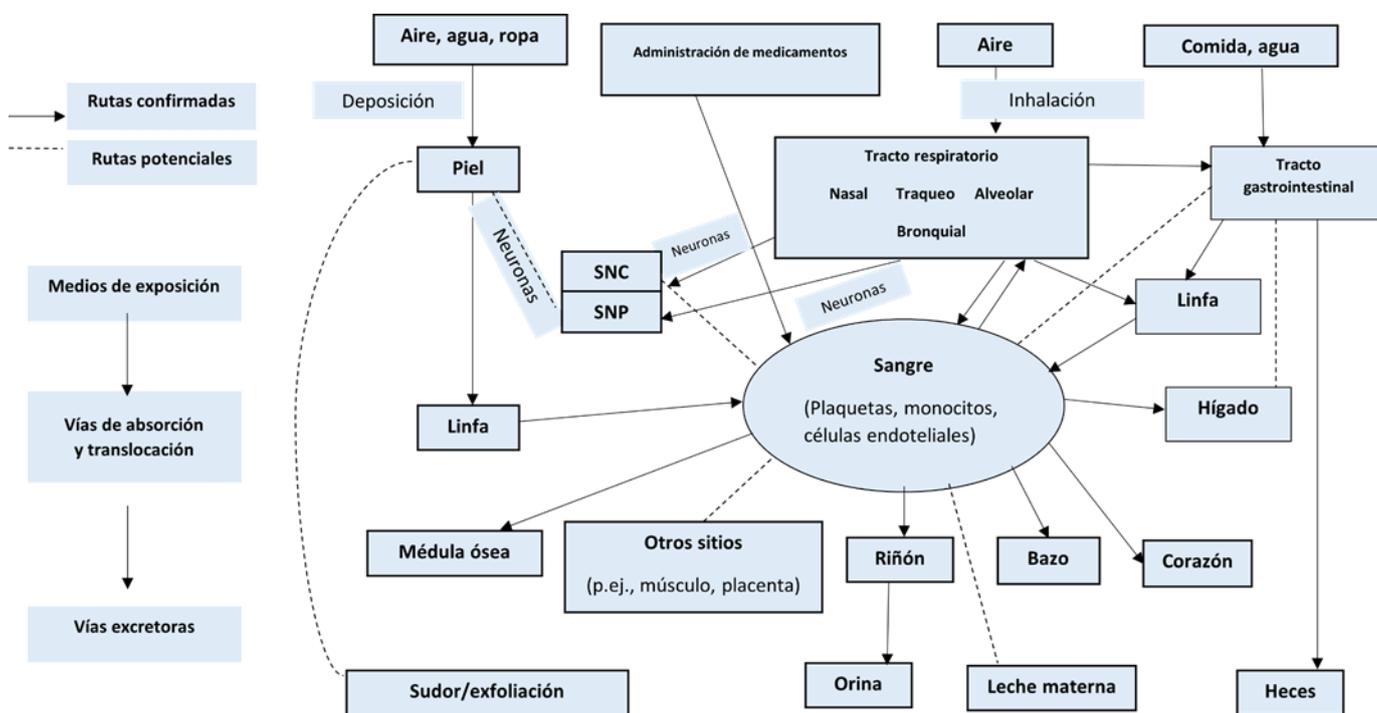
5. Pruebas de hemocompatibilidad

En aplicaciones médicas las NPs pueden entrar en contacto con eritrocitos, por lo anterior se requiere evaluar su hemocompatibilidad por medio de pruebas de hemólisis, para valorar la interacción de las NPs con las células sanguíneas (Seyfert et al., 2002; Ooi et al., 2019). Para realizar esta prueba se requiere conocer la síntesis de las NPs, las interacciones que tengan con la sangre depende de su caracterización, tamaño, carga superficie y forma. El contacto de la sangre con un

objeto extraño (no hemocompatible) puede provocar la deposición de una capa de proteína plasmática, así como de la

activación del sistema inmune y de la coagulación del cuerpo humano, exponiendo la vida del paciente (Seyfert et al., 2002).

Figura 1. Biocinética de las NPs. Se han demostrado varias vías de absorción y translocación. Otras más requieren investigarse. Tomado de Oberdörster et al., 2005.



Álvarez-Monsivais et al., 2022, realizaron pruebas de hemólisis para evaluar compuestos de hidroxapatita-zirconia, en concentraciones de 2.5 mg/ml, 5mg/ml y 10 mg/ml concluyendo en todos los casos que el porcentaje de hemólisis fue menor al 2%, por lo que los materiales estudiados no provocan un riesgo de hemólisis en el cuerpo humano.

Chávez-Guitrón et al., 2022, evaluaron NPs de hidroxapatita sintetizadas por vía hidrotermal y determinaron que las partículas presentaron menos de un 5% de hemólisis, que de acuerdo con la norma ISO 10993-4 son altamente compatibles y podrían utilizarse en aplicaciones biomédicas.

6. Pruebas de ecotoxicidad

Estas pruebas evalúan cómo las NPs afectan a los organismos y ecosistemas acuáticos y terrestres. Estas pruebas pueden incluir estudios sobre la toxicidad para organismos acuáticos, como peces y fitoplancton (Gómez-Sagasti, 2014; Carriquiriborde, 2021; Rocha & Umbuzeiro, 2022). Estos organismos actúan como bioindicadores que brindan información de elementos tóxicos que alteran un ecosistema (Alkorta et al., 2003).

Las pruebas de ecotoxicidad utilizan herramientas que reflejan la relación de las propiedades fisicoquímicas y efecto biológico potencial (Ortega-Senz 2018).

En la actualidad los compuestos xenobióticos han tomado importancia, porque estos persisten en el ambiente con transformaciones químicas peligrosas, por lo que representan un riesgo para la biodiversidad y salud humana. Por lo anterior se requieren herramientas que permitan determinar los efectos potenciales y los mecanismos de acción de estas sustancias.

Linares et al., (2017) evaluaron los efectos tóxicos de NPs de Ag, Au, Ag/Ag y superparamagnéticas de óxido de hierro, en dos especies bioindicadoras lombriz de tierra y anfibios. En la primera, los efectos tóxicos más significativos fueron, la ocurrencia de alteraciones fisiológicas y conductuales al ser expuesta a NPs de Ag de 3 nm y superparamagnéticas de óxido de hierro, estas últimas provocaron citotoxicidad a la concentración 1,38 mg/mL. En el caso de los anfibios se evidenció toxicidad en NPs de Ag 3 nm y superparamagnéticas de óxido de hierro.

7. Ensayos para la evaluación de citotoxicidad de NPs en un modelo de pez cebra

En nanotoxicología en los últimos 30 años, *Danio rerio*, pez cebra, se ha convertido en uno de los sistemas biológicos más importantes, ya que presenta ventajas como biomonitor, lo anterior es debido a sus características biológicas y morfológicas, y cuenta con un grado de similitud genética y

fisiológica con el ser humano; además de que es un modelo adaptable para su manejo en el laboratorio. En este es posible inducir su manejo reproductivo, y por tener un desarrollo embrionario externo y una gran descendencia en un periodo corto (72 h), es posible evaluar efectos sobre la viabilidad y el desarrollo de los embriones (Castillo-Salas et al., 2022).

Este modelo animal es un organismo experimental para la evaluación de efectos biológicos provocados por la exposición a xenobióticos (Rojas-Muñoz et al., 2007; Moreno, 2013; Mussali-Galante et al., 2013; Covarrubias-López, 2018; Estévez et al., 2019); estudios de embriotoxicidad y teratogénesis (Sánchez-Olivares et al., 2021), genotoxicidad (Qi et al., 2000; De Lemos et al., 2001; Normann et al., 2008; Shaw et al., 2019) y alteraciones en el metabolismo (Begum et al., 2006; Oner et al., 2008).

8. Estudios epidemiológicos

Analizan la relación entre la exposición a nanopartículas y la salud humana en poblaciones expuestas. Estos estudios pueden involucrar a personas que trabajan con nanomateriales o que están expuestas a través de otras fuentes. Baxter et al., 2020 realizaron un estudio epidemiológico en trabajadores expuestos a aerosoles y nanopartículas y se observó una disminución en la función pulmonar, síntomas respiratorios adversos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fibrosis.

9. Pruebas de toxicidad en la piel

La exposición de nanopartículas por la vía aérea y digestiva son más peligrosas que la exposición en la piel. Las tasas de translocación de las NPs en humanos aún se desconocen, así como la acumulación y retención de las mismas en sitios blanco. Los efectos adversos de las NPs se relacionan en gran medida, con las características fisicoquímicas de la superficie de las mismas. También hace falta considerar los cambios cualitativos y cuantitativos en la biocinética de las NPs administrados en un organismo enfermo o comprometido. (Figura 1) (Oberdörster et al., 2005).

Existe poca investigación clínica sobre los efectos secundarios por el empleo de NPs en forma cutánea, como la inflamación en la piel y el cáncer de piel entre otros (Hashempour et al., 2019).

Las NPs también pueden llegar al ser humano por vía dérmica y esto puede ser en el ambiente laboral, ya que se depositan en la piel las que están presentes en el aire, o por medio del uso de protectores solares y cosméticos. Existen algunos estudios que han demostrado *in vivo* e *in vitro* la factibilidad de que las NPs se absorban por la piel, como es el caso de TiO₂, esferas de poliestireno, las cuales no pueden atravesar el estrato córneo, sin embargo, se acumulan en folículos pilosos (Nohynek et al., 2014). En el caso de los puntos cuánticos, sí han demostrado que atraviesan el estrato córneo y se acumulan en la dermis (Ryman-Rasmussen et al., 2006). Por otra parte, se ha demostrado que la piel sana e intacta es una barrera efectiva para algunos NMs (Stern & McNeil 2008).

9.1 Toxicidad dérmica de nanopartículas de plata

Se esperaría que las NPs de plata (Ag) actúen de forma diferente que los iones de plata: a) podrían actuar rompiendo la pared celular u obstruyendo un vaso sanguíneo (solo las nanopartículas libres), b) podrían proporcionar un medio superficial en el cual se puedan realizar reacciones químicas o que las moléculas puedan absorberse o inmovilizarse o 3) podrían liberar iones. Se han realizado estudios utilizando animales, que comparan el uso de los iones de Ag, las nanopartículas de Ag y nanocristales recubiertos de Ag, en los cuales se ha demostrado un efecto muy similar. Se ha observado que la Ag tiene un bajo potencial de irritación en la piel. La Ag puede causar genotoxicidad, pero aún se requieren más datos para evaluar su capacidad carcinogénica (Hadrup et al., 2018).

10. Pruebas de toxicidad con “esferoides”

Los orígenes de los esferoides como método de estudio 3D se remontan a los trabajos sobre morfogénesis. En estas pruebas se realizan estudios 2D y 3D, en el caso de las primeras las células crecen en en monocapa, adheridas a un sustrato plano o en suspensión, mientras que en los modelos de cultivos 3D las células se localizan sobre andamiajes sólidos (naturales o artificiales), o formando grupos celulares generalmente de forma esferoidal (esferoides) o en pequeñas formaciones a modo de cápsulas esféricas, lo que se conoce como esferas líquidas, estas han sido el objeto de estudio de la Física y la Química, y recientemente en la Biología y la Medicina (Meseguer et al., 2015).

La gran mayoría de los estudios reportados sobre el uso de esferoides (cultivo de células con estructura 3D), para evaluar la citotoxicidad de las NPs, se basan en la comparación de sus efectos citotóxicos, su capacidad de internalización y difusión en cultivos celulares en monocapa (2D) y en esferoides (3D). Se ha evaluado el efecto citotóxico y la capacidad de internalización de nanopartículas de dióxido de titanio (NPs TiO₂) en cultivos celulares de osteoblastos humanos para estudiar las respuestas de la interacción célula-célula en el tejido óseo.

Un hallazgo importante es que las concentraciones elevadas de NPs de TiO₂ indujeron la expresión de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento involucrados en la homeostasis del hueso y la osteólisis (Souza et al., 2019). Otras NPs de óxidos que han sido evaluadas en cultivos de 2D y de esferoides son las de óxido de zinc (ZnO). Un estudio reportó la capacidad de las NPs de ZnO de 25 nm de diámetro de inducir una respuesta citotóxica de muerte celular dependiendo del tipo de arreglo dimensional que tenían las células del colon (Chia et al., 2015).

11. Evaluación de la toxicidad de nanomateriales en modelos celulares *in vitro*

Los cultivos *in vitro* representan una herramienta alternativa para el estudio de los efectos toxicológicos de las NPs. Estos sistemas experimentales ofrecen una plataforma altamente controlada y reproducible que permite investigar los mecanismos subyacentes de la toxicidad de las NPs a nivel celular y molecular.

La evaluación *in vitro* de las NPs se realiza en cultivos bidimensionales, en los cuales crece un número conocido de células en una placa o caja de cultivo celular. En este tipo de superficies, las células que tienen la capacidad de adherencia a un sustrato crecen sobre este, formando un estrato continuo de células, a esta estructura se le conoce como “monocapa”.

La investigación nanotoxicológica ha demostrado que la toxicidad de los nanomateriales está fuertemente relacionada con el tamaño, forma y dosis de las partículas. Se ha observado que concentraciones bajas de NPs presentan mayor dispersión de estas en el medio en comparación con concentraciones de NPs más altas, lo que ocasiona aglomeraciones de estas de tal manera que impiden su ingreso a la célula (Garate-Velez., 2018).

A continuación, se presenta un análisis detallado de estudios recientes que emplean cultivos *in vitro* para explorar las implicaciones que surgen de la interacción entre las NPs y los sistemas biológicos.

11.1 Ensayos para la evaluación de la citotoxicidad de nanomateriales en cultivos *in vitro*

La reactividad química de las NPs más pequeñas les permite ser más bioactivas que las nanopartículas más grandes, con las proteínas y otros componentes del medio (Zhdanov, 2019) y su capacidad para interactuar con las células y los tejidos del organismo son aspectos esenciales que pueden afectar los procesos de internalización del NM y, por lo tanto, la actividad biológica del mismo (Laurent et al., 2012).

De forma muy general se considera que una NPs puede inducir cuatro tipos de respuestas en las células (Juárez-Moreno et al., 2020):

a. Cambios en la morfología celular e internalización

La mayoría de las NPs se internalizan en las células mediante transporte activo (micro y macropinocitosis), la acumulación de estas dentro de una célula puede verse influenciada por varios factores, incluida la concentración, el tiempo de incubación, así como la modificación de la superficie, el tamaño y la forma de las nanopartículas. En células de cáncer de páncreas, se observó una mayor acumulación de NPs con un tamaño de 20 nm (Trono et al., 2011). Por otro lado, las NPs de mayor tamaño tienden a la aglomeración y posterior sedimentación, por lo que generan problemas al considerar la toxicidad dependiente del tamaño y la dosis (Murdock et al., 2008; Teegarden et al., 2007). La formación de aglomerados se debe en parte a interacciones entre partículas como fuerzas de Van Der Waals. Aunque también, pueden formarse por un aumento de concentración de partículas en el disolvente o un cambio del pH o de la fuerza iónica del mismo (Handy et al., 2008).

Tras la internalización de las NPs, las células sufren anomalías en la morfología celular como: inflamación lisosomal, alteraciones en la morfología mitocondrial, alteraciones en el citoesqueleto de actina y tubulina y la señalización asociada a estas moléculas (Ma et al., 2017). Las anomalías en la morfología celular son un indicador cualitativo

importante para verificar los efectos nocivos de las NPs en las células.

b. Cambios en la viabilidad celular (efectos citotóxicos que involucran la muerte y proliferación celular).

La citotoxicidad puede evaluarse en cultivos celulares *in vitro* mediante diferentes métodos, los más utilizados incluyen ensayos colorimétricos que se basan en la medición de un marcador bioquímico para evaluar la actividad metabólica de las células. Los reactivos utilizados en ensayos colorimétricos desarrollan un color en respuesta a la viabilidad de las células, lo que permite la medición colorimétrica de la viabilidad celular mediante espectrofotometría. Los ensayos colorimétricos son aplicables para líneas celulares adherentes o suspendidas, fáciles de realizar y comparativamente económicos (Präbst et al., 2017). A continuación, se explica brevemente el fundamento de los ensayos más utilizados.

- **Ensayo con MTT** (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio): este ensayo determina la función mitocondrial de las células midiendo la actividad de las enzimas mitocondriales como el succinato deshidrogenasa (Stone et al., 2009). En este ensayo, el NADH (nicotinamida adenina dinucleótida) reduce el MTT a formazán, un compuesto de color púrpura e insoluble en agua. Este producto se puede cuantificar mediante la absorbancia de la luz a una longitud de onda específica.

- **Ensayo MTS** (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio): este ensayo se basa en la conversión de una sal de tetrazolio en formazán coloreado mediante la actividad mitocondrial de células vivas. La cantidad de formazán producido depende del número de células viables en cultivo y se puede medir con un espectrofotómetro a 492 nm. Usualmente se considera a este ensayo como un ensayo de MTT de un solo paso, ya que elimina los pasos intermedios que se realizan con el MTT (Aslantürk, 2017).

- **Ensayo XTT** (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-carboxanilida-2H-tetrazolio, sal monosódica): el ensayo XTT se utiliza para analizar la proliferación celular y se basa en la capacidad de reducción de la sal de tetrazolio XTT a compuestos de formazán de color naranja por parte de células metabólicas activas. El formazán de color naranja es soluble en agua y su intensidad se puede medir con un espectrofotómetro. El procedimiento de este ensayo incluye el cultivo celular en placas multipocillos, la adición del reactivo XTT y la incubación durante 2 a 24 horas. Durante el tiempo de incubación, se forma un color naranja y la intensidad del color se puede medir con un espectrofotómetro (Scudiero et al., 1988).

- **Ensayo de LDH** (lactato deshidrogenasa), mide cuantitativamente la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) citosólica estable. Esta enzima se libera de las células dañadas. La LDH es una enzima que normalmente se encuentra dentro del citoplasma celular. Cuando la viabilidad celular se reduce, la permeabilidad de la membrana plasmática aumenta y, por lo tanto, la enzima LDH se libera en el medio de cultivo celular. La LDH liberada se mide con una reacción enzimática

acoplada que da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio (yodonitrotetrazolio (INT)) en formazán de color rojo mediante la diaforasa. La actividad de LDH se determina como oxidación de NADH o reducción de INT durante un período de tiempo definido. El formazán rojo resultante se absorbe máximamente a 492 nm y puede medirse cuantitativamente a 490 nm (Lappalainen et al., 1994).

Por otro lado, existen ensayos fluorométricos para evaluar la viabilidad o citotoxicidad celular, estos ensayos son más sensibles que los ensayos colorímetros, sin embargo, requiere utilizado para evaluar la viabilidad celular. Actúa como un aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones, reemplazando al oxígeno, y se reduce a resorufina dentro de las células. La resorufina es altamente fluorescente y su producción está relacionada con la cantidad de células viables. Esto se mide comúnmente con un fluorómetro lector de microplacas usando filtros de excitación de 560 nm/emisión de 590 nm.

- **Ensayo CFDA-AM** (Diacetato de 5-carboxifluoresceína, éster acetoximetílico): este colorante es un indicador de la integridad de la membrana plasmática. El colorante CFDA-AM es un sustrato de esterasa no tóxico que puede ser convertido por esterases no específicas de células viables de una sustancia no polar, no fluorescente y permeable a la membrana en un tinte polar fluorescente, la carboxifluoresceína (CF). La conversión de CFDA-AM en CF por parte de las células indica la integridad de la membrana plasmática, ya que sólo una membrana intacta puede mantener el medio citoplasmático necesario para soportar la actividad esterasa (Hanthamrongwit et al., 1994).

11.2. Evaluación morfológica e histopatológica de citotoxicidad por nanopartículas.

De acuerdo con Oliveira et al (2014) citado por Araújo et al (2020), para la evaluación histológica de la citotoxicidad por el uso de NPs, se analizan los órganos como hígado, bazo, corazón y riñones considerando la masa, tamaño, cambios de color y lesiones sugerentes de daño en la estructura de estos órganos, así también se analiza si hay necrosis degenerativa y signos de inflamación. La evaluación histopatológica se realiza con cortes delgados del tejido (4 µm de espesor) teñidos con hematoxilina eosina fijados en bálsamo de Canadá (Araújo et al., 2020).

a) Genotoxicidad

Determinan si las NPs pueden causar daño al material genético de las células.

Los ensayos de genotoxicidad se utilizan para determinar el daño que un compuesto químico, principio activo o nanopartícula puede generar sobre el ADN. Los ensayos de genotoxicidad *in vitro* cubren los tres niveles de efectos genotóxicos: los efectos sobre el ADN, las mutaciones genéticas y las aberraciones cromosómicas. Algunos de los ensayos de genotoxicidad *in vitro* más comunes son:

- **Ensayo de micronúcleos (MN)**: es una prueba citogenética exógena y endógena, tiene como ventajas que su realización es sencilla y de bajo costo, induce una mínima invasión y la muestra se obtiene con facilidad. Permite

el uso de un microscopio de fluorescencia, un fluorómetro, un lector de microplacas de fluorescencia o un citómetro de flujo. Los ensayos de este tipo más utilizados se enlistan a continuación.

- **Ensayo Alamar Azul**: el ensayo alamar azul se basa en la conversión del colorante azul no fluorescente resazurina, que se convierte en resorufina rosa fluorescente mediante enzimas mitocondriales y otras enzimas como las diaforasas (O'Brien et al., 2000). La resazurina es un indicador redox

observar cuerpos extracelulares formados en la mitosis en la transición de metafase a anafase. Detecta muerte celular, daño al DNA (Torres-Bugarín 2013 y 2016).

Este ensayo utiliza células de mamíferos y se utiliza para detectar la presencia de micronúcleos (MN), que son fragmentos de cromosomas que no se separan correctamente durante la división celular. Este ensayo se utiliza para detectar la presencia de agentes genotóxicos que pueden causar daño cromosómico (D'Costa et al., 2019). Los MN se pueden cuantificar mediante microscopía o citometría de flujo

- **Ensayo Cometa**: Esta técnica se utiliza para evaluar la genotoxicidad en el ADN de células aisladas bajo un campo eléctrico. Se describió en 1984 por Östling y Johanson quienes utilizando un pH neutro y radiación ionizante identificaron rupturas de la doble cadena.

En 1988 esta técnica fue modificada para realizarla en medio alcalino con pH mayor a 13 (Singh et al. en 1988), con este cambio es posible identificar rupturas de cadena sencilla y sitios sensibles al álcali. Se basa en la capacidad del ADN dañado para migrar hacia el ánodo durante la electroforesis, lo que produce una "cola" que se asemeja a un cometa. Este ensayo se utiliza para evaluar la presencia de daño en el ADN de células expuestas a agentes genotóxicos (Collins, 2004; Olive & Banáth, 2006). Esta prueba es considerada por el "International Workshop on Genotoxicity Test Procedures" (Tice et al., 2000)) como la adecuada para identificar sustancias con actividad genotóxica potencial.

b) Activación de la respuesta inmune

Cuando las NPs ingresan al organismo, el sistema inmunológico las identifica como invasores, de manera análoga a su respuesta frente a patógenos. Esta detección puede provocar respuestas inmunológicas que estimulan o suprimen el sistema, potencialmente conduciendo a condiciones inflamatorias. Sin embargo, cuando las NPs se reconocen como propias o hay ausencia de reconocimiento inmunológico, esto representa un área importante de interés en el campo de la administración de fármacos (Zolnik et al., 2010).

Tabla 2. Nanomateriales utilizados en modelos *in vitro*. Se presentan las características de los NMs, la línea celular empleada, pruebas toxicológicas y efectos observados.

Tipos	Tamaño y forma	Dosis	Línea celular	Pruebas toxicológicas	Efecto observado	Referencia
CNP-Fe	-	50 y 400 µg/mL	HEK293, C33A	Producción de EROs, apoptosis y ciclo celular mediante citometría de flujo	Generación de EROs y apoptosis.	(Mu et al., 2010)
PECA	63.95 nm; esferas	4.85 mg, 0.485 mg	VERO, HepG2	Evaluación del metabolismo celular mediante el ensayo de reducción de MTT	Disminución de viabilidad a alta concentración	(Díaz-Torres & Ramírez-Noguera, 2016)
Np-TiO ₂	25 nm	10-200 µg/µL	HepG2	Cuantificación de formación de micronúcleos por citometría de flujo	Mayor número de MN en concentración de 20 µg/µL	(Amoraga, S. S., 2018)
NPs-Fe ₃ O ₄	11.4 nm; semiesferas	5, 15, 40 µg/µL	rBMECS	Evaluación del metabolismo celular mediante el ensayo de reducción de MTS	Mayor toxicidad a bajas concentraciones (5 y 15 µg/µL)	(Gárate-Vélez, 2018)
NP-PVA	350 – 500 nm; esferas	300 µg/mL	RAW 264.7	Detección de producción de IL-6 mediante ELISA	Reducción de IL-6	(Casey et al., 2019)
NP-Au / <i>Hypoxis hemerocallidea</i>	26 ± 2 nm; esferas	1, 2, 4, 8, 16, 32 nM	THP-1, NK-92	Determinación de citocinas proinflamatorias mediante ELISA	Reducción de citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6 y TNF-α; IFN-γ, respectivamente)	(Elbagory et al., 2019)
NPs-Ag & NPs-TiO ₂	37 y 24 nm; poliedros	5, 15, 25, 50, 100 µg/µL	HUVEC	Evaluación del metabolismo celular mediante el ensayo de reducción de MTS	Efecto dosis dependiente (IC50% =15 µg/µL)	(Cázares Morales, 2020)
NP-Quitosano	127 – 292 nm; esferas	312 a 5000 µg/mL	RAW 264.7	Cuantificación de la producción de EROs mediante fluorimetría (DCFH-DA)	Producción de EROs de manera dependiente de la concentración (a partir de 156 µg/ml). No inducen una respuesta de citoquinas proinflamatorias	(Jesús et al., 2020)
NP-Zr	-	10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL	V-79	Evaluación del metabolismo celular mediante el ensayo de reducción de MTT, daños en el ADN en el ensayo cometa	Las NPs-Zr mostraron baja citotoxicidad. Generaron daños en el ADN en concentraciones altas	(Mourya et al., 2023)

Se encuentran disponibles muchas líneas celulares humanas y de ratón, generalmente derivadas de linfomas o leucemias, representando todo tipo de células inmunes innatas y adaptativas (linfocitos T y B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, NK, células endoteliales, etc). La línea celular A549, derivada de adenocarcinoma de pulmón, está dotada de marcadores celulares del epitelio pulmonar tipo II, lo que sirve como un modelo *in vitro* útil para estudiar los efectos biológicos de las partículas. Múltiples tipos de macrófagos (NR8383, J774, RAW264.7 y THP-1) son modelos celulares bien caracterizados porque los macrófagos fagocitan partículas, secretan citoquinas específicas, sintetizan lisozima y expresan receptores Fc (Taciak et al., 2018). En la tabla 2 se resumen los trabajos donde se han utilizado NPs, así como los efectos observados.

11.3 Nanomateriales utilizados en modelos *in vitro*.

Existen estudios a partir del 2010 hasta la fecha con nanomateriales de carbono, polietilenoacrilato, y polialcohol vinílico en los cuales se han realizado diferentes pruebas toxicológicas utilizando diferentes líneas celulares.

12. Conclusiones

Las pruebas descritas anteriormente son algunas de las que se utilizan en el campo de la nanotecnología. Es importante seleccionar la que se debe utilizar dependiendo de la NP, y la aplicación que tendrá esta, así como también el escenario en el que estará expuesta. Es también muy importante considerar que las investigaciones deben ser éticas y seguras para poder analizar los riesgos relacionados con la NPs.

En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de NPs, que ofrecen ventajas en su aplicación tecnológica y resultan prometedoras para su utilización en el área biomédica y de inocuidad de los alimentos. De estos desarrollos de NPs existen algunos estudios *in vitro* e *in vivo*, que evidencian un efecto de bioacumulación y biotransformación en células y tejidos.

También continuamente se siguen desarrollando nuevas herramientas toxicológicas para el estudio de la biocinética de las NPs esto permitirá determinar de forma más precisa y fiable los mecanismos de acción, así como los efectos a mediano y largo plazo con el fin de pronosticar los riesgos adicionales del uso de las NPs en el área biomédica y de inocuidad alimentaria.

Conflicto de intereses

El autor y los coautores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Referencias

Álvarez-Monsiváis, M. E., Cruz-Ortiz, B. R., Olivas-Armendáriz, I., Sáenz-Galindo, A., Solís-Rosales, S. G., & Múzquiz-Ramos, E. M. (2022). Bioactividad y biocompatibilidad de compósitos de zirconia estabilizada

con Y/hidroxiapatita-Cu, Fosfato Tricálcico-Ag o Fosfato Tricálcico-Ga. *Afinidad*, 79 (596).

Amoraga, L. (2018). Genotoxicidad asociada a la exposición de células hepáticas a nanopartículas de dióxido de titanio. Tesis de Maestría. Universidad de Coruña. España.

Araújo, J. T. C., Lima, L. A., Vale, E. P., Martin-Pastor, M., Lima, R. A., Silva, P. G. B., & Sousa, F. F. O. (2020). Toxicological and genotoxic evaluation of anacardic acid loaded-zein nanoparticles in mice. *Toxicology reports*, 7, 1207–1215. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.024>

Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I., & Garbisu, C. (2003). Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on environmental health*, 18(1), 65-73. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.1.65>

Aslantürk, Ö. S. (2017). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. En *Genotoxicity—A Predictable Risk to Our Actual World*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>

Balls, M., Berg, N., Bruner, L. H., Curren, R. D., de Silva, O., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Fentem, J. H., Liebsch, M., Ohno, Y., Prinsen, M. K., Spielmann, H., & Worth, A. P. (1999). Eye irritation testing: the way forward. The report and recommendations of ECVAM Workshop 34. *ATLA* 27: 53-77.

Barnard, A. S. (2010). Modelling of nanoparticles: approaches to morphology and evolution. *Reports on Progress in Physics*, 73(8), 086502. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/73/8/086502>

Baxter, C. S., Ross, C. S., Fabian, T., Borgerson, J. L., Shawon, J., Gandhi, P. D., & Lockey, J. E. (2010). Ultrafine particle exposure during fire suppression—is it an important contributory factor for coronary heart disease in firefighters?. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 52(8), 791-796

Begum, G., Rao, J. V. y Srikanth, K. (2006). Oxidative stress and changes in locomotor behavior and gill morphology of *Gambusia affinis* exposed to chromium. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88: 355365. <https://doi.org/10.1080/02772240600635985>

Bruinen de Bunin, Y., Eskes, C., Langezaal, I., Coecke, S., Kinsner-Ovaskainen, A., Hakkinen, P. J. (2009). Testing methods and toxicity assessment (including alternatives). In: *Information resources in Toxicology*. Elsevier, 497-513. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373593-5.00060-4>

Carriquiriborde, P. (2021). Principios de Ecotoxicología. Libros de Cátedra (pp. 268–285). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/118183>

Casey, L. M., Kakade, S., Decker, J. T., Rose, J. A., Deans, K., Shea, L. D., & Pearson, R. M. (2019). Cargo-less

- nanoparticles program innate immune cell responses to toll-like receptor activation. *Biomaterials*, 218, 119333. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119333>
- Castañeda-Yslas, I. J., Arellano-García, M. E., García-Zarate, M. A., Ruíz-Ruiz, B., Zavala-Cerna, M. G., & Torres-Bugarín, O. (2016). Biomonitoring with micronuclei test in buccal cells of female farmers and children exposed to pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, México. *Journal of toxicology*, 2016, 7934257. <https://doi.org/10.1155/2016/7934257>
- Castillo-Salas, D. L., Gaytán-Oyarzun, J. C., López-Herrera, M., & Sánchez-Olivares, M. A. (2022). Pez cebra (*Danio rerio*): modelo experimental en la evaluación de compuestos xenobióticos. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10(19), 61-65.
- Cázares Morales, A. (2020). Estudio comparativo de la toxicidad por la exposición a nanopartículas de Ag - TiO₂ en embrión de pez cebra y en células endoteliales de humano. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Departamento de Toxicología. México. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3638>
- Cheng, K., Yang, M., Zhang, R., Qin, C., Su, X., & Cheng, Z. (2014). Hybrid nanotrimers for dual T1 and T2-weighted magnetic resonance imaging. *ACS nano*, 8(10), 9884-9896. <https://doi.org/10.1021/nn500188y>
- Covarrubias-López, A. C. (2018). Toxicidad del plomo en el pez cebra (*Danio rerio*). Tesis de posgrado. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue. México.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249-261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Chávez-Güitrón, L. E., Garrido-Hernández, A., del Carmen Salinas-Pérez, F., & García-Domínguez, G. (2022). Evaluación in vitro de hemocompatibilidad en HA sintetizada hidrotermalmente. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10 (Especial 7), 139-144. <https://doi.org/10.3390/ma14216522>
- Chia, S. L., Tay, C. Y., Setyawati, M. I. y Leong, D. T. (2015). Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles. *Small*, 11, 702-712. <https://doi.org/10.1002/sml.201401915>
- D'Costa, A., Praveen Kumar, M. K., & Shyama, S. K. (2019). Chapter 18 - Genotoxicity assays: The micronucleus test and the single-cell gel electrophoresis assay. En S. N. Meena & M. M. Naik (Eds.), *Advances in Biological Science Research* (pp. 291-301). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00018-5>
- Díaz-Torres, R., & Ramírez-Noguera, P. (2016). Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de polietilenoacrilato. *Rev Mex Cienc Farm.* 47(1), 43-54.
- Elbargory, A. M., Hussein, A. A., & Meyer, M. (2019). The In Vitro Immunomodulatory Effects Of Gold Nanoparticles Synthesized From Hypoxis hemerocallidea Aqueous Extract And Hypoxoside On Macrophage And Natural Killer Cells. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9007-9018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S216972>
- Farrera, C., Torres Andón, F., & Feliu, N. (2017). Carbon nanotubes as optical sensors in biomedicine. *ACS nano*, 11(11), 10637-10643. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b06701>
- Estévez, J., Vilanova, E. y Sogorb, M. A. (2019). Biomarkers for testing toxicity and monitoring exposure to xenobiotics. En Gupta, R. C. (Ed.), *Biomarkers in Toxicology*, Academic Press. 1165-1174
- Gagner, J. E., Shrivastava, S., Qian, X., Dordick, J. S., & Siegel, R. W. (2012). Engineering Nanomaterials for Biomedical Applications Requires Understanding the Nano-Bio Interface: A Perspective. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(21), 3149-3158. <https://doi.org/10.1021/jz301253s>
- Gárate-Vélez, L. (2018). Toxicidad de nanopartículas magnéticas en un modelo *in-vitro* de barrera hematoencefálica. Tesis de Maestría. <https://repositorio.ipicyt.edu.mx///handle/11627/4050>
- García Domínguez, G., Díaz De La Torre, S., Chávez Güitrón, L., Vergara Hernández, E., Reyes Miranda, J., Quezada Cruz, M., & Garrido Hernández, A. (2021). Effect of the structural and morphological properties of surfactant-assisted hydroxyapatite on dermal irritation and antibacterial activity. *Materials*, 14(21), 6522. <https://doi.org/10.3390/ma14216522>
- Gershman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science (New York, N.Y.)*, 119(3097), 623-626. <https://doi.org/10.1126/science.119.3097.623>
- Sagasti, M. T. G. (2014). Identificación y selección de biomarcadores de exposición temprana a metales en *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* mediante técnicas de expresión génica (Tesis doctoral, Universidad del País Vasco= Euskal Herriko Unibertsitatea).
- Hadrup, N., Sharma, A. K., & Loeschner, K. (2018). Toxicity of silver ions, metallic silver and silver nanoparticle materials after *in vivo* dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 98, 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.007>

- Handy, R. D., von der Kammer, F., Lead, J. R., Hassellöv, M., Owen, R., & Crane, M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology (London, England)*, 17(4), 287-314. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0199-8>
- Hanthamrongwit, M., Reid, W. H., Courtney, J. M., & Grant, M. H. (1994). 5-Carboxyfluorescein Diacetate as a Probe for Measuring the Growth of Keratinocytes. *Human & Experimental Toxicology*, 13(6), 423-427. <https://doi.org/10.1177/096032719401300610>
- Hussain, S. M., Warheit, D. B., Ng, S. P., Comfort, K. K., Grabinski, C. M. y Braydich-Stolle, L. K. (2015). At the crossroads of nanotoxicology in vitro: Past achievements and current challenges. *Toxicological Sciences*, 25, Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv106>
- Hashempour, S., Ghanbarzadeh, S., Maibach H.I., Ghorbani, M & Hamishehkar, H. (2019). Skin toxicity of topically applied nanoparticles. *Therapeutic delivery*, 10, 383-396. <https://doi.org/10.4155/tde-2018-0060>
- Itagaki, H., Hagino, S., Kato, S. (1995) CAM-TBS test. The ERGATT/FRAME database of in vitro techniques (INVITTOX) IP-108:1-6.
- Jesus, S., Marques, A. P., Duarte, A., Soares, E., Costa, J. P., Colaço, M., Schmutz, M., Som, C., Borchard, G., Wick, P., & Borges, O. (2020). Chitosan Nanoparticles: Shedding Light on Immunotoxicity and Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00100>
- Juárez-Moreno, K., Angüis Delgado, K., Palestina Romero, B., Vázquez-Duhalt, R., Juárez-Moreno, K., Angüis Delgado, K., Palestina Romero, B., & Vázquez-Duhalt, R. (2020). Evaluando la toxicidad de nanomateriales en modelos celulares tridimensionales. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 13(25), 157-171. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69608>
- Knight DJ, Breheny D (2002) Alternatives to animal testing in the safety evaluation of products. *ATLA* 30:7-22.
- Lagendijk, J., Ubbink, J. B., & Vermaak, W. J. (1996). Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress. *Journal of lipid research*, 37(1), 67-75. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37636-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37636-7)
- Lalwani, G., Gopalan, A., D'Agati, M., Srinivas Sankaran, J., Judex, S., Qin, Y. X., & Sitharaman, B. (2015). Porous three-dimensional carbon nanotube scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(10), 3212-3225. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35449>
- Lappalainen, K., Jääskeläinen, I., Syrjänen, K., Urtili, A., & Syrjänen, S. (1994). Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharmaceutical Research*, 11(8), 1127-1131. <https://doi.org/10.1023/a:1018932714745>
- Laurent, S., Burtea, C., Thirifays, C., Häfeli, U. O., & Mahmoudi, M. (2012). Crucial ignored parameters on nanotoxicology: The importance of toxicity assay modifications and «cell vision». *PloS One*, 7(1), e29997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029997>
- Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2020). Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery. *Advanced functional materials*, 30(2), 1902634. <https://doi.org/10.1002/adfm.201902634>
- Linares, Y. D., Castro, O. B., Rodríguez, R. P., García, A. D., Loaces, E. L., Álvarez, R. F. (2017). Ecotoxicidad de nanopartículas metálicas y superparamagnéticas de óxido de hierro en dos especies. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 46(2), 102-12.
- Lüepke NP (1985) Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd Chem Toxic* 23:287-291.
- Ma, X., Hartmann, R., Jimenez de Aberasturi, D., Yang, F., Soenen, S. J. H., Manshian, B. B., Franz, J., Valdeperez, D., Pelaz, B., Feliu, N., Hampp, N., Riethmüller, C., Vieker, H., Frese, N., Götzhäuser, A., Simonich, M., Tanguay, R. L., Liang, X.-J., & Parak, W. J. (2017). Colloidal Gold Nanoparticles Induce Changes in Cellular and Subcellular Morphology. *ACS Nano*, 11(8), 7807-7820. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01760>
- Meseguer, J., Esteban Abad, M. D. L. Á., Mulero Méndez, V. F., Cuesta Peñafiel, A., & Sepulcre Cortés, M. P. (2015). Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Eubacteria*, n°34, 2015.
- Madariaga, Y. G., Alfonso, O. C., Álvarez, C. S., Martínez, J. L. M., Espin, A. P., & Prado, E. A. S. (2006). Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método in vitro en sustitución de la prueba en conejos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(3), 1-7
- Meng, L., Turner, A. P., & Mak, W. C. (2021). Conducting polymer-reinforced laser-irradiated graphene as a heterostructured 3D transducer for flexible skin patch biosensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(45), 54456-54465. <https://doi.org/10.1021/acsaami.1c13164>
- Moreno, F. M. (2013). Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*). Tesis de licenciatura. Biología Celular en Toxicología Ambiental. Universidad del País Vasco. Lejona, España.
- Mourya, D., Dubey, K., Jha, S., Maurya, R., & Pandey, A. K. (2023). In vitro effects of zirconia nanoparticles: uptake, genotoxicity, and mutagenicity in V-79 cells. *Biological*

- Trace Element Research. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03739-4>
- Moya, M. T. F., Díaz, M. J., Alonso, M. L., García, J., & Martí, M. A. C. (2011). Nanotoxicología ambiental: retos actuales. *Medicina balear*, 26(2), 36-46.
- Mu, Q., Yang, L., Davis, J. C., Vankayala, R., Hwang, K. C., Zhao, J., & Yan, B. (2010). Biocompatibility of polymer grafted core/shell iron/carbon nanoparticles. *Biomaterials*, 31(19), 5083-5090. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.020>
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 101(2), 239-253. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm240>
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M. y Rojas del Castillo, E. (2013). Biomarkers of exposure for environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 29(1), 117-140
- Nohynek, G. J., Lademann, J., Ribaud, C., & Roberts, M. S. (2007). Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical reviews in toxicology*, 37(3), 251-277. <https://doi.org/10.1080/10408440601177780>
- Normann, C., Moreira, J. C. F. y Cardoso, V. V. (2008). Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecotomus* exposed to potassium dichromate. *African Journal of Biotechnology*, 7: 893-896.
- 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>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421-5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
- Oner, M., Atli, G. y Canli, M. (2008). Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 360-366. <https://doi.org/10.1897/07-281R.1>
- Ostling, O y Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)
- Pacifici, R. E., & Davies, K. J. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37(1-3), 166-181 <https://doi.org/10.1159/000213257>
- Pérez PL, Pérez J. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 29(3): 192-198.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1601, 1-17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Ooi, C. H., Ling, Y. P., Abdullah, W. Z., Mustafa, A. Z., Pung, S. Y., & Yeoh, F. Y. (2019). Physicochemical evaluation and *in vitro* hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(4), 1-10.
- Ortega Sanz, I. (2017). Bioensayos con *Cucumis sativus* para el estudio de la toxicidad de suelos contaminados con metales. Evaluación de potenciales biomarcadores de exposición a metales. Trabajo de grado. Universidad del País Vasco.
- Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D. X., Garcia, J. J., Manchester, L. C., Karbownik, M. y Calvo, J. R. (2000). Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environmental Health Perspectives*, 108: 399-402. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108399>
- Pérez Gastell, P. L., & Pérez de Alejo, J. L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192-198.
- Rocha, P. S., & Umbuzeiro, G. D. A. (2022). AOPs são o futuro da ecotoxicologia?. *Química Nova*, 45, 132-136} <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170813>.
- Rojas-Muñoz, A., Miana, B. A. e Izpisúa, B. J. C. (2007). El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y Ciencia*. 366, 62- 69.
- Ryman-Rasmussen, J. P., Riviere, J. E., & Monteiro-Riviere, N. A. (2006). Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicological sciences*, 91(1), 159-165. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj122>
- Sánchez-Olivares, M. A., Gaytán-Oyarzún, J. C., Gordillo-Martínez, A. J., Prieto-García, F. y Cabrera-Cruz, R. B. E. (2021). Toxicity and teratogenicity in zebrafish *Danio rerio* embryos exposed to chromium. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(2), 289-298. <https://dx.doi.org/10.3856/vol49-issue2-fulltext-2561>

- Seyfert, U. T., Biehl, V., & Schenk, J. (2002). In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular engineering*, 19(2-6), 91-96
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 48(17), 4827-4833.
- Shaw, P., Mondal, P., Bandyopadhyay, A. y Chattopadhyay, A. (2019). Environmentally relevant concentration of chromium induces nuclear deformities in erythrocytes and alters the expression of stress-responsive and apoptotic genes in brain of adult zebrafish. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135622>
- Seyfert, U. T., Biehl, V. & Schenk, J. (2002). In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular engineering*, 19(2-6), 91-96
- Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- Souza, W., Piperni, S. G., Laviola, P., Rossi, A. L., Rossi, M. I. D., Archanjo, B. S., Ribeiro, A. R. (2019). The two faces of titanium dioxide nanoparticles bio-camouflage in 3D bone spheroids. *Scientific Reports*, 9, 9309. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45797-6>
- Spielmann, H. (1992) HET-CAM Test. The ERGATT/FRAME Databank of in vitro techniques (INVITTOX) IP-47;1-9.
- Steiling, W. (1994) The hen's egg test on the chorioallantoic membrane. The ERGATT/FRAME database of in vitro techniques (INVITTOX) IP-96: 1-23.
- Stone, V., Johnston, H., & Schins, R. P. F. (2009). Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: Methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(7), 613-626. <https://doi.org/10.1080/10408440903120975>
- Stern, S. T., & McNeil, S. E. (2008). Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicological sciences*, 101(1), 4-21. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm169>
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLOS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943>
- Teeguarden, J. G., Hinderliter, P. M., Orr, G., Thrall, B. D., & Pounds, J. G. (2007). Pharmacokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 95(2), 300-312. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl165>
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35(3), 206-221 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206:AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206:AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Torres-Bugarín O, Zavala-Cerna MG, Macriz-Romero N, et al. (2013). Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *Residente*. 8(1):4-11.
- Trono, J. D., Mizuno, K., Yusa, N., Matsukawa, T., Yokoyama, K., & Uesaka, M. (2011). Size, Concentration and Incubation Time Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Pancreas Cancer Cells and its Future Application to X-ray Drug Delivery System. *Journal of Radiation Research*, 52(1), 103-109. <https://doi.org/10.1269/jrr.10068>
- Vinardell, M. P. (1994). Métodos in vitro alternativos al test de irritación ocular de Draize. *Revista de toxicología*, 11(2), 75-81.
- Vicenta Paparella, C., Pavesi, A. B., Feldman, R. N., & Bouvet, B. R. (2015). Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Archivos de Medicina Interna*, 37(1), 7-14.
- Vines, J. B., Yoon, J. H., Ryu, N. E., Lim, D. J., & Park, H. (2019). Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. *Frontiers in chemistry*, 7, 167. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>
- Woolley, D & Woolley A. (2008). A guide to practical toxicology: Evaluation, prediction, and risk. CRC Press, London, UK.
- Zhdanov, V. P. (2019). Formation of a protein corona around nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 41, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.12.002>
- Zolnik, B. S., González-Fernández, Á., Sadrieh, N., & Dobrovolskaia, M. A. (2010). Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology*, 151(2), 458-465. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1082>