



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA
SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE
CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE TABACO NT-1”**

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el título profesional
de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

Alberto Zavala Chávez

Director de tesis: D.C. Elda Maria Beltrán Peña

Co-Director de tesis: D.C. Grisel Fierros Romero

Morelia, Michoacán, Octubre 2020



DEDICATORIA

A mis padres, abuelos y hermana.

AGRADECIMIENTOS

D.C Elda María Beltrán Peña

Gracias por la oportunidad brindada, así como la paciencia y confianza depositada.

D.C. María Elena Mellado Rojas y D.C. Grisel Fierros Romero

Por las sugerencias, correcciones y guía en el presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y escuela

Raziel, Brian, Javier, Eli, Vio, Flor y Aranza por acompañarme durante estos años de formación.

A mis padres y hermana

Por siempre creer en mí.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cultivo de tejidos vegetales	3
2.2 Cultivos de células en suspensión.....	8
2.3 Medio de cultivo	9
2.4 Hormonas vegetales o reguladores del crecimiento.....	12
2.5 Obtención de los cultivos de células en suspensión	16
2.6 Línea celular NT-1 como modelo de estudio	19
2.7 Crecimiento celular en organismos eucariontes	20
2.8 Incremento en masa celular	21
2.9 Ciclo celular en organismos eucariontes	22
2.10 Cinéticas de crecimiento en sistemas biológicos cerrados	23
2.11 Nano partículas de plata (AgNPs)	25
2.12 Los nano materiales y su relación con el ambiente.....	26
2.13 Solución de nano partículas de plata (Argovit)	29
2.14 Aplicaciones de las AgNPs Argovit.....	31
2.15 Especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas	34
2.16 AgNPs y generación de ROS	37
2.17 Efecto de las nano partículas de plata en plantas	39
2.18 Efecto de las AgNPs sobre los cultivos celulares en suspensión.....	41
3. JUSTIFICACIÓN	43
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	44
4.1 Hipótesis	44

4.2 Objetivo general.....	44
4.3 Objetivos específicos	44
5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL GENERAL	45
6. MATERIALES Y MÉTODOS	46
6.1 Materiales y reactivos	46
6.2 Métodos	47
6.2.1 Mantenimiento de los cultivos de células en suspensión NT-1.....	47
6.2.2 Lavado de las células NT-1.....	48
6.2.3 Determinación del crecimiento de cultivos de células en suspensión NT-1	48
6.2.4 Cinéticas de crecimiento	49
6.2.5 Volumen del Paquete Celular (VPC).....	49
6.2.6 Peso fresco	49
6.2.7 Peso seco	49
6.2.8 Detección de los niveles de ROS en las células de tabaco NT-1	50
7. RESULTADOS	51
7.1 Efecto de LAS AgNPs sobre el crecimiento de las células en suspensión NT-1	51
7.2 Niveles de ROS en células crecidas en medios suplementados con 50 y 100 µg/ml de AgNPs.....	60
8. DISCUSIÓN	62
9. CONCLUSIÓN	66
10. BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de cultivos de tejidos vegetales.....	5
Figura 2. Obtención de cultivos de células en suspensión.....	9
Figura 3. Estructura química de las fitohormonas.....	15
Figura 4. Origen de los cultivos en suspensión.....	18
Figura 5. Ciclo celular.....	23
Figura 6. Crecimiento de las células TBY-2.....	24
Figura 7. Fuentes comunes de producción de nanomateriales.....	27
Figura 8. Interacción de las AgNPs con el sistema suelo-planta	28
Figura 9. Morfología de las AgNPs (Argovit).....	30
Figura 10. Generación de las diferentes ROS.....	34
Figura 11. Estructura de Lewis y vida media de las diferentes ROS	36
Figura 12. Crecimiento de células NT-1, a 1 y 0.1 μ M de 2,4-D.....	52
Figura 13. Efecto de las AgNPs en células NT-1. Crecimiento con 0.1 μ M de 2,4-D.....	53
Figura 14. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 con 1 y 10 μ g/ml AgNPs (Primer experimento).....	54
Figura 15. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 con 1 y 10 μ g/ml AgNPs (Segundo experimento).....	55
Figura 16. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 con 1 y 10 μ g/ml AgNPs (Tercer experimento).....	56
Figura 17. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 con 100 μ g/ml AgNPs (Primer experimento).....	57

Figura 18. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 con 100 µg/ml AgNPs (Segundo experimento).....	58
Figura 19. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 con 50 µg/ml AgNPs (Primer experimento).....	59
Figura 20. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 con 50 µg/ml AgNPs (Segundo experimento).....	60
Figura 21. Observación de los niveles de ROS con H ₂ DCFDA en cultivos de suspensión de tabaco adicionados con AgNPs.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de Nutrientes del medio Murashige-Skoog.....	10
Tabla 2. Principales fitohormonas y sus funciones.....	13
Tabla 3. Concentraciones efectivas Inhibitorias para las AgNPs.....	26
Tabla 4. Características fisicoquímicas de las AgNPs Argovit.....	30

RESUMEN

Los nanomateriales se consideran uno de los inventos más importantes de la ciencia moderna, el uso de productos que los incorporan se ha incrementado de manera significativa en los últimos años, siendo las nanopartículas de plata (AgNPs) unos de los más utilizados debido a su gran cantidad de aplicaciones. Esto trae consigo el riesgo de una infiltración en el ecosistema a concentraciones que constituyen una amenaza a las diferentes especies biológicas. Las plantas representan un nivel trófico de suma importancia, son la base de la cadena alimenticia y una importante fuente de oxígeno, por lo que sin ellas la vida no existiría tal cual la conocemos. Las técnicas de cultivo de tejidos hacen posible el estudio de sistemas vegetales en ambientes controlados, de manera que son una herramienta extremadamente útil para estudios de crecimiento y desarrollo, embriogénesis, toxicología, genética, entre otros. Los cultivos en suspensión de células de tabaco son un modelo de estudio ampliamente utilizado debido a su crecimiento rápido y alta homogeneidad, dichos cultivos han sido de gran importancia para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la división y elongación celular en plantas. En el presente trabajo se estudió el efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1, demostrando ser tóxicas a partir de 50 µg/ml, acompañado de este efecto se observó un aumento en la concentración de ROS, lo cual sugiere que el efecto tóxico de las AgNPs sobre los cultivos en suspensión parecería estar relacionado con la producción de ROS.

Palabras clave: Toxicidad vegetal por nanomateriales, cultivo de tejidos vegetales, producción de ROS, AgNPs, riesgo ambiental.

ABSTRACT

Nanomaterials are considered one of the most important inventions of modern science, in recent years the use of products incorporating them has increased significantly, being the silver nanoparticles (AgNPs) one of the most used due to its large number of applications. This brings with it the risk of infiltration into the ecosystem at concentrations that pose a threat to different biological species. Plants represent a very important trophic level; they are the base of the food chain and an important source of oxygen, thus without them, life would not exist as we know it. Tissue culture techniques make possible the study of plant systems in controlled environments, becoming an extremely useful weapon for growth and development studies, embryogenesis, toxicology, genetics, among others. Tobacco cell suspension cultures are a widely used model of study due to its rapid growth and high homogeneity, such cultures have been of great importance to study the molecular mechanisms involved in the regulation of cell division and elongation in plants. In the present work, the effect of different concentrations of AgNPs in the growth of NT-1 tobacco cell suspension cultures was studied, proving to be toxic from a concentration of 50 µg/ml, accompanied by this effect an increase in the concentrations of ROS was observed, suggesting that the toxic effect of AgNPs on the cell suspension cultures is related to ROS production.

Keywords: Plant toxicity due to nanomaterials, plant tissue culture, ROS production, AgNPs, environmental risk.

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es actualmente uno de los campos de investigación de mayor prioridad en muchos países debido a su gran potencialidad e impacto económico en diversos campos de la ciencia, la tecnología, el cuidado de la salud, las industrias y la agricultura. La nanotecnología implica la investigación, el desarrollo, la producción y el procesamiento de estructuras y materiales a escala nanométrica denominados nanomateriales (Kabir *et al.*, 2018).

El uso de productos que incorporan nanomateriales se ha incrementado de manera significativa en los últimos años, siendo las nanopartículas de plata (AgNPs) uno de los materiales más utilizados debido a su gran cantidad de aplicaciones. Por ejemplo, en medicina presentan una potente actividad anti-microbiana y anti-inflamatoria (Klasen, 2000). Otras aplicaciones de estas partículas se encuentran en el campo de la electrónica, textiles, pintura, cosméticos, farmacéutica y en la industria alimentaria. Aunque las AgNPs proporcionan muchos beneficios, poco se conoce sobre su toxicidad, no obstante que estos nanomateriales pueden alterar al ambiente debido a que accidentes por derrame o mal manejo de los residuos aumentan el riesgo para los organismos vivos ante la exposición de estas sustancias. Como las plantas son la base de la cadena alimenticia, un infiltramiento de las AgNPs al ecosistema es un peligro constante por sus implicaciones en la agricultura, la seguridad alimentaria y la salud humana (Ma *et al.*, 2010), por lo que se hace necesario monitorear y observar el efecto de estas nanopartículas sobre las plantas y el ecosistema.

Los cultivos de células en suspensión de tabaco, son sistemas relativamente homogéneos y por lo tanto adecuados para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la división y elongación celular. Una gran cantidad de investigaciones sobre la regulación del ciclo celular se ha llevado a cabo en cultivos en suspensión de tabaco porque su comportamiento es comparable a la división continua que se presenta en los meristemas vegetales (Nagata *et al.*, 2004),

su rápido crecimiento y alto porcentaje de sincronización, hacen de esta línea el candidato por excelencia para estudios de biología celular y molecular en plantas. Por lo antes mencionado, los cultivos en suspensión son un modelo de estudio adecuado para evaluar la toxicidad causada por la exposición a las AgNPs.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales hace referencia al conjunto de técnicas *in vitro* usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos. Este tipo de cultivos surgió como un enfoque experimental para demostrar la teoría celular, que establece que todos los organismos vivos están constituidos por células, las unidades básicas de estructura y reproducción, y también el concepto de totipotencia, que se define como el potencial genético de una célula para generar un organismo multicelular completo. Dichas técnicas son de vital importancia en una amplia gama de investigaciones sobre el crecimiento y desarrollo vegetal (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

En 1898 Haberlandt aisló células y tejidos de plantas superiores y los colocó en soluciones nutritivas para estudiar su crecimiento, lo cual dio origen a la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, por lo que se considera el pionero del cultivo *in vitro* de células vegetales (Krikorian y Berquam, 1969). Durante esta época se utilizaron soluciones nutritivas solas o suplementadas con extractos naturales como medio de cultivo inicial, y aunque se obtuvieron resultados importantes, el descubrimiento de reguladores del crecimiento de las plantas o fitohormonas, fue determinante para el establecimiento exitoso de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* (Miller *et al.*, 1955).

Las combinaciones de fitohormonas permitieron estudiar el control de la morfogénesis, un avance clave en el cultivo de tejidos vegetales fue la regeneración de plantas enteras, abriendo la posibilidad de utilizar sistemas *in vitro* para estudiar aspectos fundamentales de la diferenciación celular y desarrollo, y también para la aplicación del cultivo de tejidos con diferentes propósitos (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Dependiendo de la parte de la planta que se cultive, podemos referirlo como cultivo celular de: células gaméticas, en suspensión celular y cultivos de protoplastos; cultivo de tejidos (callos y tejidos diferenciados) y de órganos (cualquier órgano como embriones cigóticos, raíces, brotes y anteras, entre otros). Cada tipo de cultivo se utiliza en diferentes aplicaciones básicas y biotecnológicas. El procedimiento general del cultivo de tejidos consiste en colocar un fragmento de tejido u órgano vegetal, llamado explante, previamente tratado para eliminar microorganismos superficiales (desinfestación) en un medio semisólido suplementado con nutrientes y hormonas vegetales. Posteriormente, el cultivo se incuba bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, que junto con los factores fisicoquímicos y nutricionales conducen a la dediferenciación del explante y a la formación de una masa celular amorfa denominada callo. Dicho tejido calloso puede subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para la formación de órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o transferirse a un medio de cultivo líquido donde forma pequeños agregados celulares en suspensión (Fig. 1) (Calva y Pérez, 2005; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

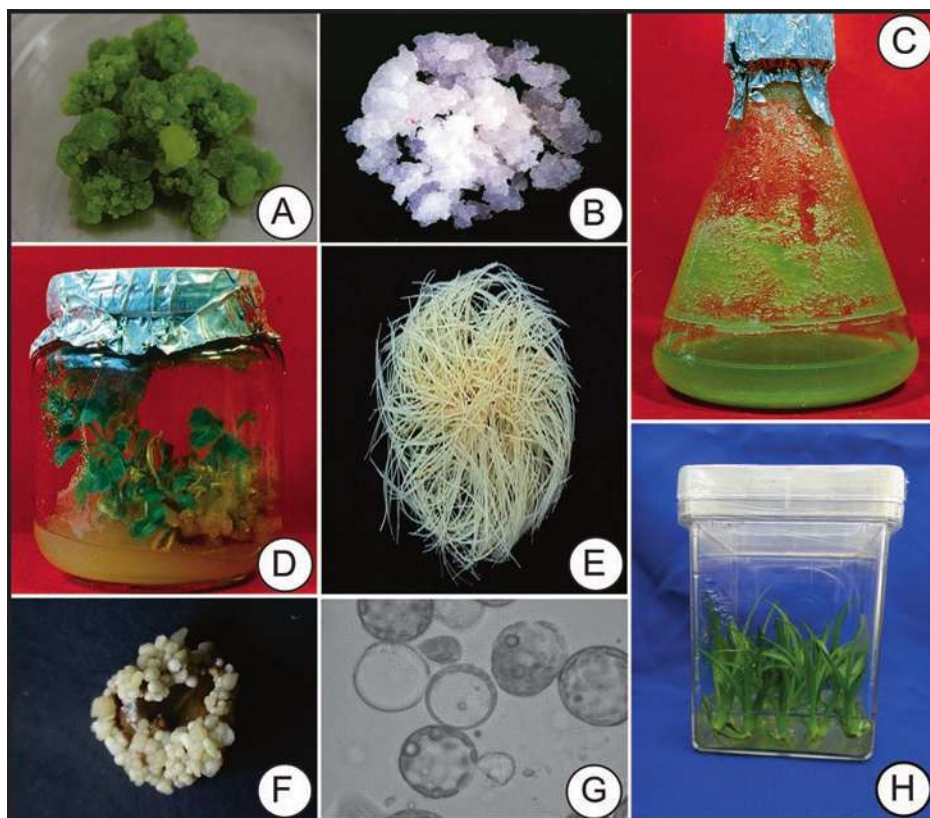


Figura. 1 Ejemplos de cultivos de tejidos vegetales. (A) Callo mixotrófico de *Catharanthus roseus*. (B) Callo heterotrófico de *C. roseus*. (C) Cultivo en suspensión de *C. roseus*. (D) Regeneración de plantas de *Catharanthus roseus* a partir de callos. (E) Cultivo de raíces de *C. roseus*. (F) Embriogénesis somática en *Coffea canephora*. (G) Protoplastos de *C. canephora*. (H) Micropropagación de *Agave fourcroydes* (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Para la obtención de cultivos de tejidos vegetales se deben considerar los siguientes principios básicos: (1) seleccionar un explante apropiado a partir de una planta sana y vigorosa, (2) eliminar la contaminación microbiana de la superficie del tejido, (3) inocular el explante en un medio de cultivo adecuado, y (4) proporcionar al explante en cultivo condiciones ambientales adecuadas y controladas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

La micropropagación o propagación clonal *in vitro* es una de las aplicaciones comerciales más importantes del cultivo de tejidos, se utiliza para superar problemas en la germinación de diferentes especies vegetales y aunque el cultivo

de tejidos se puede aplicar para la micropropagación de casi cualquier especie vegetal, se recomienda solo para aquellas que sean económicamente rentables. También es posible mediante el cultivo de tejidos obtener plantas resistentes a diferentes condiciones de estrés mediante la obtención de cultivos habituados, miles o millones de células constituyen un trozo de callo o una suspensión celular, y pueden someterse a una presión selectiva de diferentes tipos de estrés para aislar células resistentes en condiciones controladas. Las células resistentes recuperadas pueden regenerar plantas resistentes completas al cultivarse en un medio adecuado. De esta forma, es posible generar plantas resistentes a la sequía, la salinidad, el frío o al estrés biótico que afecta con frecuencia el rendimiento del cultivo (Lestari, 2006).

Otra manera de obtener plantas con características específicas, es mediante el uso de técnicas de ingeniería genética, el uso de sistemas de cultivo de tejidos vegetales combinado con técnicas de biología molecular recombinante hace posible la ingeniería genética vegetal, cuyo objetivo es manipular el material genético de diferentes organismos de manera que se obtengan secuencias genéticas específicas que codifiquen para funciones o rasgos que confieran características particulares cuando se introducen e integran en el genoma de la planta (Todaka *et al.*, 2015). La transformación genética se ha logrado con cultivos importantes como maíz, trigo, algodón, arroz, soja, entre otros. Por ejemplo, el arroz (*Oryza sativa* L.) que es uno de los cereales más importantes del mundo, requiere de grandes cantidades de agua para su producción, respecto a otros cultivos. La producción de un kg de semillas de arroz requiere de 3,000 a 5,000 litros de agua, mientras que menos de la mitad de ésta cantidad es necesaria para obtener un kg de semillas de maíz o de trigo (Singh *et al.*, 2002).

Evidencias experimentales han demostrado que los factores de transcripción DREB del arroz, funcionan como reguladores importantes en las respuestas a la sequía independiente del ácido abscísico (ABA). El genoma del arroz contiene cinco genes *DREB2*, dos de los cuales, *OsDREB2A* y *OsDREB2B*, están regulados

positivamente por el estrés abiótico (Matsukura *et al.*, 2010). Se ha descubierto que las plantas de arroz transgénicas que sobreexpresan estos dos genes presentan una mayor tolerancia a la sequía (Chen *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2011). Éste cereal es el alimento básico de cientos de millones de personas y la porción comestible del grano de arroz, el endospermo, se compone de almidón y cuerpos proteicos, pero carece de nutrientes esenciales para la salud como los carotenoides, que exhiben actividad de provitamina A. Por lo tanto, el arroz como alimento básico principal contribuye a la deficiencia de vitamina A, un problema de salud pública en al menos 26 países, incluidas áreas densamente pobladas de Asia, África y América Latina. Gracias al éxito en la transformación genética del arroz y a la caracterización de la vía biosintética de carotenoides, fue posible introducir los genes que codifican para las enzimas implicadas en la vía de formación de β -caroteno; la fitoeno sintasa, fitoeno desaturasa, zeta-caroteno desaturasa y licopeno β -ciclase (Ye *et al.*, 2000). La línea conocida como arroz dorado, tiene el potencial de combatir la deficiencia de vitamina A en países donde el arroz es la principal fuente de alimento. Otro ejemplo, el maíz Bt modificado genéticamente con el gen *CRY1AB*, expresa toxinas insecticidas derivadas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que matan las plagas de lepidópteros que se alimentan de estas plantas (Saxena *et al.*, 1999); con esta tecnología, se espera una reducción en la aplicación de insecticidas tóxicos para el control de plagas mediante el uso de plantas transgénicas resistentes a insectos (Gatehouse, 2008; Green y Owen, 2011). Aún se espera que la ingeniería genética contribuya al desarrollo de cultivos transgénicos con mayor valor nutricional o nutraceutico o resistentes a enfermedades causadas por hongos, bacterias o virus (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

El estudio de las ciencias Ómicas, como la genómica (estudio de la estructura, función y regulación de genes, y técnicas relacionadas), la transcriptómica (estudio del transcriptoma o el conjunto de genes que se transcriben en un organismo), la proteómica (estudio del conjunto de proteínas traducidas en un organismo) y la metabolómica (estudio de todos los metabolitos presentes en un organismo) se han convertido en herramientas esenciales para la investigación de los procesos

biológicos en las plantas. El conocimiento sobre los genomas, transcriptomas, proteomas y metabolomas de las plantas ha tenido un impacto en la comprensión de procesos de desarrollo complejos, como la organogénesis, embriogénesis o desdiferenciación *in vitro*, además de los cambios genéticos inducidos durante las condiciones *in vitro* (Neelakandan y Wang, 2012; Wickramasuriya y Dunwell, 2015). La metabolómica además, puede ser útil para investigar el metabolismo secundario no solo durante los procesos morfogénéticos, sino principalmente en cultivos de células, tejidos y órganos de especies vegetales que producen metabolitos secundarios de interés industrial y farmacéutico (Imin *et al.*, 2005). Por tanto, las ómicas se han convertido en herramientas fundamentales para el estudio de los procesos biológicos básicos en las plantas y serán de gran beneficio en la investigación de procesos morfogénéticos *in vitro* y facilitarán el establecimiento de protocolos de regeneración de plantas *in vitro* más eficientes al identificar y caracterizar los genes que controlan la diferenciación y el desarrollo (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

2.2 Cultivos de células en suspensión

Los cultivos en suspensión que provienen de un callo consisten de células vegetales aisladas y dispuestas en racimos. Una porción del callo se transfiere a medio líquido, el cual se incuba con agitación constante; el mantenimiento de estos cultivos se consigue tomando una alícuota bajo condiciones de esterilidad que se inocula a medio nuevo (Fig. 2) (Franklin y Dixon, 1994; Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006). Las células vegetales bajo estas condiciones presentan características con ventajas únicas, como homogeneidad de la población, control de parámetros extracelulares y la continua disponibilidad de biomasa. Un cultivo primario, que se origina a partir de células, tejidos meristemáticos u órganos que provienen directamente del organismo, muere después de varios subcultivos; mientras que una línea celular originada a partir de un cultivo primario, es perenne (Nagata *et al.*, 2004).

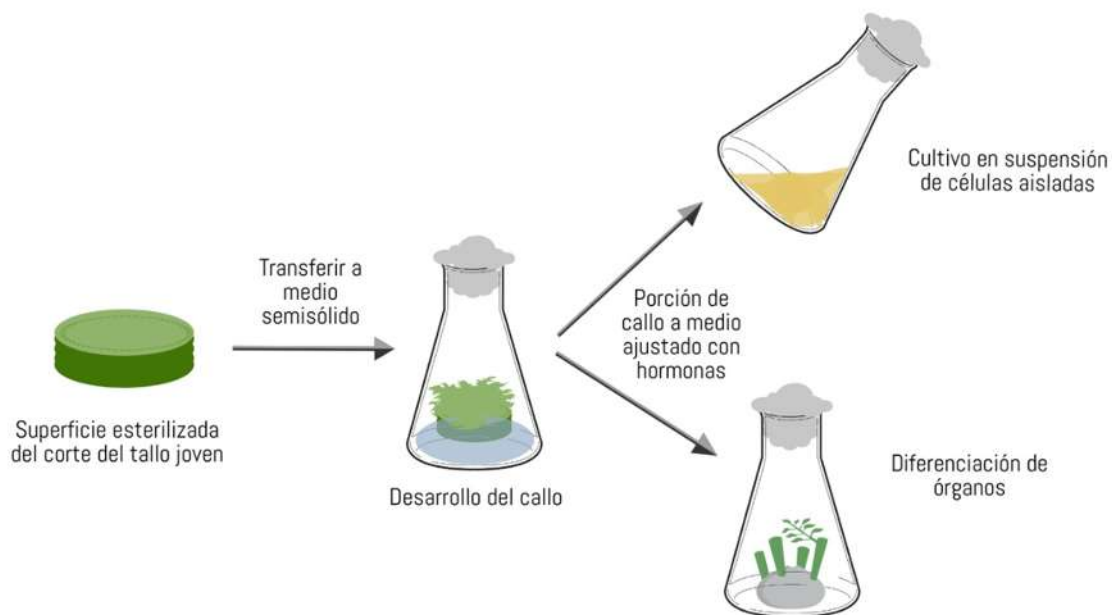


Figura 2. Obtención de cultivos de células en suspensión. Un fragmento de tejido joven con zonas meristemáticas activas, se transfiere a un medio semisólido nutritivo. Posteriormente, se desarrolla una masa de tejido indiferenciado conocida como callo, del cual una porción se transfiere a un medio líquido suplementado con fitohormonas (auxinas sintéticas) y vitaminas (modificado de Dixon, 1985).

2.3 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es un factor determinante para el crecimiento de un cultivo vegetal (White, 1963). Los primeros medios utilizados en los cultivos de células y tejidos vegetales fueron semi-sintéticos y frecuentemente contenían extractos o complejos orgánicos como agua de coco, hidrolizado de caseína y extracto de levadura (Gamborg *et al.*, 1976). Actualmente, la mayoría de los medios de cultivo tienen una composición conocida y están constituidos básicamente por cinco grupos de ingredientes que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos de nutrientes del medio Murashige-Skoog (Dixon, 1985).	
Constituyente	Molaridad en el medio
Nutrientes Inorgánicos mayores	
NH₄NO₃	2.06×10^{-2}
KNO₃	1.88×10^{-2}
CaCl₂. 2H₂O	3.00×10^{-3}
MgSO₄. 7H₂O	1.50×10^{-3}
KH₂PO₄	1.25×10^{-3}
Elementos traza	
KI	5.00×10^{-6}
H₃BO₃	1.00×10^{-4}
MnSO₄.4H₂O	9.99×10^{-5}
ZnSO₄. 7H₂O	2.99×10^{-5}
Na₂MoO₄. 2H₂O	1.00×10^{-6}
CuSO₄. 5H₂O	1.00×10^{-7}
CoCl₂. 6H₂O	1.00×10^{-7}
Fuente de Hierro	
FeSO₄. 7H₂O	1.00×10^{-4}
Na₂ EDTA. 2H₂O	1.00×10^{-4}
Suplementos Orgánicos	
Myo-Inositol	4.90×10^{-4}
Acido nicotínico	4.66×10^{-6}
HCl-Piridoxina	2.40×10^{-6}
HCl-Tiamina	3.00×10^{-7}
Glicina	3.00×10^{-5}
Fuente de Carbono	
Sacarosa	8.80×10^{-2}

El medio Murashige-Skoog (MS) es uno de los más usados para el establecimiento de los cultivos de células vegetales, debido a que es adecuado para el crecimiento de una gran variedad de plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Dixon, 1985). Este medio de cultivo y sus derivados consisten de sales minerales, de una fuente de carbono (generalmente sacarosa), vitaminas y reguladores del crecimiento (Carew y Staba, 1965). El medio MS se ha utilizado ampliamente para el cultivo de células de tabaco y de callos en medio solidificado con agar, en medios líquidos y para estudios morfogénéticos (Nagata *et al.*, 2004). El medio MS contiene las cantidades y proporciones correctas de nutrientes inorgánicos para satisfacer las necesidades nutricionales y fisiológicas de las células vegetales en cultivo (Heller, 1953; Carew y Staba, 1965; Steward, 1969), y no requieren suplementos orgánicos como aminoácidos, hidrolizado de caseína, extracto de levadura o agua de coco. Una característica distintiva de este medio respecto a otros, es su alto contenido de nitrato, potasio y amonio (Linsmaier y Skoog, 1965).

Las vitaminas, las fitohormonas y otros suplementos son opcionales y los requisitos para el uso de estos compuestos varían dependiendo de la especie vegetal y el uso previsto del cultivo de tejidos. Para el crecimiento de callos y cultivos en suspensión, es comúnmente utilizada la auxina sintética, ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y las citocininas sintéticas. Además el uso de fitohormonas de las plantas es determinante para el establecimiento exitoso de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* (Thimann y Schneider, 1939; Miller *et al.*, 1955). Cualquier experimento para establecer los requerimientos de vitaminas, debe incluir un control suplementado solo con tiamina, ya que ésta es requerida solo por algunas células vegetales (Gamborg *et al.*, 1976). La combinación de fitorreguladores permitió la regeneración de plantas enteras, y abrió la posibilidad de utilizar los sistemas *in vitro* para estudiar aspectos fundamentales de la diferenciación y desarrollo, y también para la aplicación de los cultivos de tejidos con diferentes propósitos (Skoog y Miller, 1957).

2.4 Hormonas vegetales o reguladores del crecimiento

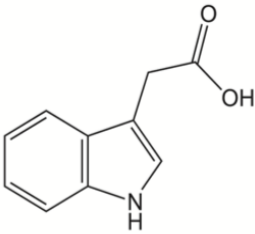
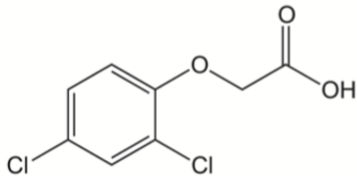
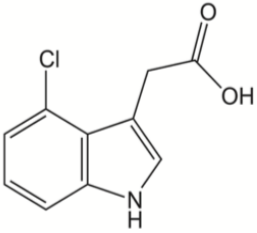
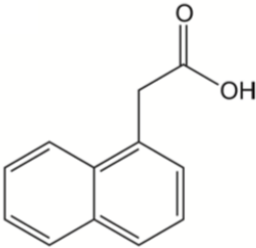
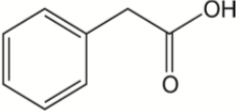
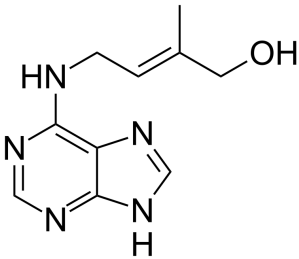
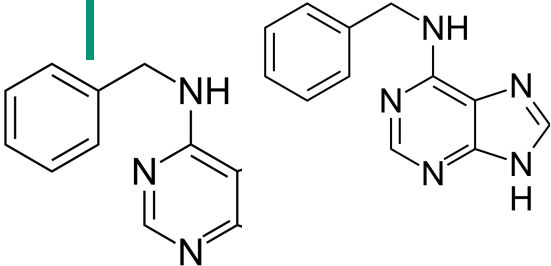
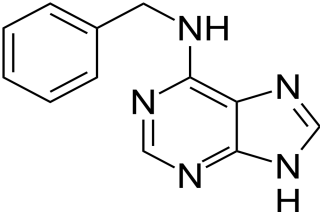
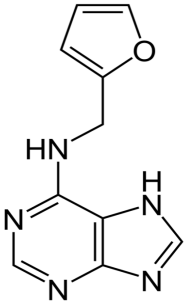
La regulación del crecimiento y desarrollo vegetal, se lleva a cabo por un grupo de moléculas estructuralmente diversas denominadas fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal, que son sustancias producidas por las plantas que regulan su respuesta a estímulos ambientales como la luz, la temperatura y la humedad, y de esta manera modulan los procesos esenciales para su desarrollo normal (Munguía-Rodríguez *et al.*, 2018).

A la fecha se han identificado varias fitohormonas de las cuales, salvo las auxinas, en el presente trabajo se abrevia el nombre de los compuestos con las siglas en inglés: ácido jasmónico (Jasmonic Acide –JA) ácido giberélico (GA), estrigolactonas (SL), ácido salicílico (SA), citocininas (CK), brasinosteroides (BR), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), óxido nítrico (NO), karrikinas (KAR), poliaminas y algunos péptidos, reconocidos ahora como una nueva familia de hormonas vegetales. Este tipo de sustancias se dividen de acuerdo a su función en dos grandes grupos: i) promotoras del crecimiento como las auxinas, CK y GA y ii) reguladoras de respuestas de defensa, como el ET, SA, JA y el ABA (Munguía-Rodríguez *et al.*, 2018) (Tabla 2).

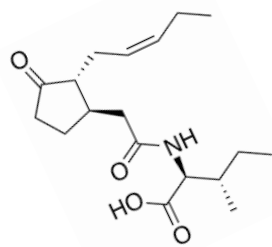
Las fitohormonas más usadas en cultivos de células vegetales son las auxinas y las CK. Para la proliferación de las células de tabaco, las auxinas son absolutamente necesarias, debido a que cuando se agotan del medio de cultivo, las células son detenidas en la fase G1 del ciclo celular y dejan de dividirse (Nagata *et al.*, 1999). La re-adición de auxinas a las células de tabaco, inducen una división celular semi-sincronizada (Ishida *et al.*, 1993).

Tabla 2. Principales fitohormonas y sus funciones	
Fitohormona	Función
Auxinas	Embriogénesis, organogénesis, patrones tisulares, respuestas trópicas a la luz y gravedad, regulación del ciclo celular, mantenimiento de la dominancia apical, formación vascular, emergencia de órganos laterales, desarrollo de raíces laterales y adventicias (Woodward y Bartel, 2005).
Citocininas (CK)	Controlan de la actividad de los meristemos, la diferenciación vascular, la biogénesis de cloroplastos, regulación del ciclo celular y respuestas a estreses bióticos y abióticos (Perilli <i>et al.</i> , 2010).
Ácido Jasmónico (JA)	Respuesta a heridas, síntesis de metabolitos secundarios y defensa contra estreses bióticos y abióticos (Wasternack y Hause, 2013).
Ácido Giberélico (GA)	Promoción de la germinación de las semillas, división y elongación celular, alargamiento del tallo, iniciación floral, establecimiento y desarrollo del fruto (Yamaguchi, 2008).
Ácido Salicílico (SA)	Regula el crecimiento celular, la respiración, la apertura de los estomas, la senescencia, el rendimiento del fruto, la germinación de las semillas y respuestas al estrés abiótico inducido por enfriamiento, calor, toxicidad de los metales pesados, sequía, estrés osmótico o salinidad (Boatwright y Pajeroska-Mukhtar, 2013).
Etileno (ET)	Implicado en la germinación, iniciación y alargamiento de la raíz, crecimiento de pelos radiculares, elongación del hipocótilo, la epinastia, el desarrollo floral, la determinación del sexo, la abscisión, la maduración del fruto y la senescencia (Stepanova y Alonso, 2009).
Brasinosteroides (BR)	Participan en la elongación celular, germinación, fertilidad masculina, desarrollo vascular, maduración de los frutos, tiempo de floración, senescencia y en las respuestas de la planta a la luz, temperatura, salinidad y patógenos (Wang, 2012).
Estrigolactonas (SL)	Estimulan la ramificación de las hifas de los hongos micorrízicos arbusculares (Al-Babili y Bouwmeester, 2015).
Karrikinas (KAR)	Promueven la germinación, incrementan la respuesta de Arabidopsis a la luz y mejoran el vigor de los cultivos (Soundappan <i>et al.</i> , 2015).
Ácido abscísico (ABA)	Regula la abscisión de órganos, la germinación, controla la dormancia de las semillas, el crecimiento de los brotes, la emergencia de las raíces laterales, la apertura de los estomas y las respuestas a estreses bióticos y abióticos (De Smet <i>et al.</i> , 2006).

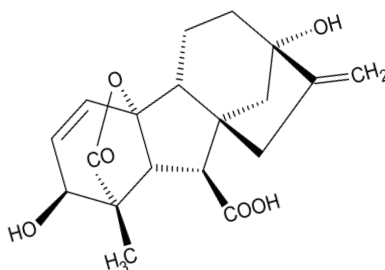
Existen auxinas naturales y sintéticas, dentro de éstas últimas el 2,4-D es la más usada para la inducción y mantenimiento del tejido calloso debido a que suprime severamente la organogénesis. De las citocininas, las más utilizadas en cultivo de células vegetales son la bencilaminopurina (BAP) y la cinetina (Cin), esta última es afectada por la luz en el rango de 300-800 nm (Fig. 3) (Aitchison *et al.*, 1977; Street 1969 y 1977; Crozier *et al.*, 2000). La disponibilidad de la cinetina permitió incrementar el número de especies que podían cultivarse indefinidamente, sin embargo, lo más importante fue el descubrimiento de que el equilibrio exógeno entre auxinas y CK en el medio de cultivo determina el destino morfogénico del callo de tabaco (Skoog y Miller, 1957).

Auxinas	
Naturales	Sintéticas
 Ácido Indol-acético (IAA)	 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)
 Ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA)	 Ácido 1-Naftalenacético (NAA)
 Ácido Fenil-acético (PAA)	
Citocininas	
Naturales	Sintéticas
 Zeatina	 Bencilaminopurina (BAP)
 Cinetina (Cin)	 Cinetina (Cin)

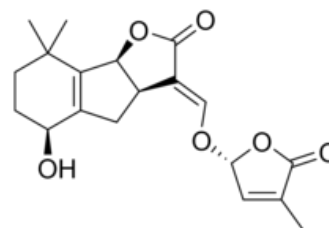
Otros fitorreguladores



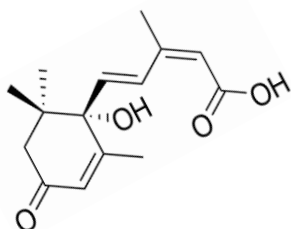
Jasmonoil-isoleucina



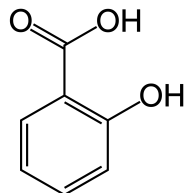
Ácido giberélico



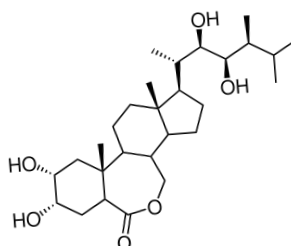
Estrigol



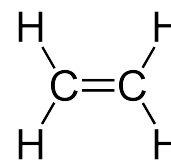
Ácido abscísico



Ácido salicílico



Brasinólida



Etileno

Figura 3. Estructura química de las fitohormonas (Munguía-Rodríguez *et al.*, 2018).

2.5 Obtención de los cultivos de células en suspensión

Primero es necesario seleccionar la planta, el medio, así como el explante y su desinfección. Los cultivos en suspensión pueden derivarse de una gran variedad de órganos como tallos, brotes y hojas o de tipos celulares específicos, como el endospermo o polen. Para estudios bioquímicos del metabolismo primario o secundario, es recomendable obtener cultivos de más de un órgano y comparar su desarrollo respecto a parámetros particulares de la investigación (Dixon, 1985).

La forma y tamaño del explante inicial no está estandarizada, aunque es preferible un tamaño pequeño. Una vez elegido el explante de un tejido joven que se encuentre en un estado biológico adecuado se procede a su desinfestación. El

agente desinfectante más usado es el hipoclorito de sodio diluido 1:10. Los explantes transferidos al medio de cultivo se incuban en oscuridad o luz tenue a 25°C (Dixon, 1985).

En cultivos *in vitro*, el tejido calloso se obtiene mediante la transferencia en condiciones asépticas de los explantes a un medio sólido suplementado con auxinas y citocininas, el cual se mantiene por subcultivos cada 3-8 semanas (Yeoman, 1970; Tempé y Schell, 1985; Crozier *et al.*, 2000). Una relación alta de auxinas respecto a las CK induce raíces, mientras que una relación mayor de CK conduce a la formación de brotes de tallos, hojas y flores. Los niveles intermedios en la relación de estos fitorreguladores promueven la formación y proliferación de callo. Se ha demostrado que este modelo morfogénico funciona para numerosas especies vegetales (Evans *et al.*, 1981; Dixon, 1985).

Finalmente los cultivos en suspensión se obtienen por la transferencia de un fragmento de callo a un medio líquido nutritivo que se incuba en agitación (30-150 rpm) y 25°C. Es recomendable un inóculo inicial abundante para asegurar una densidad celular alta y un subsecuente crecimiento. El primer subcultivo a medio fresco se realiza para excluir agregados grandes y se recomienda efectuarlo en la fase estacionaria de crecimiento en condiciones asépticas (Fig. 4) (Dixon, 1985).

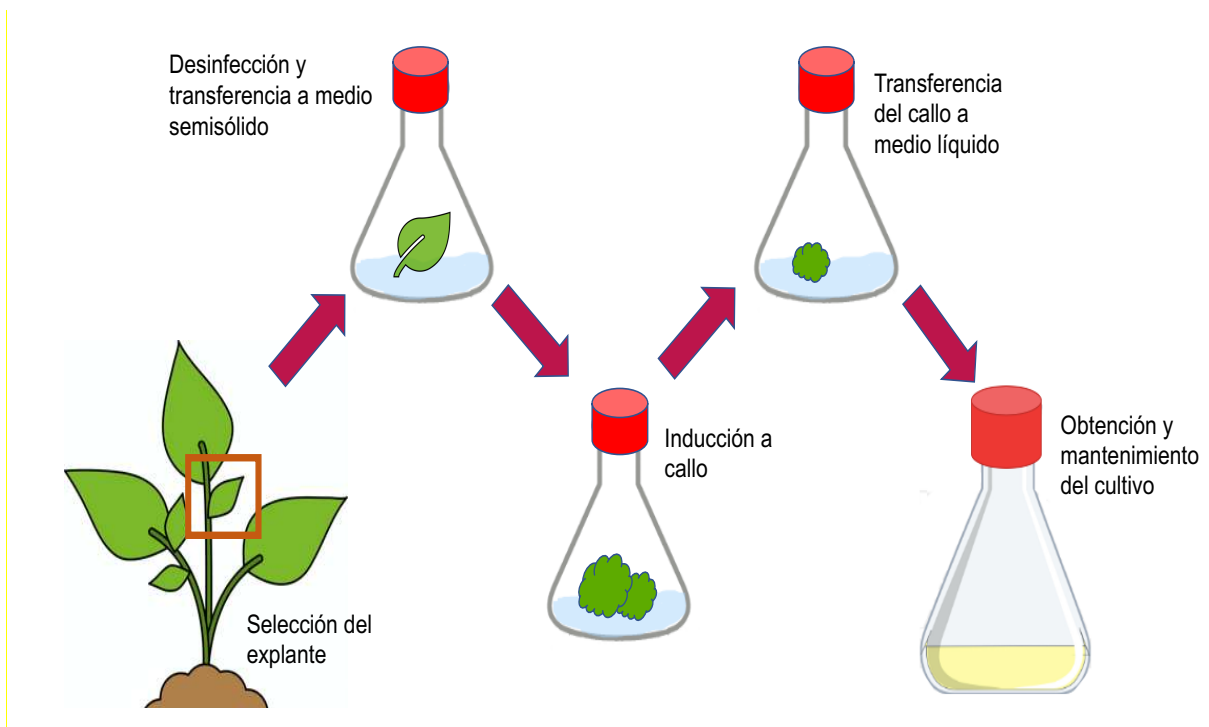


Figura 4. Origen de los cultivos en suspensión. Diagrama que muestra la obtención de cultivos vegetales en suspensión a partir de explantes procedentes de una gran variedad de órganos vegetales como tallos, brotes, hojas (modificado de Dixon, 1985).

Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales son la micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (Loyola-Vargas, 2018).

Por micropropagación, embriogénesis y organogénesis pueden obtenerse clones somáticos y regenerar plantas completas con características uniformes y así establecer cultivares de plantas valiosas, libres de microorganismos y difíciles de obtener por métodos de cultivo tradicionales. Los cultivos *in vitro* también pueden almacenarse por largos períodos mediante algunos métodos de conservación como la refrigeración y criopreservación, y de esta forma se eliminan los problemas de espacio físico, exceso de mano de obra, contaminación de los cultivos y los efectos de la erosión genética. Entre las principales ventajas del cultivo de células y tejidos

vegetales están la investigación básica, micropropagación y producción de compuestos con actividad biológica como metabolitos secundarios, proteínas y productos transgénicos, que permiten estudios en menor tiempo y bajo condiciones más controladas que con las plantas cultivadas por métodos tradicionales (Loyola-Vargas 2018).

2.6 Línea celular NT-1 como modelo de estudio

Los cultivos de células en suspensión del género *Nicotiana* como modelo de investigación se han usado ampliamente en estudios de biología celular y molecular de plantas. El primer cultivo de *N. tabacum in vitro*, se estableció en 1939 a partir de tumores genéticos (tejidos indiferenciados) (Ichikawa y Syōno, 1991). La línea celular de tabaco BY-2 (TBY-2) fue creada en la década de los 60's en las instalaciones del Central Research Institute of the Japan Tobacco and Salt Public Corporation (actualmente Tobacco Science Research Laboratory, Japan Tobacco, Inc.) a partir de plántulas de *N. tabacum* L. cv. Bright Yellow 2. En 1982 An, estableció la línea celular NT-1, la cual se ha mantenido en diferentes laboratorios alrededor del mundo (Kato *et al.*, 1972; Nagata y Kumangai, 1999; Geelen e Inzé, 2001; Nagata, 2004).

La línea celular NT-1 genéticamente igual a las células TBY-2, es un híbrido interespecífico (*Nicotiana sylvestris* x *Nicotiana tomentosiformis*) alotetraploide ($2n = 4x = 48$), perteneciente al género *Nicotiana*, subgénero *Tabacum*, sección Genuinae (Nagata *et al.*, 1992; Singh, 2002). Las células de tabaco BY-2 así como las NT-1 procedentes de cultivos de *N. tabacum*, presentan características únicas: rápido crecimiento y homogeneidad alta (Nagata *et al.*, 2004). Las auxinas se requieren como principal factor de crecimiento y proliferación para estas células (Nagata, 1999), éstos fitorreguladores están implicados en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, si se agotan las auxinas del medio de cultivo, las células BY-2 dejan de dividirse en el cuarto día de cultivo. En este

contexto, se ha demostrado que la readición de auxina a las células privadas de esta fitohormona induce a una división celular semisincrónica (Ishida *et al.*, 1993). Por otro lado, existen algunas líneas celulares habituadas, que pueden crecer activamente en ausencia de auxinas un ejemplo de esto son las células 2B-13, una línea celular derivada de las BY-2 cuyo estudio puede proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de producción y percepción de las auxinas (Shimizu *et al.*, 2006).

Los cultivos en suspensión de tabaco NT-1 son heterogéneos y menos friables que las células TBY-2, observándose en los primeros dos tipos celulares: células redondas (30-50 μm) que forman agregados o racimos y células dos a cinco veces más alargadas en uno de sus ejes, formando cadenas lineales o zarcillos (Álvarez *et al.*, 1994; Nagata y Kumangai, 1999). El medio MS suplementado con 370 mg/L de KH_2PO_4 y 1 mg/L de tiamina, además de sacarosa al 3% y 0.2 mg/L de 2,4-D es adecuado para el crecimiento de las células NT-1 (Nagata *et al.*, 1992). Los cultivos se crecen a 25 °C con agitación de 120 rpm continua, alcanzando la fase estacionaria con una densidad de 15×10^6 células/mL o un volumen de paquete celular (VPC) del 40% (v/v) a los 7-8 días de cultivo (Álvarez *et al.*, 1994).

2.7 Crecimiento celular en organismos eucariontes

Análisis moleculares de células de metazoarios han enfatizado la diferencia entre el crecimiento por incremento de la masa celular y por proliferación celular (aumento del número de células) (Conlan y Raff, 1999). Para que las células proliferen, primero debe haber un incremento en la masa y tamaño celular mediante la biosíntesis de macromoléculas. Si la velocidad de crecimiento no se mantiene a la par de la velocidad de división celular, entonces no se puede mantener la proliferación, debido a que las células perderían masa y tamaño en cada división celular. Por lo tanto, las células en proliferación deben tener una coordinación muy

estrecha entre el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular (Farias *et al.*, 2005).

2.8 Incremento en masa celular

El crecimiento se define como un aumento irreversible y permanente de volumen de una célula, tejido, órgano o individuo, generalmente acompañado de un incremento de masa (Taiz y Zeiger, 2006).

La síntesis continua de macromoléculas a partir de iones y moléculas pequeñas no sólo conduce a la formación de células más grandes sino también más complejas. Las células se dividen y luego se alargan; el efecto es que el organismo aumenta en tamaño y peso. En plantas, el crecimiento por división celular no es uniforme; sino que se encuentra localizado en las zonas meristemáticas, donde se producen las nuevas células que formarán tejidos y órganos. Dichas zonas se ubican en los ápices tanto del tallo como de la raíz, en las axilas de las hojas, en la base de las hojas de gramíneas, y en los tallos lo que les permite crecer en grosor. La existencia de meristemas en los vegetales permite establecer las siguientes diferencias respecto al crecimiento de los animales: a) el crecimiento de los vegetales es indefinido o indeterminado; las plantas continúan creciendo durante toda la vida del individuo mientras las condiciones ambientales lo permitan. En los animales el tamaño es definido por la especie y es menos susceptible a los cambios externos; b) el crecimiento por división celular se produce en los meristemas, mientras que en animales solo se lleva a cabo en etapas tempranas hasta que cesa y únicamente se efectúa para reemplazar a las células viejas; c) en las nuevas células vegetales formadas, el incremento de tamaño se debe principalmente a la elongación de las mismas por la absorción de agua y el consecuente aumento de la presión de turgencia. En las células elongadas o alargadas, la mayor parte del volumen está ocupado por la vacuola, mientras que el citoplasma queda restringido a una capa delgada adyacente a la pared. Así que, tanto la división como la elongación celular contribuyen al aumento de tamaño de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006).

2.9 Ciclo celular en organismos eucariontes

Cada célula inicia la vida a partir de la división celular de una célula preexistente, de manera tal que las células que crecen y se dividen pueden describirse en términos de ciclo de vida o ciclo celular (Farias *et al.*, 2005). El ciclo celular es un proceso ordenado donde una célula duplica su DNA para la formación de dos células hijas (Morgan, 2007) y consta de cuatro fases consecutivas: G1 (Gap 1), S (Síntesis del DNA), G2 (Gap 2) y M (Mitosis). En la figura cinco, se muestra como la célula, durante el ciclo pasa por dos grandes etapas: la división celular o fase M y la interfase (G1, S y G2) (Buchanan *et al.*, 2000; Morgan, 2007). Durante la fase G1 se sintetizan materiales, como RNA y proteínas; en la S se replica el DNA y se sintetizan histonas. Cuando la replicación finaliza, la célula pasa a G2 donde se sintetizan las moléculas necesarias para la división celular y comienza la condensación gradual de la cromatina, la cual se completa en las primeras etapas de la mitosis dando lugar a cromosomas visibles al microscopio (Buchanan *et al.*, 2000; Dashek y Harrison, 2006; Morgan, 2007). La mitosis a su vez consta de cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase (Fig. 5) (Farias *et al.*, 2005).

Durante la profase la cromatina se condensa, aparece el huso mitótico y no se observan los nucléolos; la membrana nuclear comienza a disgregarse, se observan las cromátidas de cada cromosoma y los cromosomas migran hacia el plano ecuatorial de la célula. En la metafase, los cromosomas condensados se alinean en el plano ecuatorial de forma independiente unos de otros; en la anafase los cromosomas se dividen por sus centrómeros, separándose en dos cromátidas, que se desplazan hacia polos opuestos de la célula, cuya cromátida es ya un cromosoma hijo independiente. Finalmente en la telofase comienzan a condensarse los cromosomas, formándose membranas nucleares que delimitan dos núcleos. Durante la citocinesis, un proceso paralelo, la membrana nuclear separa el citoplasma en dos partes, cada una con un núcleo y la mitad de los orgánulos, formando dos células hijas (Dashek y Harrison 2006; Morgan, 2007).

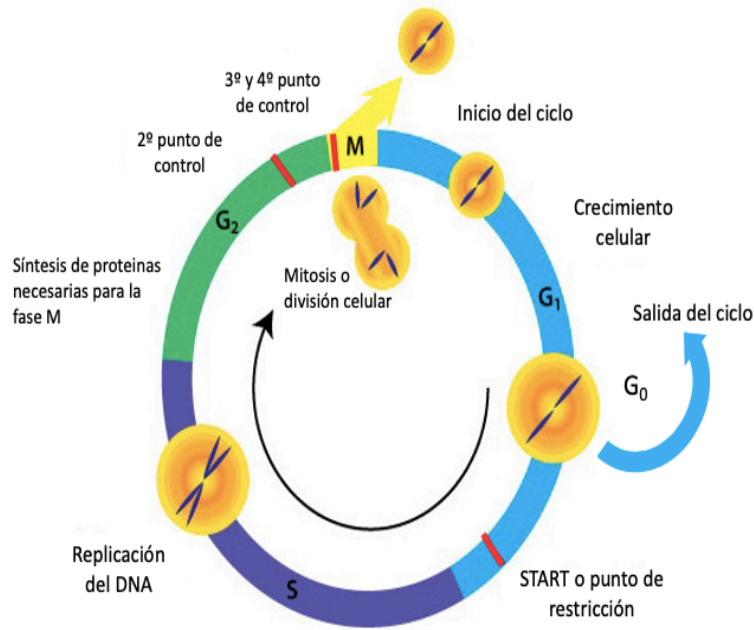


Figura 5. Ciclo Celular. El ciclo consta de las fases G_1/G_0 , S, G_2 y M de mitosis, existiendo puntos de control en las transiciones G_1/S y G_2/M , además de dos puntos de control durante la fase M (modificado de Alberts *et al.*, 2015).

2.10 Cinéticas de crecimiento en sistemas biológicos cerrados

En un sistema cerrado el cultivo de células vegetales en suspensión presenta una cinética de crecimiento que consta de tres fases: Lag o de adaptación al medio; Log o de crecimiento exponencial y estacionaria en la que se agotan los nutrientes. La fase Lag puede ser inducida por un cambio rápido en las condiciones del cultivo, por ejemplo, durante el subcultivo a un medio fresco, la amplitud de esta fase depende del tamaño, la edad del inóculo y los cambios en la composición y concentración de los nutrientes que experimenten las células. Un pequeño volumen de inóculo transferido a un gran volumen de medio fresco va a producir en las células una salida por difusión de iones, vitaminas y cofactores indispensables para la actividad de una gran cantidad de intracelulares. En la fase Log, casi todas las células se encuentran en división y solo una pequeña cantidad en G_0 . Por último, la

fase estacionaria se caracteriza por tener un coeficiente de crecimiento nulo, la división celular se equilibra con el número de muertes celulares, los nutrientes se agotan y se acumulan sustancias de desecho (Nagata *et al.*, 2004).

En cada uno de los diferentes estadios de la cinética de crecimiento se presentan varios tamaños de células, además de una gran variación en la expresión génica (Fig. 6). La línea celular NT-1 en suspensión es uno de los mejores sistemas experimentales que existen para estudiar la regulación del ciclo celular en plantas debido a su alta homogeneidad (Matsuoka *et al.*, 2004).

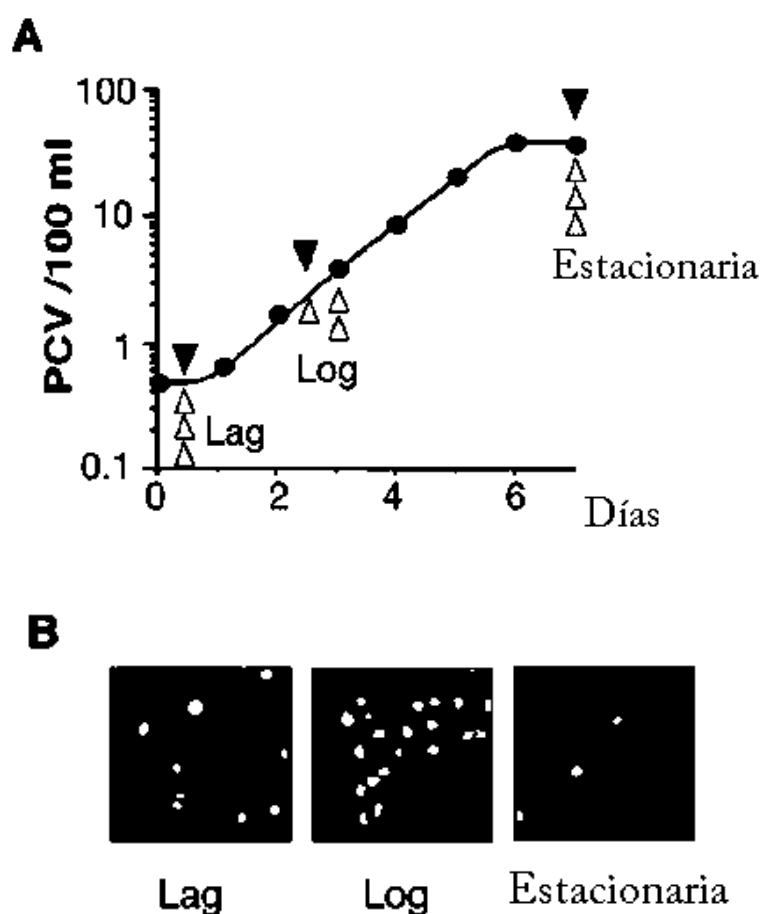


Figura 6. Crecimiento de las células TBY-2. (A) Curva de crecimiento típico de un cultivo de células en suspensión de tabaco BY-2. **(B)** Imágenes de las células teñidas con DAPI en diferentes fases de crecimiento. Note que las células en la fase Log son más pequeñas que en las otras fases (Matsuoka *et al.*, 2004).

2.11 Nano partículas de plata (AgNPs)

Los nanomateriales (NM) se consideran uno de los inventos más importantes de la ciencia moderna (Wang *et al.*, 2011). De acuerdo con la Comisión Europea, un NM se define como un "material natural, incidental o manufacturado que contiene partículas en estado no unido, conformado por agregados o aglomerados donde el tamaño del 50% o más de las partículas se encuentra en el rango de 1–100 nm". La excepcionalidad de los NM se basa estrictamente en su tamaño, su amplio rango de propiedades se debe a la gran área superficial que poseen, la cual puede adecuarse dependiendo de sus aplicaciones (Hoshino *et al.*, 2007).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) se encuentran entre los NM más estudiados debido a su amplia gama de aplicaciones. En el campo médico, las AgNPs muestran una potente actividad anti-viral, anti-microbiana y anti-inflamatoria (Nadworny *et al.*, 2010; Huh y Kwon, 2011; Lara *et al.*, 2011; Dizaj *et al.*, 2014; Franci *et al.*, 2015;) por lo que pueden usarse para el tratamiento de quemaduras y otro tipo de heridas (Klasen, 2000). Su uso se ha incrementado debido a la creciente resistencia de las bacterias a los antibióticos (Rai *et al.*, 2009), además, se ha demostrado su gran potencial en el mejoramiento de la eficacia de los tratamientos contra el cáncer para enviar a los fármacos antitumorales en forma dirigida (Franco-Molina *et al.*, 2010; Locatelli *et al.*, 2014). La industria de los electrodomésticos, ha aprovechado las propiedades anti-microbianas de las AgNPs, para el recubrimiento de lavadoras, refrigeradores, equipos de aire acondicionado, etc. con estos materiales. No obstante sus aplicaciones, las nanopartículas parecen ser tóxicas para diferentes organismos (Cox *et al.*, 2016).

Algunos de los mecanismos propuestos para explicar la toxicidad de estos NM involucran: la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), lesiones mitocondriales y daños al DNA. Algunas nanopartículas como las formadas por TiO₂, ZnO, Mg, Al, Pd, Cu, Si, C₆₀, fulerenos y nanotubos de carbono han sido las más utilizadas en los estudios de toxicidad, presentando un efecto negativo sobre las plantas y otros organismos (Wang *et al.*, 2011).

Vázquez-Muñoz y colaboradores, 2017 a través de una variedad de ensayos de viabilidad y toxicológicos evaluaron el efecto de las AgNPs en diferentes especies de distintos grupos taxonómicos, demostrando que en los distintos sistemas causaban efectos tóxicos a concentraciones de 1-100 µg/ml (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones efectivas inhibitorias para las AgNPs en diferentes sistemas biológicos. CE (Concentración efectiva); CMI (Concentración mínima inhibitoria); DL (Dosis letal) (Vazquez-Muñoz, *et al.* 2017).

Grupo	Organismo/línea celular	Concentración inhibitoria AgNPs (µg/ml)
Virus	RVFV	CE ₉₈ = 12
Bacteria	<i>E.Coli</i> (Gram negativo)	CMI = 12
	<i>S. aureus</i> (Gram positivo)	CMI = 12
Fungi	<i>C. albicans</i> (levadura)	CMI = 45
	<i>F. Oxysporum</i> (filamentoso)	CMI = 20
Protista	<i>Rhodomonas</i> sp. (microalgae)	CMI = 4
Lineas cel. animal	Vero	DL ₉₀ = 7.5
	Dendrítica (murino)	DL ₁₀₀ = 10
Lineas cel. cancerígenas	HeLa	DL ₁₀₀ = 10
	MDA-MB-231	DL ₁₀₀ = 10

2.12 Los nano materiales y su relación con el ambiente

El destino de los NM en el ambiente está controlado por los efectos combinados de sus propiedades fisicoquímicas y su interacciones con otros contaminantes (Maiti *et al.*, 2016). Los NM ambientales pueden provenir de diversas actividades naturales como la volcánica, incendios forestales, erosión del suelo, meteorización, minerales arcillosos y tormentas de polvo, por las actividades

antropogénicas intencionales y no intencionales como la quema de combustibles fósiles, la minería/demolición, producción de NM para usos específicos y flujo de residuos (Fig. 7) (Smita *et al.*, 2012).

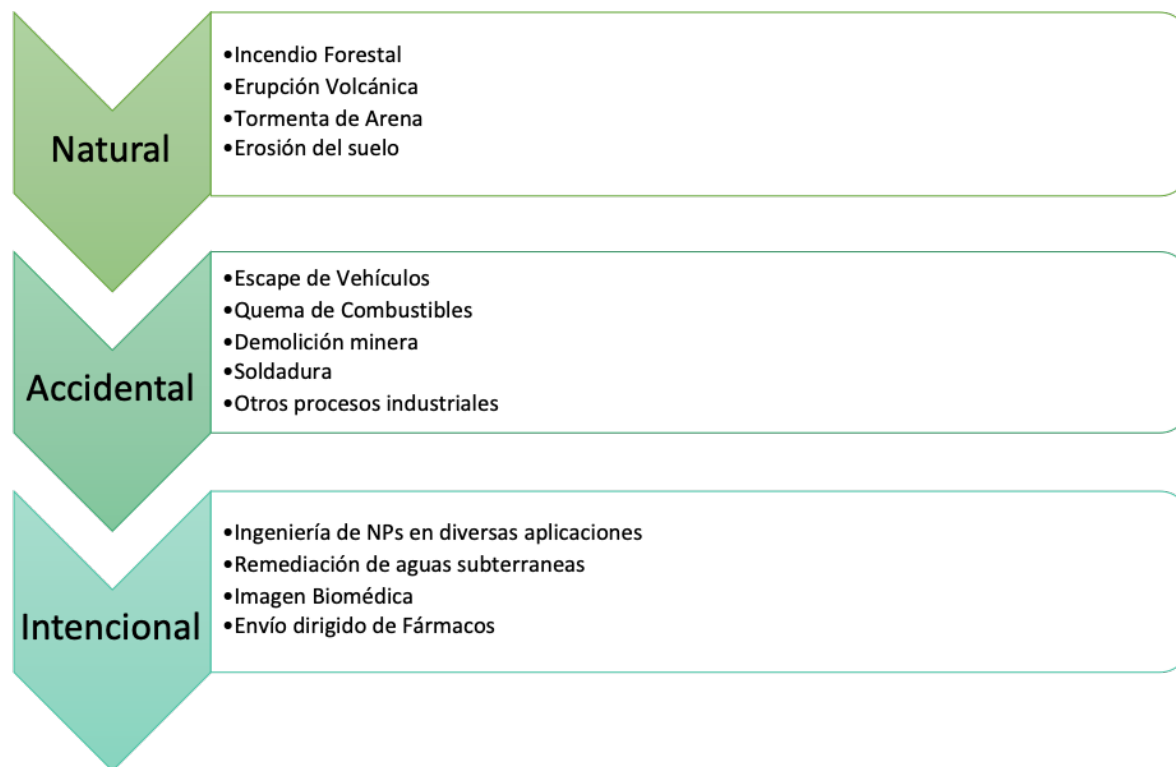


Figura 7. Fuentes comunes de producción de nano materiales. Modificado de Kabir *et al.*, 2018.

Después de que los NM se descargan al medio ambiente, se acumulan en el aire, agua, suelo y sedimentos y pueden ingresar a los suelos a través del uso de fertilizantes y productos fitosanitarios, biosólidos, aguas residuales y llanuras aluviales (Batley *et al.*, 2013). La figura ocho, ilustra la absorción de las AgNPs por las plantas en contacto con suelo y su liberación en la cadena alimenticia. El suelo es una matriz de interfaz multicapa y compleja entre los diversos materiales que comprenden a los gases, sólidos, agua, componentes orgánicos e inorgánicos y organismos. Los NM pasan a través de los poros del suelo y se adhieren a otras partículas presentes en este debido a su gran área superficial (Mukhopadhyay, 2014).

La movilidad de estos compuestos en los suelos depende de las propiedades físico-químicas de los NM, las características del suelo y el ambiente y sus interacciones con el material coloidal natural (Jafar y Hamzeh, 2013). Otros estudios han reportado que las plantas pueden absorber y translocar nano partículas del suelo, alterando la germinación de las semillas y el crecimiento vegetal (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2014).

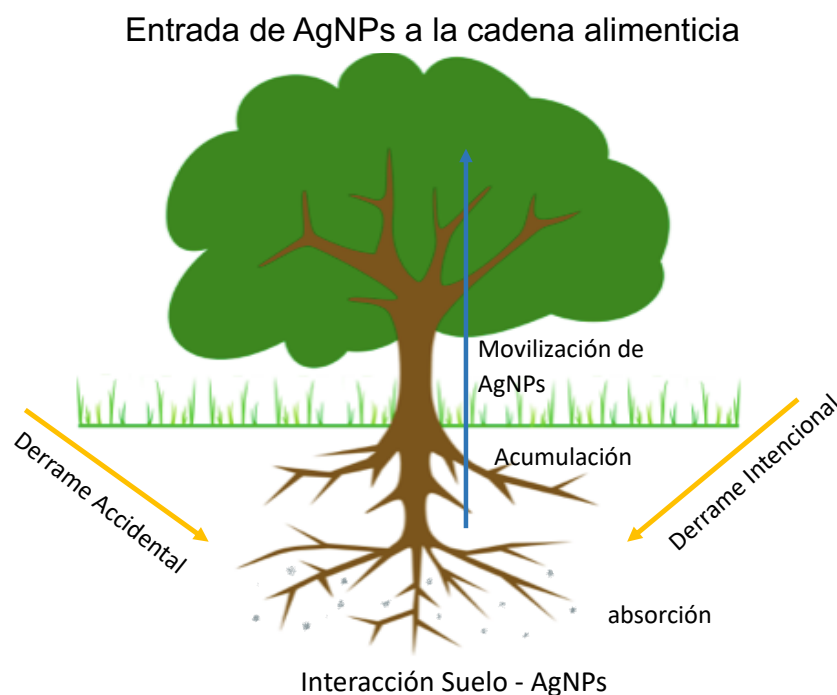


Figura 8. Interacción de las AgNPs con el sistema suelo-planta. Modificado de Nowack y Bucheli, 2007.

2.13 Solución de nano partículas de plata (Argovit)

Argovit es una preparación de nanopartículas de plata altamente dispersas con una concentración total de 200 mg/ml (20%) de AgNPs recubiertas de PoliVinilPirrolidona (PVP) en agua. El contenido de plata metálica en la preparación de Argovit es de 12 mg/ml, estabilizado con 188 mg/ml de PVP (Almonaci-Hernández *et al.*, 2017). La PVP, también conocida como povidona, es un polímero de fórmula molecular C_6H_9NO que se utiliza como vehículo sintético para dispersar y suspender fármacos, funciona como aglutinante para tabletas y cápsulas, formador de película para soluciones oftálmicas, aromatizante de líquidos y tabletas masticables, adhesivo para sistemas transdérmicos, entre otros. Su capacidad para disolverse tanto en agua como en aceite, le convierten en un agente encapsulante ampliamente utilizado en la industria farmacéutica (Foltman y Quadir, 2012).

La preparación Argovit se compone de AgNPs esféricas de 1 a 90 nm de diámetro con un tamaño promedio de 35 ± 15 nm, y un diámetro hidrodinámico de 70 nm considerando el recubrimiento de PVP (Fig. 9). El potencial zeta (parámetro que mide la magnitud de la repulsión o atracción electrostática o de carga) de las AgNPs es de -15 mV, lo cual denota una buena estabilidad de las AgNPs en solución y su absorbancia máxima de resonancia de plasmón superficial (fenómeno que ocurre cuando la luz se refleja de las películas metálicas finas) es de 420 nm de longitud de onda. En la tabla 4 se muestra un resumen de los parámetros fisicoquímicos de las AgNPs (Juárez-Moreno *et al.*, 2017).

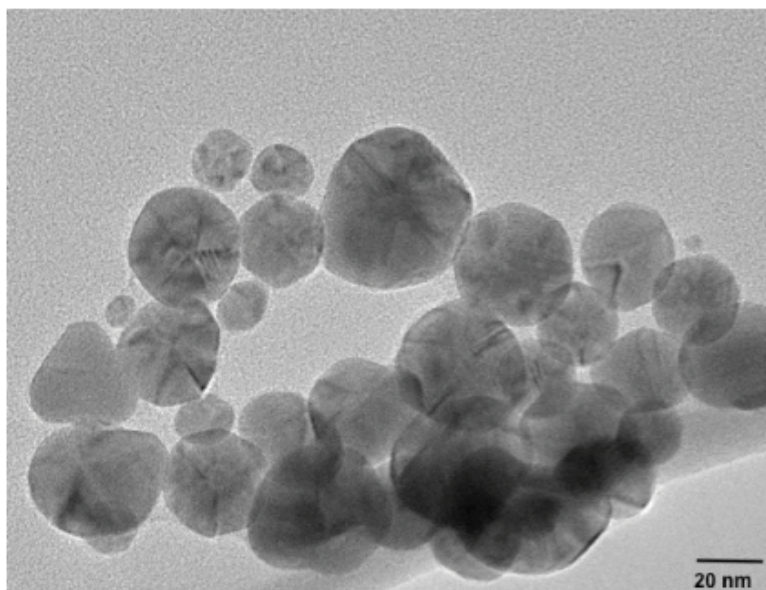


Figura 9. Morfología de las AgNPs (Argovit). Fotografía de microscopia electrónica de transmisión que muestra la morfología esferoidal y tamaño promedio de las AgNPs (Almonaci-Hernández *et al.*, 2017).

Tabla 4. Características fisicoquímicas de las AgNPs Argovit (Juárez-Moreno *et al.*, 2017).

Propiedades	Valor
Morfología de las nano partículas de plata (AgNPs)	Esferoidal
Contenido de plata metálica (%peso)	1.2
Contenido de PVP (%peso)	18.8
Diámetro promedio de las AgNPs (nm)	35
Intervalo en tamaño de las AgNPs (nm)	1-90
Diámetro hidrodinámico de AgNPs + PVP (nm)	70
Potencial Zeta (mV)	-15
Resonancia de la superficie de plasmón (nm)	420

2.14 Aplicaciones de las AgNPs Argovit

La formulación de AgNPs Argovit ha sido aprobada por instancias internacionales para su uso en cosmética y medicina (Borrego *et al.*, 2016). Debido a su gran espectro de actividad antimicrobiana una gran cantidad de estudios se han llevado a cabo utilizando estas AgNPs, por ejemplo, en medicina Almonaci-Hernández y colaboradores, 2017 trataron a pacientes con úlceras en pie diabético (complicación que presentan entre el 12 y el 25% de pacientes con Diabetes *Mellitus*, siendo la principal causa de hospitalización y amputación de miembros inferiores) utilizando solución de AgNPs a 1.8 mg/ml con una administración tópica diaria por un mínimo de 7 días, demostrando una mejora de la cicatrización de la herida en menos de 25 días de tratamiento.

Borrego y colaboradores en 2016 estudiaron la capacidad infectiva del virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV), un patógeno transmitido por mosquitos causante de una enfermedad importante en rumiantes que a menudo se transmite a humanos por zoonosis, manifestando como una gripe, pero en ocasiones pueden presentarse complicaciones graves con riesgo de morbilidad y mortalidad. Estos autores probaron el potencial antiviral de las AgNPs tanto en sistema *in vitro* como *in vivo*, utilizando células Vero y ratones infectados con RVFV-MP12, demostrando que la preincubación de RVFV con AgNPs a 12 µg/ml, eliminó casi por completo la propagación viral, reduciendo la infectividad al 98 %, mientras que ratones inoculados con una dosis letal de RVFV previamente incubado con 1.2 mg/ml de AgNPs mostraron una enfermedad clínica de inicio y mortalidad tardía, con una tasa de supervivencia del 60 %.

Juárez-Moreno y colaboradores en 2017 utilizaron ocho líneas celulares de cáncer como sistemas modelo para probar la citotoxicidad por AgNPs, siendo estas líneas, carcinoma de cuello uterino humano (HeLa), células de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7), cáncer de pulmón (H1299 y H1437), cáncer de próstata (DU-145) y adenocarcinoma de colon (HT-29 y DLD-1). Después de la exposición de las células a 20 µg/ml AgNPs durante 12 y 24 horas, la viabilidad celular se redujo

drásticamente, de manera que esta concentración resultó altamente tóxica en los dos tiempos evaluados. Una concentración de 10 µg/ml provocó una disminución notable de la viabilidad celular en la mayoría de las líneas celulares, exceptuando las células DU-145. Además, se observó diferente susceptibilidad de las diversas líneas en un rango de 1.25 a 5 µg/ml de AgNPs, siendo las líneas HeLa, MCF7 y H1299 las más sensibles a la muerte celular inducida por AgNPs. Basados en los resultados anteriores, estos autores decidieron investigar la concentración inhibitoria 50% (CI50) para las líneas HeLa, MDA-MB-231 y MCF7 debido a que estas son representativas de los principales tipos de cáncer que causan la mayoría de muertes de mujeres en el mundo que son el cérvix y el cáncer de mama. En el caso de la línea HeLa, el valor de CI50 para 12 h de exposición fue de 4.2 µg/ml, mientras que a 24 h fue de 3.8 µg/ml. La línea MCF7 mostró una CI50 para 12 h de exposición de 3.8 µg/ml y para 24 h se redujo a 3 µg/ml, mientras que las células MDA-MB-231 tuvieron una CI50 de 2.6 µg/ml para 24 h y de 6.4 µg/ml para 12 h. Demostrando que la línea celular MDA-MB-231 es menos sensible a los efectos de los AgNPs en tiempos de exposición cortos (12 h) que las células HeLa y MCF7, siendo la toxicidad en estas últimas dependiente de la dosis y el tiempo de exposición. Además, estos autores demostraron que 5 µg/ml de AgNPs durante 24 h de exposición provocaron un aumento significativo de la producción de ROS en células HeLa y MDA-MB-231, dicho aumento se presentó también a 10 µg/ml para una exposición de 12 h, mientras que las células MCF7 presentaron aumento en la formación de ROS con ambas concentraciones sin importar el tiempo de exposición (Juarez-Moreno *et al.*, 2017).

Ochoa-Meza y colaboradores, 2019 estudiaron la capacidad de las AgNPs para promover la respuesta del sistema inmunológico de camarones *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, la especie de camarón más cultivada en el mundo actualmente, infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), un virus que afecta gravemente a la industria camaronera y para el cual no se conoce aún tratamiento. Sus resultados demostraron que una sola dosis de 12 ng/ml de AgNPs produjo la supervivencia de un 20 % de camarones infectados, mientras que

la misma concentración administrada en camarones sanos no mostró evidencia histológica de daño. Además, estos autores estudiaron la expresión del gen *LGBP*, un gen clave en la respuesta inmunológica del camarón y cuya regulación positiva es probablemente inducida por el reconocimiento del recubrimiento de las AgNPs por proteínas de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) específicos del camarón. Este gen presentó un aumento en los niveles de expresión incluso con una dosis 10 veces menor de AgNPs de 1.2 ng/ml, resultados que muestran que una sola dosis de una pequeña cantidad de nanopartículas de plata fue capaz de mejorar la respuesta del sistema inmunológico del camarón sin efectos tóxicos en camarones sanos.

En plantas, Spinoso-Castillo y colaboradores, 2017 estudiaron la capacidad de las AgNPs para reducir la contaminación en la micropropagación de *Vanilla planifolia* utilizando sistemas de inmersión temporal (TIS, por sus siglas en inglés), el uso de estos sistemas ha permitido reducir los costos de producción y aumentar los coeficientes de multiplicación de esta especie. Sin embargo, la contaminación es un problema serio en los TIS durante la micropropagación comercial, por lo que estos autores probaron 25, 50, 100 y 200 mg/L de AgNPs en brotes regenerados *in vitro* y cultivados en medio MS utilizando un sistema de biorreactor de inmersión temporal. La evaluación a los 30 días de cultivo, mostró un porcentaje de contaminación para el tratamiento control y el de 25 mg/L de 16.66% y 8.33% respectivamente, mientras que en los tratamientos con 50, 100 y 200 mg/L no se observó contaminación alguna. Estos autores en 2018, evaluaron la toxicidad de las AgNPs en plántulas de *Vanilla planifolia* expuestas durante 6 semanas a las concentraciones de AgNPs antes mencionadas, demostrando un efecto tóxico con 100 y 200 mg/L, mientras que con 25 y 50 mg/L no presentaron cambios significativos en los parámetros de crecimiento evaluados: longitud del tallo, el número de hojas y el número y longitud de raíces (Bello-Bello *et al.*, 2018).

2.15 Especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas

Las ROS son formas reducidas del oxígeno (O_2) que se producen continuamente en la célula como subproductos del metabolismo aeróbico normal o en respuesta a estreses bióticos y abióticos. Las ROS biológicamente importantes son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$), y el singlete de oxígeno (1O_2). En las plantas y otros organismos aerobios, las ROS son el resultado de la reducción del O_2 durante reacciones metabólicas normales como la respiración y la fotosíntesis. El oxígeno del estado fundamental se convierte en formas ROS más reactivas, ya sea por transferencia de energía o por reacciones de transferencia de electrones. El primero conduce a la formación de (1O_2), mientras que el segundo da como resultado la reducción secuencial a ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 y $OH^{\cdot}$ (Fig. 10) (Apel y Hirt, 2004; Castro-Mercado y García-Pineda, 2013).

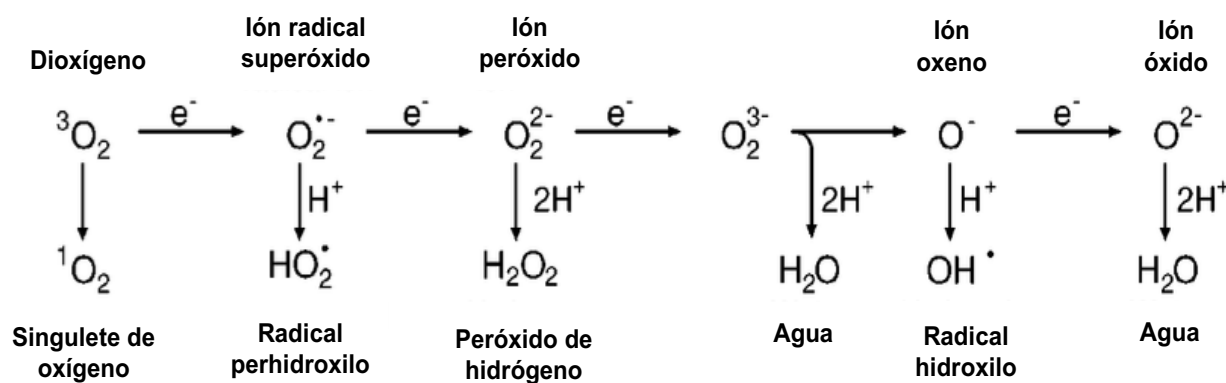


Figura 10. Generación de las diferentes (ROS) por transferencia de energía o reducción secuencial de la molécula de Oxígeno (Modificado de Apel y Hirt, 2004).

Una característica común entre los diferentes tipos de ROS es su capacidad para causar daño oxidativo a proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras estructuras celulares debido a su alta reactividad (Gechev *et al.*, 2006; Moller *et al.*, 2007).

La reactividad y la vida media de las diferentes ROS se relacionan con su movilidad en la célula, así, por ejemplo, el H_2O_2 puede migrar de los sitios de su síntesis a compartimentos adyacentes o a células vecinas, mientras que el altamente destructivo OH reacciona con cualquier biomolécula que encuentre y por lo tanto su desplazamiento es limitado (Henzler y Steudle, 2000; Bienert *et al.*, 2006).

De las diferentes ROS que se producen en la célula, el H_2O_2 es quizás la molécula señal mejor caracterizada por su relativa estabilidad, su vida media es de 1 ms, la más larga de todos los tipos de ROS. En contraste el O_2^- y el $^1\text{O}_2$ tienen vidas medias más cortas, de aproximadamente 1-4 μs , mientras que la del OH es extremadamente corta de solo 1 ns (Fig. 11) (Gechev *et al.*, 2006; Moller *et al.*, 2007). El H_2O_2 fue reconocido inicialmente como una molécula tóxica, capaz de dañar moléculas y estructuras celulares, sin embargo, se ha demostrado que también puede actuar como una potente molécula de señalización involucrada en funciones fisiológicas que incluyen resistencia a patógenos, reforzamiento de la pared celular, senescencia, fotosíntesis, apertura de los estomas y ciclo celular (Castro-Mercado y García-Pineda, 2013).

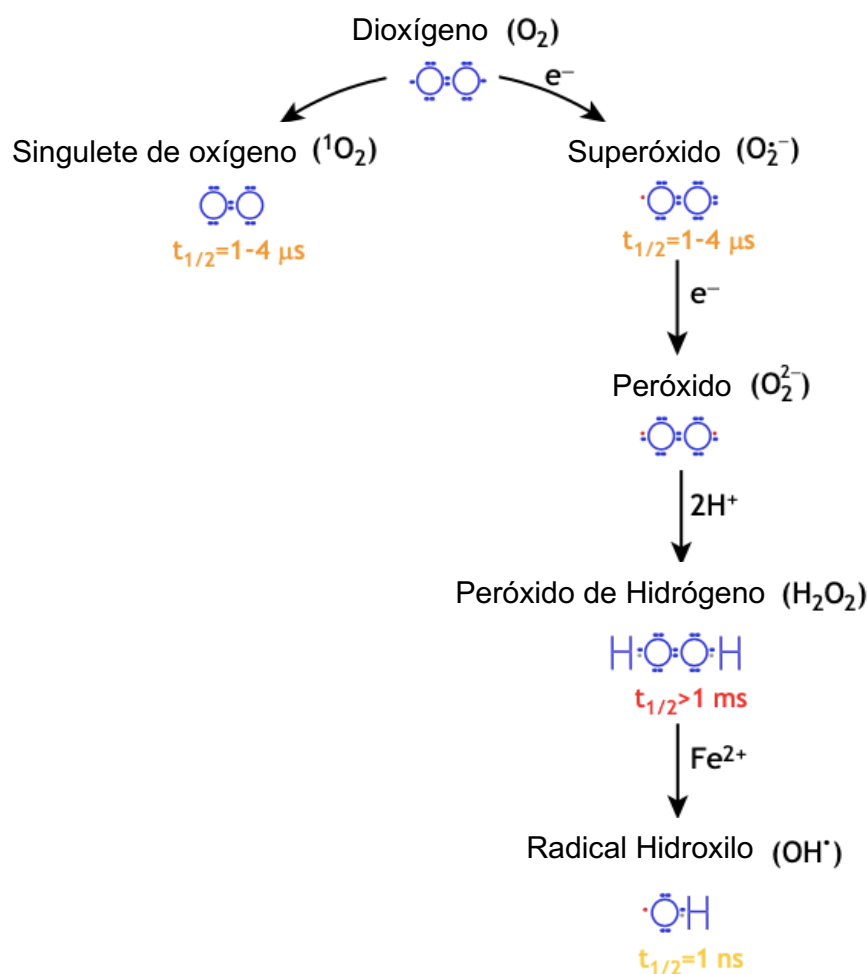


Figura 11. Estructura de Lewis y vida media de las diferentes ROS. La vida media ($t_{1/2}$) está representada con colores cuya tonalidad indica con el valor más alto peróxido de hidrógeno H_2O_2 (rojo) y el valor más bajo para el radical hidroxilo OH (amarillo) (Mhamdi y Breusegem, 2018).

El balance en los niveles de H_2O_2 y de otras ROS es esencial para controlar sus funciones de señalización y prevenir su toxicidad. Por lo tanto, las plantas han desarrollado elaborados sistemas antioxidantes enzimáticos tales como la catalasa y diversas peroxidasas y antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascórbico, el tocoferol y el glutatión, que junto con las enzimas que producen ROS mantienen la

homeostasis en todos los compartimentos celulares (Mittler *et al.*, 2004; Dellapenna y Pogson, 2006).

Péptidos especiales, como el glutatión, representan sustancias protectoras contra iones de metales pesados y de las ROS, su función consiste en mantener el estado redox de las células y también participan en el transporte de iones de metales pesados/xenobióticos y su posterior compartimentación (Mohsenzadeh *et al.*, 2011). La relación glutatión reducido (GSH) respecto al glutatión oxidado (GSSG) indica el posible estrés oxidativo en las células, debido a que la acumulación de GSSG está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo (Tepe y Harms, 1995). El glutatión es uno de los antioxidantes más importantes, elimina las ROS y protege a las plantas contra el estrés oxidativo (Szalai *et al.*, 2009; Pahlich *et al.*, 2007). Cuando actúa como antioxidante, el GSH se oxida a GSSG, por lo que la actividad antioxidante se atribuye a la forma reducida del glutatión, el GSH. Por lo tanto, es necesario que las plantas mantengan relaciones GSH/GSSG altas. Existen mecanismos involucrados en el mantenimiento del GSH, en el más importante de estos participa la glutatión reductasa (GR), que cataliza la reducción de GSSG a GSH con NADPH como donador de electrones (Dat *et al.*, 2000).

2.16 AgNPs y generación de ROS

La producción de ROS, el daño a la estructura y función de la membrana y la fluctuación en las actividades enzimáticas antioxidantes se han documentado en todas las especies vegetales como respuestas comunes a las NPs (Marslin *et al.*, 2017). Algunos estudios, también han demostrado que el tratamiento de plantas y microorganismos fotosintéticos con NPs resultó en una mayor producción de compuestos fenólicos que podrían actuar como antioxidantes para eliminar a las ROS (Dixon y Paiva, 1995; Franklin *et al.*, 2009; Comotto *et al.*, 2014; Ghorbanpour y Hadian, 2015; Vecerová *et al.*, 2016).

La explosión oxidativa se ha informado constantemente en plantas expuestas a niveles tóxicos de NPs (Thwala *et al.*, 2013; Hossain *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2015). La exposición a varios tipos de NPs, por ejemplo, Ag, ZnO y Al₂O₃ (óxido de aluminio), también indujo especies reactivas de nitrógeno (*NO, óxido nítrico) y H₂O₂ en la lenteja de agua, maíz y células de tabaco amarillo brillante (BY-2) (Zhao *et al.*, 2012; Poborilova *et al.*, 2013; Thwala *et al.*, 2013).

En las células de tabaco BY-2, las NPs de Al₂O₃ también indujeron la producción de anión superóxido (O₂⁻), una de las formas altamente reactivas de ROS. Aunque se debate si la activación de ROS proviene, en realidad, de partículas intactas o, más bien, de iones liberados de NPs, estudios recientes apoyan este último proceso. Los mecanismos a través de los cuales las NPs inducen la producción de ROS y desencadenan estrés oxidativo a nivel celular continúan en investigación, se reportó que las AgNPs desencadenan la señalización de Ca²⁺ y ROS a través de la inducción de poros permeables a Ca²⁺ y la oxidación directa del ácido ascórbico apoplástico (Poborilova *et al.*, 2013; Sosan *et al.*, 2016).

Para mitigar los efectos del estrés oxidativo, las plantas activan la maquinaria de defensa antioxidante enzimática y no enzimática para eliminar el exceso de ROS (Sewelam *et al.*, 2016). Por ejemplo, la estimulación de la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la desintoxicación de (O₂⁻), en oxígeno molecular ordinario O₂ o H₂O₂ y la ascorbato peroxidasa (APX), que desintoxica peróxidos como H₂O₂ usando ácido ascórbico (Asc) como sustrato, se observó después del tratamiento con NPs (Fu *et al.*, 2014).

El análisis proteómico de las raíces de *O. sativa* tratadas con AgNPs reveló una mayor abundancia de SOD, APX y glutatión-S-transferasa (GST) (Mirzajani *et al.*, 2014); estas mismas NPs, en plántulas de *Pisum sativum* L, también estimularon la actividad de SOD y APX de manera significativa, e inhibieron a la glutatión reductasa (GR) y a la deshidroascorbato reductasa (DHAR) (Tripathi *et al.*, 2017). La catalasa (CAT), otra enzima que protege a las células del daño oxidativo, se elevó

significativamente el exponer las raíces de trigo a 500 mg/kg de CuO-NPs (Dimkpa *et al.*, 2012).

2.17 Efecto de las nano partículas de plata en plantas

No obstante que las plantas representan un nivel trófico importante, existen escasos estudios enfocados al efecto de los NM sobre ellas (Poelman *et al.*, 2008). Una posibilidad de la fitotoxicidad por los NM, puede deberse a las interacciones entre ellos mismos y los componentes del suelo y los microorganismos que modifican significativamente la absorción de nutrientes (Mishra y Kumar, 2009).

Otras alternativas estarían relacionadas con la absorción directa de las NPs por las plantas, a través de la raíz o del follaje y su posterior transporte y acumulación, las interacciones con biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas, incluidas enzimas, y con las estructuras celulares como la pared celular y las membranas (Gardea-Torresdey *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008). En particular, la pared celular de las células vegetales representa una estructura crucial en la captación de nanopartículas en comparación con las células animales (Chen *et al.*, 2010). Un tercer punto estaría relacionado con su posible biotransformación, esto se ha demostrado en especies desérticas, en la soya (*Glycine max*) y en *Prosopis sp* después de la aplicación de ZnO y CeO₂ (López-Moreno *et al.*, 2010; Parsons *et al.*, 2010; de la Rosa *et al.*, 2011).

La planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha utilizado en la investigación de los efectos y la toxicidad después del tratamiento con AgNPs, Field y colaboradores, 2011 y Kaveh y colaboradores, 2013 mostraron un aumento en la expresión de 286 genes y una represión de 81 genes involucrados en el estrés salino, defensa contra insectos y patógenos y respuesta al daño, después de dicho tratamiento. Estudios de proteómica en *Oryza sativa*, reportaron un incremento de las proteínas que participan en la tolerancia al estrés oxidativo, la regulación y señalización del calcio, el daño directo de la pared celular, la división celular y la apoptosis después de la exposición a las AgNPs, sugiriendo que estas partículas pueden inhibir la división

celular y alterar procesos metabólicos importantes como la síntesis y degradación de proteínas (Mirzajani *et al.*, 2014).

Los resultados de otra investigación sobre la exposición a AgNPs en *A. thaliana*, presentaron un incremento en la expresión de genes involucrados en la asimilación de azufre, en la biosíntesis de glutatión, y de la glutatión S-transferasa (Nair y Chung, 2014), lo que les permitió a los autores sugerir que la generación de ROS, presenta una función importante en la respuesta de las plantas a la exposición de las AgNPs. En todos los estudios antes mencionados, se observó que las AgNPs pueden interactuar con estructuras subcelulares, celulares, tisulares y diferentes moléculas biológicamente activas, incluidas proteínas y ácidos nucleicos (Bhaskar *et al.*, 2010).

Qian y colaboradores, 2013 observaron que 3.0 mg/L de AgNPs inhibió la longitud de raíz y el peso fresco en *A. thaliana* y concentraciones mayores provocaron una alteración en la transcripción de genes antioxidantes, una disminución de la clorofila y un cambio en la estructura de la membrana de los tilacoides. Por otro lado, Geisler *et al.*, 2013 mostraron que la germinación en semillas de *A. thaliana* en condiciones hidropónicas, no se ve afectada por tratamientos con las AgNPs estabilizadas con citrato a concentraciones de 66.84, 133.68, 267.36 y 534.72 mg/ml. Estos mismos autores reportaron que *A. thaliana* irrigada en suelo con 75 mg/ml de AgNPs no mostró cambios morfológicos (Geisler *et al.*, 2014).

El tamaño y la forma de las NPs parecen tener un impacto en la respuesta fisiológica y en la expresión genética de *Arabidopsis*, debido a que experimentos en plantas expuestas con tres diferentes morfologías de AgNPs mostraron respuestas distintas. Formas triangulares (47 ± 7 nm) y esféricas (8 ± 2 nm) provocaron los grados más bajos y más altos de actividad antimicrobiana respectivamente. Las alteraciones fenotípicas inducidas, también correlacionaron con la morfología y tamaño de las nanopartículas, las AgNPs decaédricas (45 ± 5 nm) indujeron una mayor promoción del crecimiento radicular a diferencia de las esféricas que solo presentaron acumulación de antocianinas. Las AgNPs decaédricas y

esféricas, ocasionaron los niveles más bajos y más altos de acumulación de la superóxido dismutasa de Cu/Zn, respectivamente. Además, las tres morfologías de AgNPs provocaron la acumulación de la cinasa CDC2 que participa en la regulación del ciclo celular, de la protoclorofilida oxidorreductasa y de la fructosa 1,6 bifosfato aldolasa (You-yu *et al.*, 2014).

2.18 Efecto de las AgNPs sobre los cultivos celulares en suspensión

Krystofova y colaboradores, 2013 investigaron el efecto de las NPs magnéticas de Fe_2O_3 en células BY-2 de tabaco, utilizando partículas del mismo material pero modificadas como $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-OH}$ y $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NH}_2$ a concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL, los autores observaron que las NPs no modificadas, no tuvieron efecto sobre la viabilidad de las células BY-2, mientras que la aplicación de las NPs modificadas con -OH y -NH₂ presentaron una reducción significativa de la viabilidad celular en todas las concentraciones ensayadas. Estos resultados confirman la toxicidad de las NPs e indican la necesidad de investigar cómo estos materiales modifican a los organismos vivos. En este mismo estudio, al determinar el peso fresco como el parámetro de crecimiento de los cultivos BY-2, se encontró que solo los tratamientos con NPs no modificadas y con $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NH}_2$ lo incrementaron ligeramente a la concentración más baja (1 ng/mL) respecto al control. Mientras que en las otras concentraciones observaron una disminución en este parámetro. También se determinó la cantidad de proteínas en los diferentes tratamientos, y las concentraciones de 10 y 100 ng/ml mostraron un aumento de proteínas. Los autores sugieren que dicho incremento inducido por las NPs puede deberse a la capacidad de estos materiales para inducir mecanismos celulares de protección, como la biosíntesis de péptidos y enzimas protectoras que participen en procesos de desintoxicación.

Estos mismos autores, analizaron la capacidad de las NPs para inducir la biosíntesis de GSH y GSSG, además de monitorear la actividad de la GST. En estos experimentos se encontró que la producción de GSH disminuyó en los tres

tratamientos con $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-OH}$, debido a que el GSH tiene un papel clave en los procesos de detoxificación por xenobióticos con grupos funcionales -OH . Por otro lado, al medir la producción de GSSG se determinó una disminución dosis dependiente en presencia de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NH}_2$ y $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-OH}$ en los tres tratamientos, mientras que las NPs no modificadas indujeron un aumento considerable en las dos concentraciones más altas 10 y 100 ng/ml. La actividad de la GST presentó un aumento significativo en el caso de las NPs no modificadas en todas las concentraciones ensayadas, y en menor magnitud con $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-OH}$, mientras que en presencia de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NH}_2$ se observó una disminución en los tres tratamientos. En el estudio antes mencionado, la relación GSH/GSSG determinada en las células BY-2 en el tratamiento control fue de 0,137; en el tratamiento con 1 ng/ml, la relación más baja fue de 0.144 para las NPs de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-OH}$. Mientras que en los tratamientos con 10 ng/ml y 100 ng/ml, se detectó la relación más baja con un valor de 0.077 en las NPs no modificadas. Estos resultados indican la capacidad de estos materiales para inducir estrés oxidativo.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a sus propiedades únicas, como el tamaño extremadamente pequeño y su alta relación superficie-volumen, el impacto como la toxicidad de los NM en el ambiente permanece poco descrito. El aumento de la aplicación de NM con fines comerciales, así como en diferentes productos de consumo, tiende a incrementar la posibilidad de su exposición a los humanos tanto en rutas directas como indirectas. Los cultivos celulares NT-1 representan un sistema idóneo debido a su alta homogeneidad para estudiar el efecto de estos NM como las AgNPs sobre el crecimiento vegetal. Por lo antes mencionado, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de los cultivos en suspensión de tabaco NT-1.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

Las AgNPs dependiendo de su concentración inhiben el crecimiento de los cultivos en suspensión de tabaco NT-1 mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

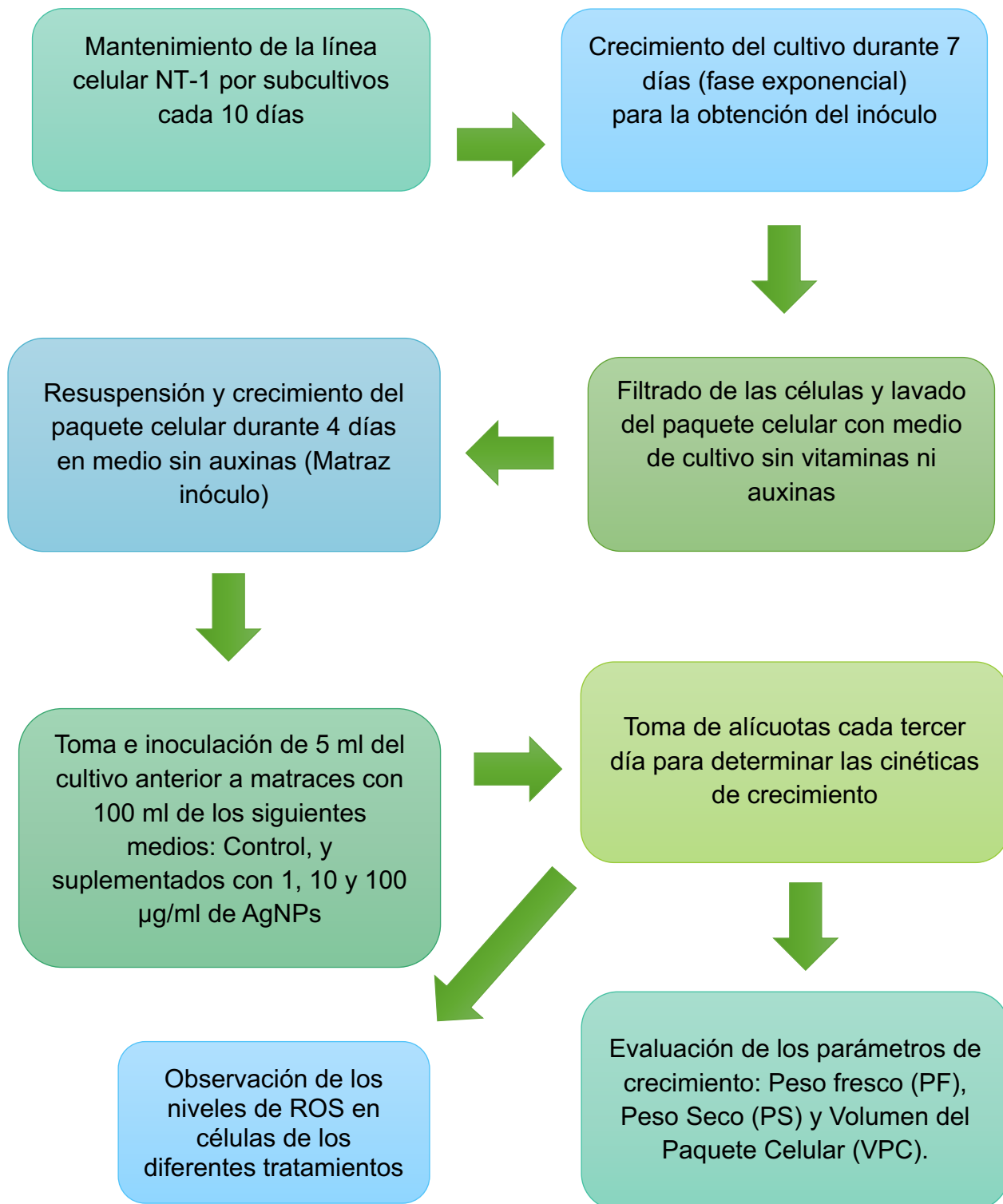
4.2 Objetivo general

Analizar los cambios inducidos sobre el crecimiento de los cultivos en suspensión de tabaco NT-1 por diferentes concentraciones de AgNPs y la producción de ROS.

4.3 Objetivos específicos

1. Determinar las cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1 en medios suplementados con diferentes concentraciones de AgNPs, evaluando peso fresco, peso seco y volumen de paquete celular.
2. Observar el nivel de ROS en las células de los cultivos en suspensión suplementados con diferentes concentraciones de AgNPs.

5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL GENERAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales y reactivos

Los cultivos celulares de tabaco NT-1 fueron donados amablemente por el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV), Unidad Irapuato.

Se utilizaron los siguientes reactivos y materiales: medio Murashige and Skoog (PhytoTechnology Laboratories), tiamina, mioinositol y ácido 2,4-D (Sigma), KH_2PO_4 (J.T. Baker), sacarosa (Bioxon) y H_2DCFDA (Invitrogen), Filtros Millipore MILLEX GS de 0.22 μm , papel filtro circular Whatman con diámetro de poro de 125 mm, tubos Falcon de 15 ml, tubos Eppendorf de 1.5 ml, pipetas estériles desechables de 5 ml marca Costar, jeringas estériles de 10 ml marca Sensil Medical.

Solución de nanopartículas

La solución de AgNPs, llamada ArgovitTM, fue amablemente donada por el Dr. Vasily Burmistrov del Centro Científico y de Producción Vector-Vita (Rusia) y la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias de la UNAM. Argovit es una preparación de AgNPs altamente dispersas con una concentración total de 200 mg/ml de AgNPs recubiertas con PVP en agua. El contenido de Ag metálica en la preparación de Argovit es de 12 mg/ml, estabilizado con 188 mg/ml de PVP. Las concentraciones de AgNPs se calcularon de acuerdo con el contenido de Ag metálica en la preparación de Argovit. Las soluciones se prepararon en PBS y se mantienen a 4 °C en la oscuridad. Después de una comparación de diferentes AgNPs disponibles comercialmente, se concluyó que solo la preparación de Argovit tenía múltiples certificados para su uso en aplicaciones veterinarias y humanas (Borrego *et al.*, 2016).

Equipo

Agitadora con control de temperatura MRC, mod. LM-570R; Microscopio de epifluorescencia Nikon, mod. Optiphot-2; Potenciómetro: Beckman, mod. 34 pH Meter; Placa de Agitación: Torey pines, mod.1010.1; Balanza Analítica: OHAUS, mod. GA110; Centrifuga Refrigerada: Hermle-labor technik, mod. 2400k; Vortex-Genie 2: Scientific Industries, mod. G-650; Micropipetas RAININ, mod. pipet-lite, BIOMIT, mod:6070026; Campana de Flujo Laminar: Thermoelectron Corporation, mod. 1839; Autoclave: Hirayama; Balanza Granataria: Sartorius, mod. TE612; Desecador Nalgene; Estufa: Felisa; Refrigerador: Torrey; Congelador: Nieto mod. CVC15; Bomba de vacío: BÜCHI Laboratechnik AG mod. V-500.

6.2 Métodos

6.2.1 Mantenimiento de los cultivos de células en suspensión NT-1

Las células de tabaco en suspensión NT-1 se mantuvieron en el medio de cultivo MS (4.3g/L), suplementado con 30 g/L de sacarosa como fuente de carbono, 0.2 g/L de KH_2PO_4 , 2,4-D ($1\mu\text{M}$) y una mezcla de vitaminas (tiamina-mioinositol, 0.5-50 g/L), el medio se ajustó a pH de 5.8. Las células se subcultivaron cada 10 días, inoculando en condiciones estériles 2.5 ml de células NT-1 en fase estacionaria a 50 ml del medio de cultivo MS antes mencionado. El material se incubó en oscuridad y agitación constante a 120 rpm y 25 °C.

- **Solución stock de vitaminas**

En 10 ml de agua tridestilada se disolvieron 5 mg de tiamina HCl y 0.5 g de mioinositol y la solución se esterilizó por filtración (filtros Millipore $0.22\mu\text{M}$); se tomaron alícuotas de 1.5 ml y se almacenaron a -20°C (Franklin y Dixon, 1994). Las concentraciones stocks de tiamina y mioinositol se prepararon a 15 y 277 mM y la concentración final en el medio resultó de 1.2 y $555.10\mu\text{M}$ respectivamente.

- Solución stock de la auxina 2,4-D

Se pesaron 0.004g de 2,4-D y disolvieron en 10 ml de KOH 0.1N. La solución se esterilizó por filtración (filtros Millipore 0.22 μ M) y almaceno a 4 °C. Se preparó la solución cada dos semanas. La concentración del stock es de 1.81 mM y la final del medio de cultivo es de 0.9 μ M (Franklin y Dixon, 1994).

6.2.2 Lavado de las células NT-1

En la campana de flujo laminar bajo condiciones estrictas de asepsia, se filtró el total del cultivo de células en suspensión crecido durante siete días (matraz de 500 ml con 100 ml de cultivo). Una vez filtradas las células, el paquete celular se lavó constantemente con un litro de medio MS (sin vitaminas ni auxinas), agitando con una espátula suavemente. Las células lavadas se resuspendieron en 100 ml de medio MS y después de una incubación durante cuatro días con el propósito de sincronizar el cultivo, este se utilizó como inóculo para llevar a cabo las cinéticas de crecimiento de los cultivos suplementados con diferentes concentraciones de las AgNPs.

6.2.3 Determinación del crecimiento de cultivos de células en suspensión NT-1

Del matraz de células lavadas y resuspendidas, se tomaron alícuotas de 7 ml de células y se inocularon dos matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio fresco MS, correspondientes al tratamiento control y dos matraces suplementados con 50, 250 y 500 μ l de AgNPs correspondientes a 10, 50 y 100 μ g/ml respectivamente. Todos los medios de cultivo se suplementaron 200 μ l de la solución de vitaminas (500X) y 50 μ l de 2,4-D 0.4 mg/ml. Los matraces se incubaron en oscuridad en una agitadora a 120 rpm y 25°C.

- Solución stock de AgNPs

Las AgNPs se encuentran en una solución al 20 % con una cantidad de 12.5 g de Ag, por lo cual se llevó a cabo una dilución 1:10 para obtener una concentración stock de 1 µg/ml.

6.2.4 Cinéticas de crecimiento

Se tomaron alícuotas de 3 ml por duplicado en tubos Falcon de 15 ml a los 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días, donde se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento.

6.2.5 Volumen del Paquete Celular (VPC)

Las muestras de 3 ml se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C y el VPC se determinó de acuerdo a la graduación del tubo Falcon (VPC/3ml).

6.2.6 Peso fresco

Las alícuotas se filtraron con la ayuda de una bomba de vacío sobre papeles filtro, puestos previamente a peso constante en una estufa a 80 °C y se pesaron.

6.2.7 Peso seco

Finalmente se dejaron secar las células en estufa a 80 °C durante 24 horas, se pesaron las muestras para calcular el peso por diferencia con los papeles a peso constante.

6.2.8 Detección de los niveles de ROS en las células de tabaco NT-1

H₂DCFDA es un bioindicador de los niveles de ROS que difunde de manera pasiva al interior de las células, donde sus grupos acetato son escindidos por las esterasas intracelulares y entonces los grupos tiol clorometilo reaccionan con el glutatión y otros tioles. La oxidación subsecuente del glutatión permite la formación del producto fluorescente el cual es impermeable y permanece en el interior de la célula (Molecular Probes, <http://probes.invitrogen.com>). Se recolectó el paquete celular correspondiente a 3 ml de células de cultivo en suspensión tratadas con 0, 50 y 100 µg/ml de AgNPs a los 0, 7 y 10 días de crecimiento, se incubaron 60 minutos a 4 °C en una solución de H₂DCFDA 20 µM disuelta en DMSO. Posteriormente se lavaron e incubaron las células por 60 minutos a temperatura ambiente en una mezcla de las soluciones KCl 0.1 mM y CaCl₂ 0.1 mM ajustadas a pH 6.0.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de LAS AgNPs sobre el crecimiento de las células en suspensión NT-1

Con la finalidad de ensayar el manejo del sistema, se llevó a cabo una primera cinética de crecimiento utilizando 0.1 y 1 μM de 2,4-D. Los parámetros de crecimiento determinados fueron peso fresco (PF), peso seco (PS) y volumen del paquete celular (VPC), obteniendo los resultados observados en la figura 12. La fase lag en el cultivo suplementado con 1 μM de 2,4-D se presentó hasta el día 4 del cultivo, la log del 4 al 8 y no se observó la fase estacionaria (Fig. 12A). Un comportamiento similar se presentó al medir el parámetro PS (Fig. 12B), el cual descarta completamente el agua y permite obtener un resultado más confiable de la biomasa presente en las células. Como podemos observar, en la cinética evaluada con éste parámetro parece no existir una fase de adaptación al medio, y la fase log comienza desde el primer día hasta el día 8, donde alcanza un punto máximo de crecimiento que precede a una caída abrupta, sin mostrar la fase estacionaria. Por otro lado, el VPC (Fig. 12C), parámetro que mide el tamaño de las células al momento de su obtención, es decir, la expansión celular durante el crecimiento, presenta una fase lag en los dos primeros días del cultivo, una log del día 2 al 8 y una fase estacionaria en los días 9 y 10. Los cultivos suplementados con 0.1 μM de 2,4-D presentaron un crecimiento menor, respecto al cultivo con mayor concentración de la auxina al evaluar el PF (Fig. 12A) y PS (Fig. 12B), mientras que el VPC (Fig. 12C) fue similar al cultivo con 1 μM de 2,4-D.

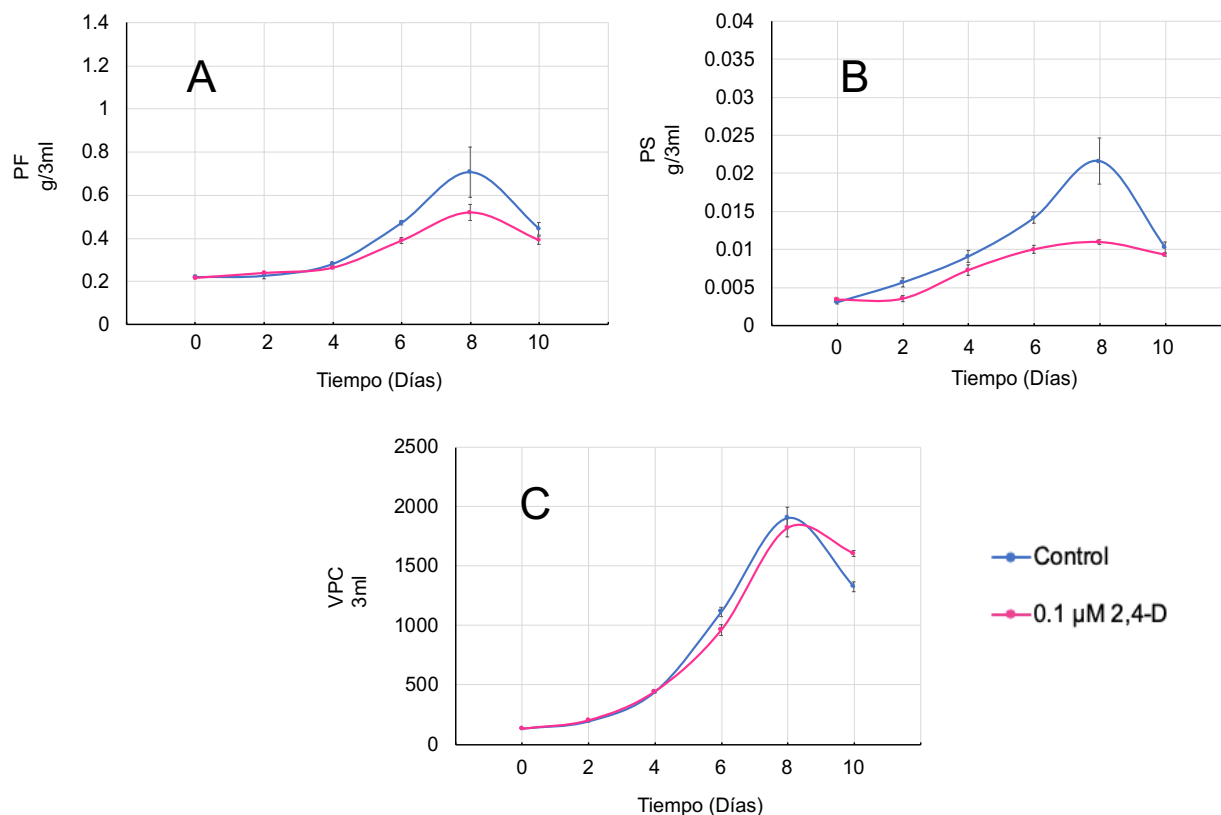


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de las células NT-1. Parámetros evaluados: A) Peso Fresco, B) Peso Seco y C) VPC.

Continuando con el ejercicio de obtener cinéticas de crecimiento con fases bien definidas y comenzar con el manejo de las AgNPs se planteó un segundo ensayo, dónde se evaluaron las cinéticas de crecimiento de los cultivos suplementados con: 1 μM de 2,4-D, 1 μM de 2,4-D + 1 μg/ml de AgNPs, 0.1 μM de 2,4-D y 0.1 μM de 2,4-D + 1 μg/ml de AgNPs. Los cultivos adicionados con 1 μM de 2,4-D presentaron contaminación a los 4 días de crecimiento, por lo que se eliminaron y solo se evaluaron los cultivos adicionados con 0.1 μM de 2,4-D. En la figura 13A, se puede observar que en ambos tratamientos incrementan el PF, desde el tercero hasta el último día de la cinética, presentando la cinética del tratamiento control un ligero desaceleramiento al día ocho. La evaluación del crecimiento con el PS (Fig. 13B), muestra en ambos tratamientos una fase lag los tres primeros días del cultivo, una

log a partir del cuarto hasta el día ocho y posteriormente una fase estacionaria bien definida, mostrando un menor crecimiento el cultivo suplementado con las AgNPs. El VPC (Fig. 13C) presento el mismo comportamiento, sin diferencias significativas entre los tratamientos.

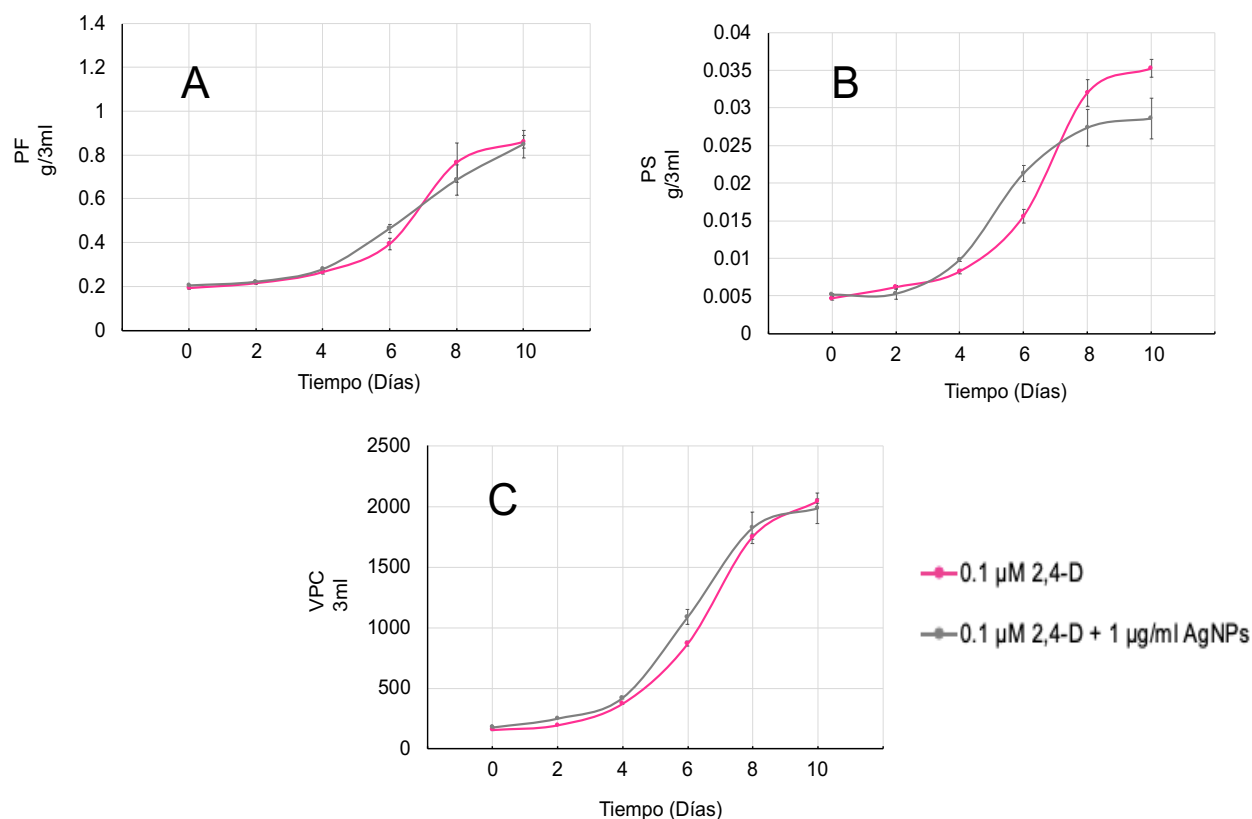


Figura 13. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de las células NT-1. Parámetros evaluados: A) Peso fresco, B) Peso seco y C) VPC

Una vez obtenidas fases de crecimiento bien definidas se procedió a evaluar las cinéticas de crecimiento de los cultivos en suspensión adicionados con AgNPs. A partir del siguiente experimento solamente se utilizó los cultivos 1 μM de 2,4-D. Primeramente se estudió el efecto de 1 y 10 μg/ml de AgNPs , evaluando los mismos parámetros de crecimiento antes mencionados y los resultados se pueden observar en la figura 14. En los tres parámetros evaluados la fase lag se presentó en los primeros tres días del cultivo, la log entre el día tres al ocho y una estacionaria a

partir del día ocho solamente en las cinéticas evaluadas con PF (excepto el tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs). Las cinéticas de crecimiento de los cultivos suplementados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs mostraron una disminución del crecimiento independientemente del parámetro con que se evaluaron.

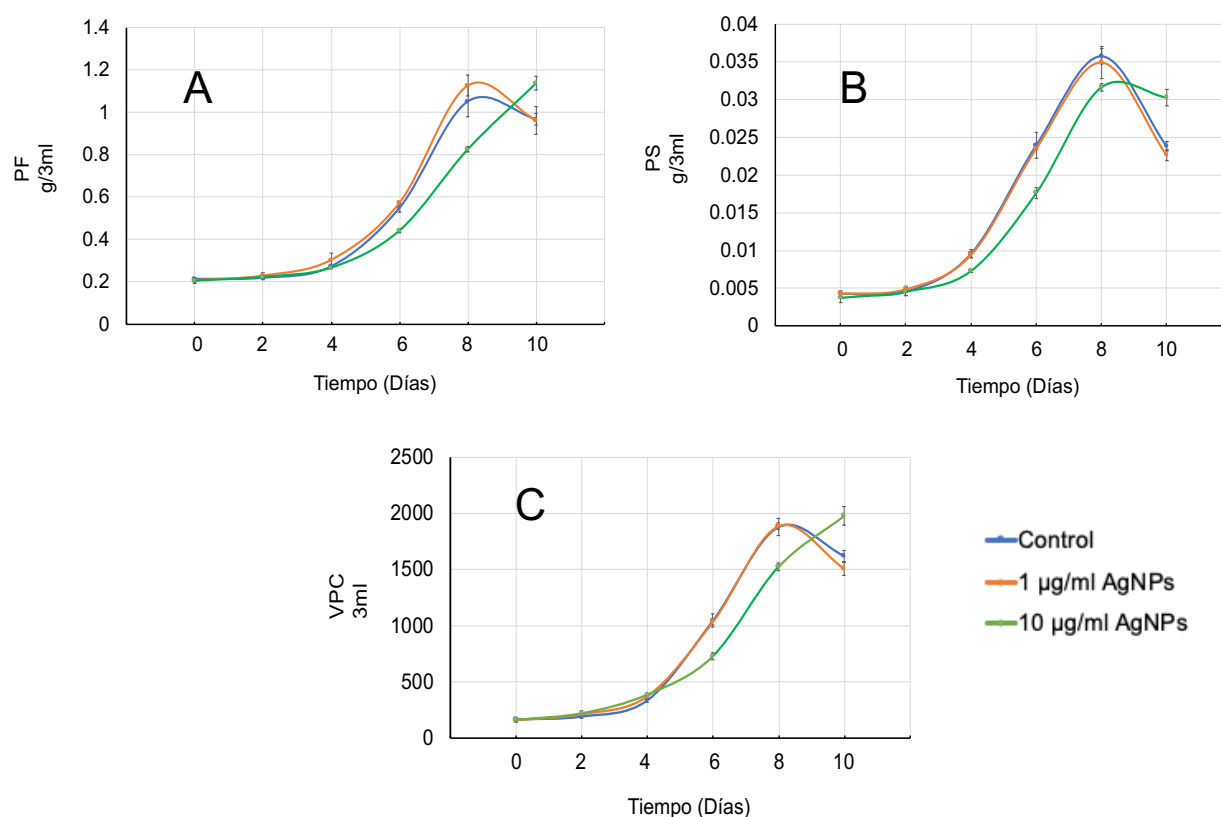


Figura 14. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de los cultivos en suspensión de células de tabaco (Primer experimento). Parámetros evaluados: A) Peso fresco, B) Peso seco y C) VPC.

Con la finalidad de corroborar los resultados anteriores y en vista de que en dos de los tres parámetros (PF y VPC) no se alcanzó una fase estacionaria en el cultivo suplementado con 10 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs, se realizó la repetición del experimento evaluando el crecimiento de los cultivos hasta los 14 días (Fig.15).

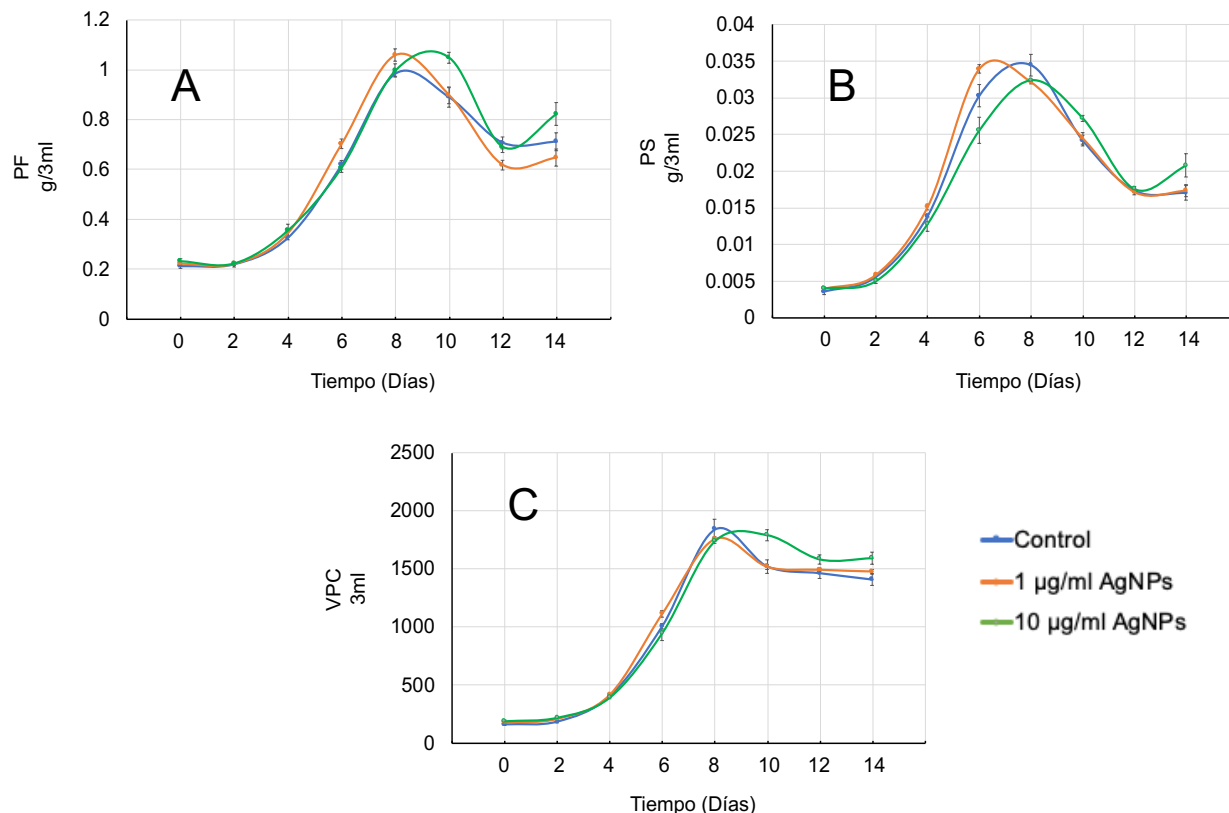


Figura 15. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 (Segundo experimento). Parámetros evaluados: A) Peso fresco, B) Peso seco y C) VPC.

En este experimento ningún tratamiento mostró cambios significativos respecto al control en ninguno de los tres parámetros evaluados.

Debido a que resultados fueron muy diferentes, se llevó a cabo una tercera repetición del experimento (Fig. 16). En esta repetición se observó un menor crecimiento en los tres parámetros evaluados en el tratamiento suplementado con 10 µg/ml de AgNPs, similar a lo observado en el primer experimento (Fig. 14).

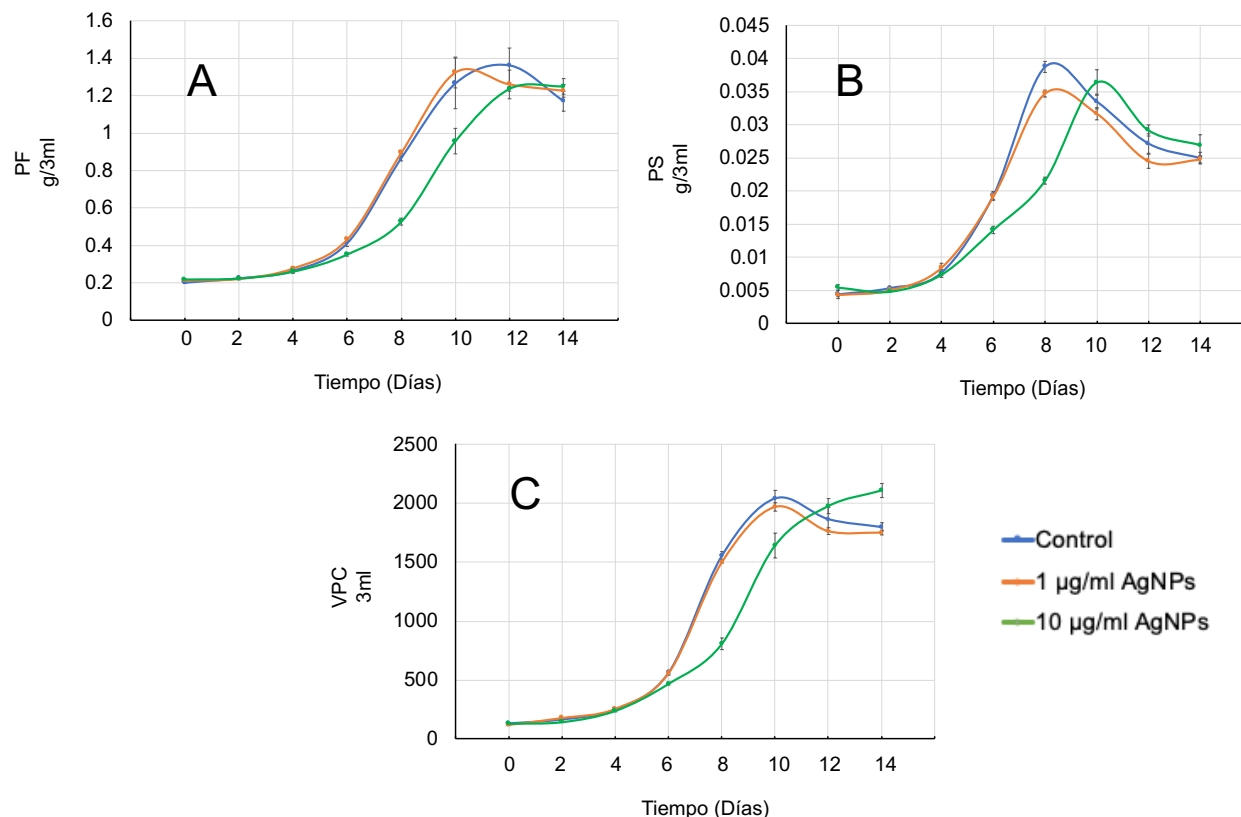


Figura 16. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 (Tercer experimento). Parámetros evaluados: A) Peso fresco, B) Peso seco y C) VPC.

Considerando que Vazquez-Muñoz, 2017 reportó que la letalidad de las NPs para células animales pueden encontrarse en un rango de 10^{-2} a 10^2 µg/ml, se decidió probar 100 µg/ml de AgNPs. En la figura 17, se observa que a esta concentración el crecimiento del cultivo fue nulo en cualquiera de los tres parámetros evaluados, dejando claro que a esta concentración, las AgNPs son tóxicas para las células de tabaco.

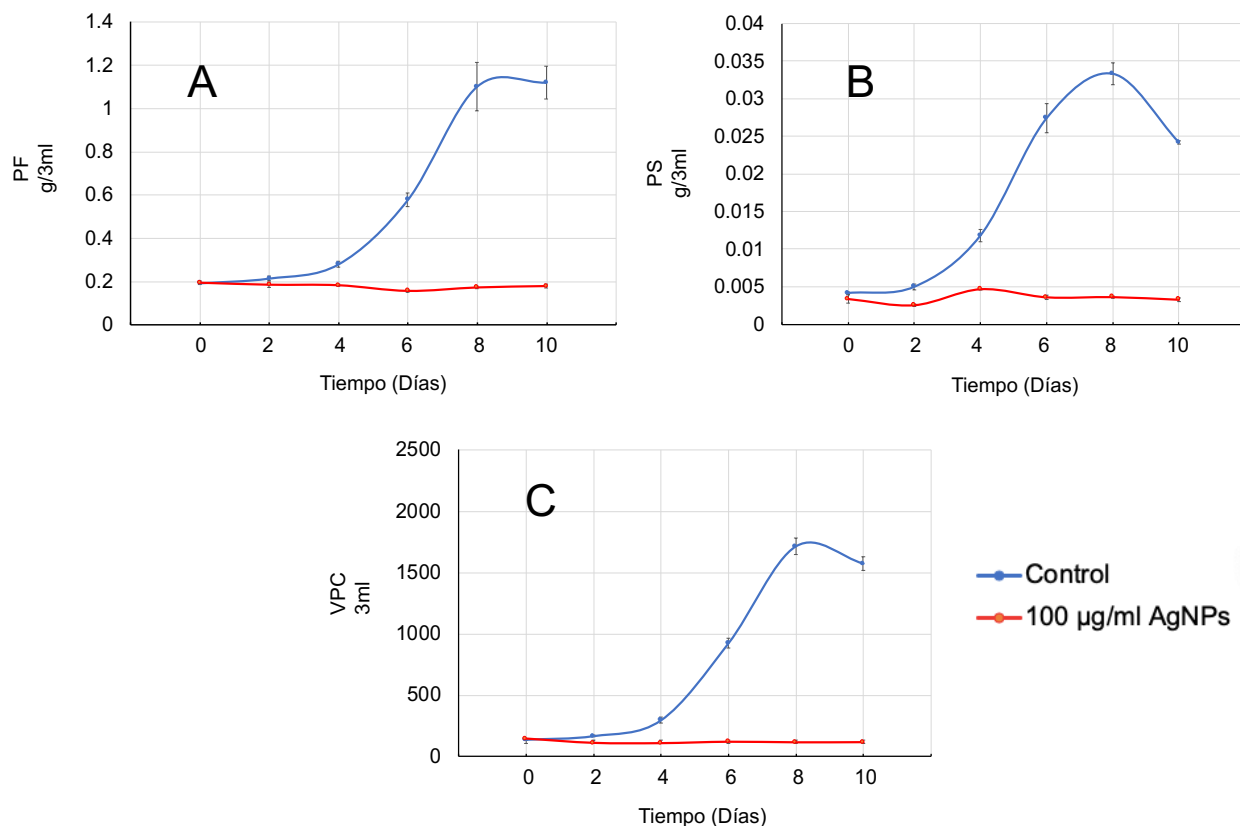


Figura 17. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 (Primer experimento). Parámetros evaluados: A) Peso fresco, B) Peso seco y C) VPC

El experimento se repitió, corroborando el crecimiento nulo de los cultivos adicionados con 100 µg/ml de AgNPs (Fig. 18). Se planteó entonces un experimento con 50 µg/ml de AgNPs, con la finalidad de observar si los efectos tóxicos de las AgNPs se debían a la concentración de 100 µg/ml. La figura 19, muestra la cinética de crecimiento correspondiente a este experimento, donde se puede observar que los cultivos adicionados con 50 µg/ml al igual que los de 100 µg/ml de AgNPs no crecen.

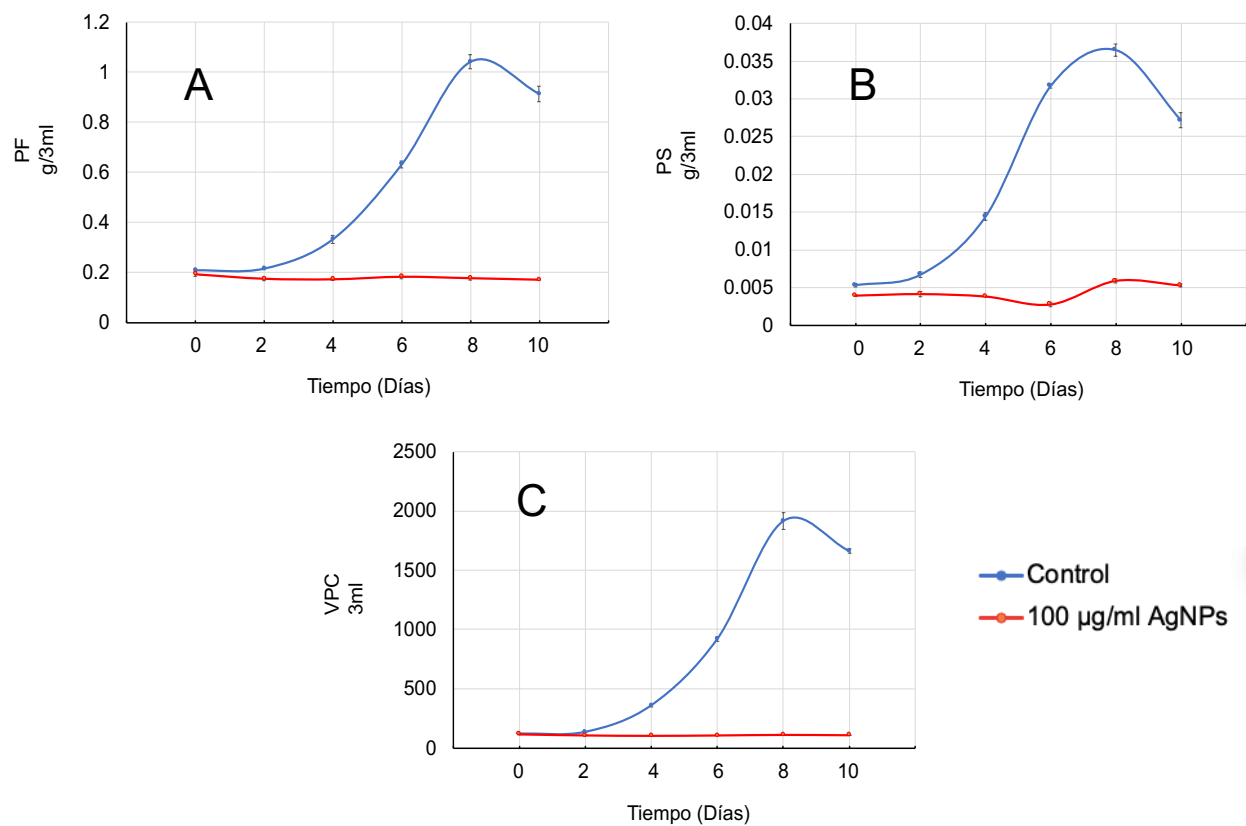


Figura 18. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 (Segundo experimento). Parámetros evaluados: A) Peso fresco, B) Peso seco y C) VPC

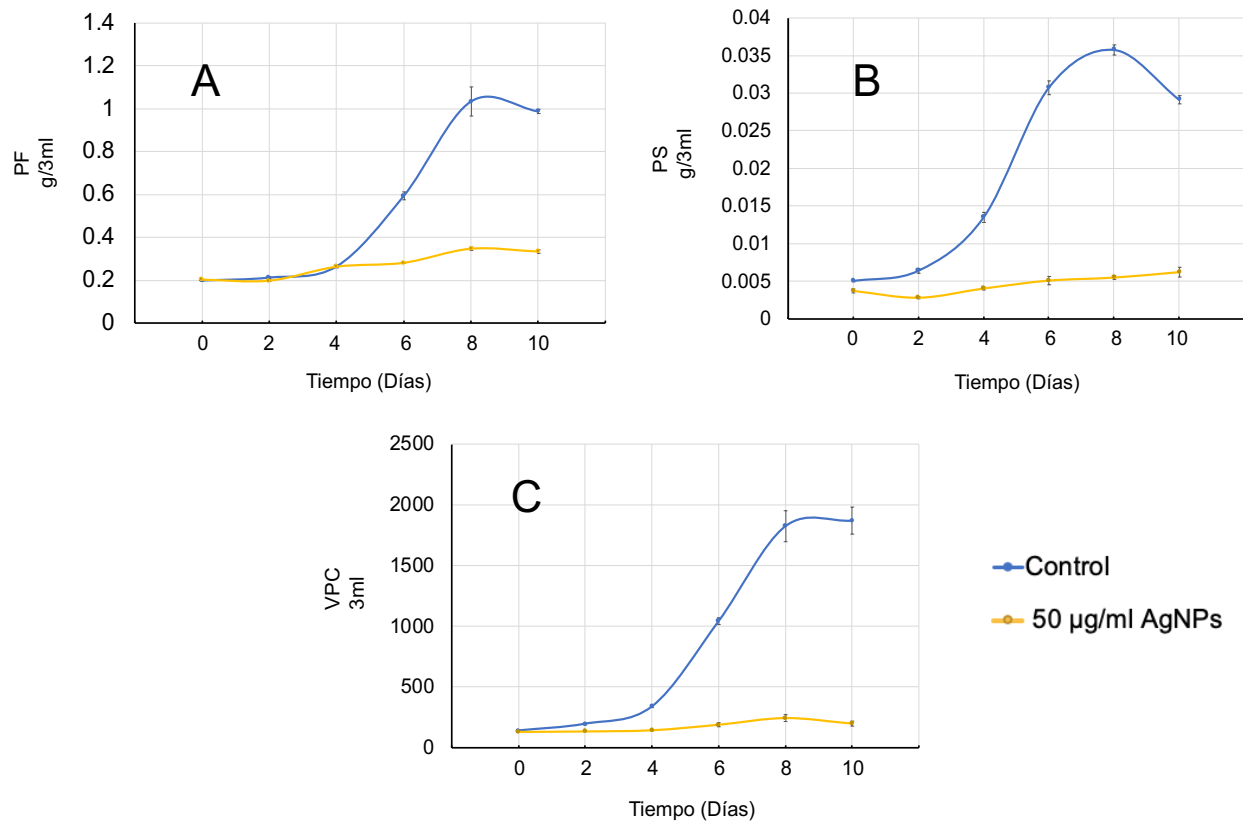


Figura 19. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 (Primer experimento). Parámetros evaluados: A) Peso fresco, B) Peso seco y C) VPC

La repetición de las cinéticas de crecimiento de los cultivos suplementados con 50 µg/ml representada en la figura 20, muestra al igual que el primer experimento (Fig.19), que los cultivos no crecen, demostrando que esta concentración de AgNPs es tóxica para las células NT-1.

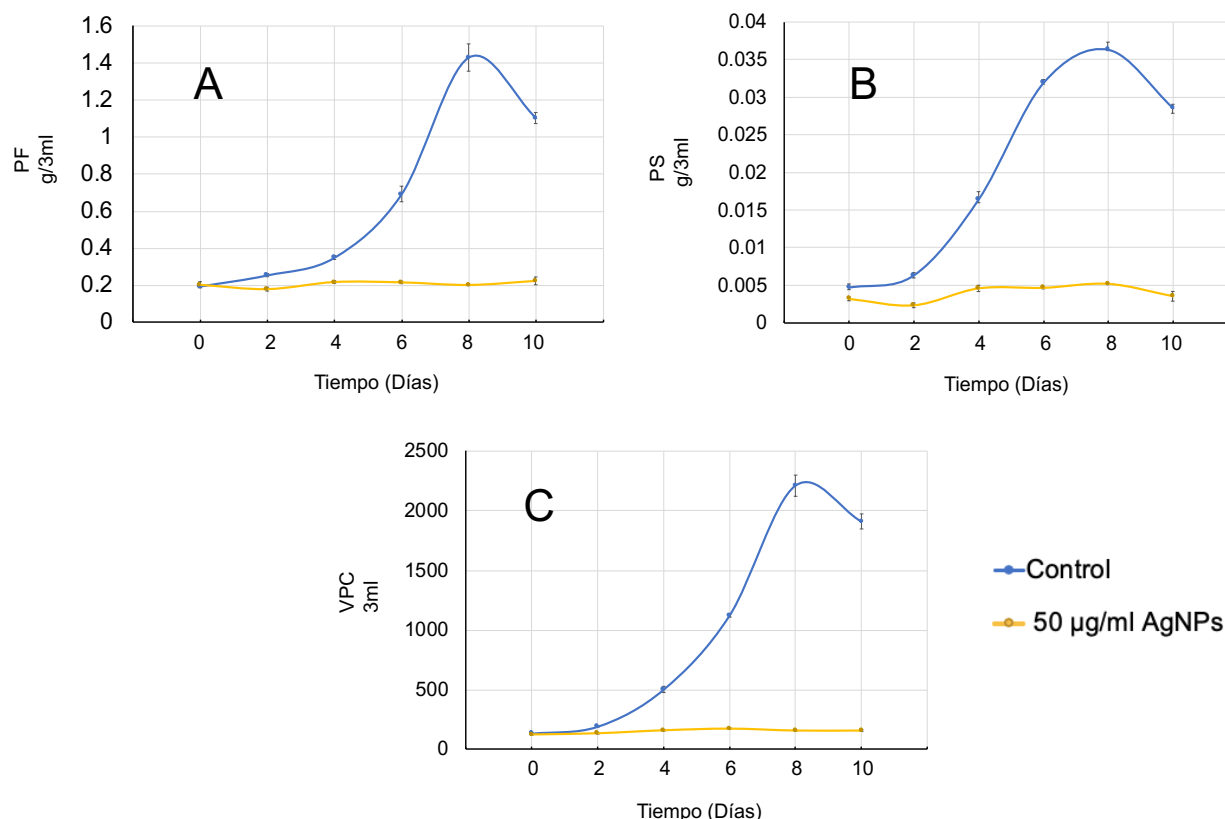


Figura 20. Efecto de las AgNPs sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de células de tabaco NT-1 (Segundo experimento). Parámetros evaluados: A) Peso fresco, B) Peso seco y C) VPC

7.2 Niveles de ROS en células crecidas en medios suplementados con 50 y 100 µg/ml de AgNPs

Una gran cantidad de antecedentes sugieren que el daño y subsiguiente muerte celular causado por las NPs se genera en consecuencia a un aumento en los niveles intracelulares de ROS. Por lo que al observar el arresto del crecimiento de los cultivos causado por 50 y 100 µg/ml de AgNPs (Fig. 17-20), se llevaron a cabo las observaciones de los niveles de ROS a los 0, 7 y 10 días de crecimiento de cultivos adicionados con estas concentraciones de AgNPs utilizando la reacción con el 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21.

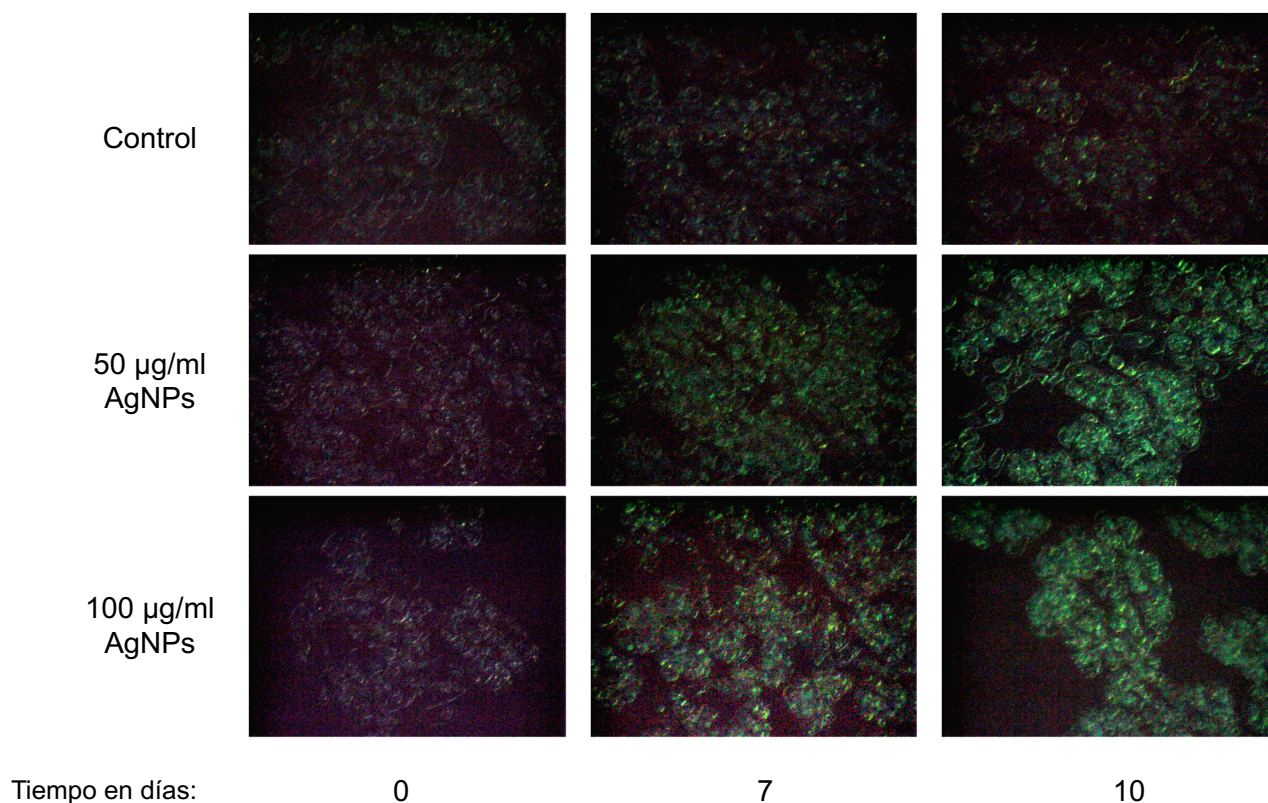


Figura 21. Niveles de ROS en células de cultivos de suspensión de tabaco adicionados con AgNPs. Se tomaron alícuotas de cultivos suplementados con diferentes concentraciones de AgNPs, las células fueron expuestas a H₂DCFDA y se fotografiaron con el microscopio Nikon de epifluorescencia. Se muestran las fotografías representativas de los diferentes tratamientos.

En los experimentos con H₂DCFDA, las células de los cultivos suplementados con 50 y 100 µg/ml presentaron una mayor intensidad de ROS a los 7 y 10 días de crecimiento, demostrando un aumento en los niveles de ROS inducidos por los tratamientos con AgNPs.

8. DISCUSIÓN

La cinética de crecimiento típica de los cultivos NT-1 consta de tres fases bien diferenciadas: lag durante las primeras horas del cultivo, donde las células se adaptan al medio de cultivo y presentan escasa actividad mitótica, log donde una gran cantidad de células están en mitosis lo que representa un crecimiento exponencial y una fase estacionaria en la que el agotamiento de nutrientes ocasiona un coeficiente de crecimiento nulo (Matsuoka *et al.*, 2004). Las cinéticas obtenidas en el presente trabajo se asemejan a la descrita anteriormente, exceptuando la cinética correspondiente a la figura 12, donde la fase lag se extiende hasta el cuarto día del cultivo medido por PF y presenta una fase log breve tanto en PF como en PS. Las demás cinéticas presentan el comportamiento típico para el crecimiento de las células NT-1, no obstante, pueden presentar patrones diferentes entre sí al evaluar los tres parámetros de crecimiento PF, PS y VPC; esto se atribuye a las variaciones entre la biomasa y el contenido de agua de las muestras (Gould, 1984).

La evaluación de los cultivos adicionando AgNPs comenzó en cultivos control suplementados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de estas NPs, donde se esperaba una promoción del crecimiento, sin embargo, esta concentración no fue tóxica ni benéfica para las células NT-1 (Fig. 14 y 16). Por otro lado, al adicionar 10 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs, los cultivos presentaron una disminución del crecimiento en los tres parámetros evaluados (Fig. 14 y 16).

Vazquez-Muñoz, 2017 reportó que en la exposición a AgNPs en cuatro de los cinco grupos taxonómicos naturales (bacterias, protistas, hongos y células animales) incluyendo además una línea cancerígena de humano y virus, la concentración de las AgNPs que causa inhibición en estos organismos y letalidad en las células animales se encuentra alrededor de 10 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, las células vegetales cuentan con una pared celular, que de acuerdo con Chen *et al.*, 2010 representa una estructura crucial en la captación de nanopartículas en comparación con las

células animales, siendo esta estructura capaz de generar una respuesta diferente a dichos materiales (Vazquez-Muñoz, 2017; Chen *et al.*, 2010).

Los cultivos adicionados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs presentaron un crecimiento nulo en todos los parámetros de crecimiento, resultando esta concentración altamente tóxica para las células NT-1 (Fig. 17-18). Al reducir la concentración a la mitad, 50 $\mu\text{g/ml}$, se observó el mismo efecto inhibitorio, de manera que concluimos que a partir de dicha concentración las células de tabaco NT-1 entran en una condición de estrés que les imposibilita su división celular (Fig. 19-20).

El tamaño y forma de las AgNPs, procedimiento de síntesis, contenido de plata metálica y funcionalización de la superficie son algunas de las características por las que una nanopartícula es citotóxica. Además que los materiales a escala nanométrica poseen propiedades fisicoquímicas únicas por lo que su comportamiento es impredecible y puede diferir al presentado por sus homólogos en escalas de mayor tamaño. También, la química de la superficie de las AgNPs desempeña un papel importante en la interacción de las nanopartículas con los sistemas biológicos (Soenen *et al.*, 2015).

En la interacción AgNPs-células, la toxicidad puede ser el resultado de diferentes parámetros como la interacción del nanomaterial con la concentración establecida de células, el medio de cultivo, las condiciones de crecimiento, entre otros. Existe una variedad de antecedentes que reportan la formación de ROS como posible mecanismo para explicar la toxicidad por exposición a nanomateriales. Las ROS, se producen en la célula como resultado del metabolismo normal o en respuesta al estrés biótico y abiótico, tales como la presencia de metales (Leopoldini *et al.*, 2006), heridas (Orozco-Cardenas *et al.*, 2001) y el estrés mecánico (Gould *et al.*, 2002).

Krystofova y colaboradores en su estudio del 2013 dónde adicionaron NPs de Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-OH}$ y $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NH}_2$ a células BY-2 de tabaco, además de estudiar la viabilidad de las células y la relación de GSH/GSSG, sometieron a diferentes pruebas de actividad antioxidante filtrados provenientes de sus tratamientos con 0,

1, 10 y 100 ng/ml de NPs. Los métodos analíticos se basan en la determinación de la actividad captadora de radicales de los antioxidantes frente a radicales libres, como el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). El método DPPH se ha desarrollado para la determinación de la actividad de eliminación de radicales aniónicos superóxido, radicales hidroxilo y radicales peróxido (Kedare y Singh, 2011). El método ABTS se basa en el catión radical del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) -6-sulfónico (ABTS), que se utiliza para seleccionar la actividad captadora de radicales flavonoides y polifenólicos (Re *et al.*, 1999). El método DMPD utiliza una solución tamponada de N, N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) en buffer de acetato. El catión radical DMPD se reduce posteriormente mediante antioxidantes donantes de hidrógeno (Asghar *et al.*, 2007). El ensayo de azul CrO_5 (CRO) se utiliza para la determinación de la actividad antioxidante de una amplia gama de sustratos, el peróxido de cromo se produce a partir de cromato de amonio en un entorno ácido en presencia de peróxido de hidrógeno (Charalampidis *et al.*, 2009). La aplicación de éstas técnicas demostró la reducción significativa de la actividad antioxidante a las dos concentraciones más altas (10 y 100 ng/ml) en el caso de todas las NPs utilizadas; por otro lado, la actividad antioxidante se incrementó casi en todos los casos a la concentración más baja (1 ng/ml), con la excepción de las NPs de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-OH}$. Estas NPs mostraron una reducción de la actividad antioxidante en todas las variantes experimentales. Indicando estos resultados la capacidad de las NPs para generar ROS con la subsiguiente iniciación de mecanismos protectores, incluida la biosíntesis de compuestos antioxidantes protectores.

El modelo de las células BY-2 ha sido también utilizado por Poborilova y colaboradores, 2013 para estudiar la toxicidad de NPs de óxido de aluminio (Al_2O_3) a concentraciones de 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, reportando una disminución en la viabilidad celular con todas las concentraciones utilizadas, además de un aumento dependiente de la dosis y el tiempo en los niveles de peróxido de hidrógeno y ión superóxido. Bajo condiciones de estrés oxidativo se generan cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno que requieren la activación de defensas

adicionales antioxidantes, ya que de lo contrario se produce daño en las membranas, proteínas y otros componentes celulares (Huerta-Heredia *et al.*, 2013).

Al observar al microscopio células de 7 y 10 días de crecimiento tratadas con H₂DCFDA para observar los niveles de ROS intracelulares, se observó en las células tratadas con 50 y 100 µg/ml de AgNPs un aumento en la producción de ROS (Fig. 21), lo cual demuestra una respuesta de las células NT-1 ante las AgNPs en forma de estrés oxidativo, lo cual a su vez puede llevar a una muerte celular programada. Otros efectos adversos en la interacción con AgNPs pueden incluir disfunción mitocondrial, daño al ADN, activación de enzimas catabólicas, deformaciones del citoesqueleto e inhibición de la proliferación celular (Piao *et al.*, 2011).

El término nano contaminación ha sido mencionado en una gran cantidad estudios, refiriéndose a la exposición, acumulación y daño por parte de materiales en la escala nanométrica, particularmente de aquellos que se encuentran en el rango de tamaño entre 1-100 nm. La Fundación National de Ciencia (NSF) de los estados unidos proyectó que el mercado global de productos que incorporan nanotecnología ascendería a tres billones de dólares para el presente año (2020) (Roco, 2011), siendo en 2015 más de 1000 productos comerciales los que contenían diferentes tipos de NPs (Vance *et al.*, 2015). La mayoría de los estudios con NPs indican cierto grado de fitotoxicidad, especialmente a concentraciones altas (Miralles *et al.*, 2012). Dependiendo de su tamaño, las NPs pueden ingresar a las células vegetales desde el apoplasto, atravesar la membrana plasmática por endocitosis y translocarse a diferentes orgánulos subcelulares como el núcleo, los plástidos y las vacuolas. (Chichiriccó y Poma, 2015; Da Costa y Sharma, 2016). El estrés oxidativo ha sido constantemente reportado como una respuesta común de las plantas a las NPs a niveles tóxicos, por lo que los mecanismos a través de los cuales las NPs inducen esta respuesta continúan siendo objeto de investigación (Thwala *et al.*, 2013).

9. CONCLUSIÓN

De manera dosis dependiente las nanopartículas de plata (AgNPs) inhiben el crecimiento de los cultivos NT-1. El efecto tóxico de las AgNPs podría estar en parte relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las AgNPs inhiben el crecimiento de los cultivos NT-1 a través de un estrés oxidativo.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aitchison, P.A., A.J. Macleod y M.M. y Yeoman. 1977. **Growth patterns in tissue (callus) cultures. Plant tissue and cell culture.** In: Street H. E. (Ed.) Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ., Oxford., England. pp. 267-306.
- Al-Babili, S. y H.J. Bouwmeester. 2015. **Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone.** Annu. Rev. Plant Biol. 66: 161-186.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 2015. **Molecular Biology of the Cell.** 6th edition. Ed. Garland Science, Taylor & Francis Group. New York. U.S. pp. 963-1019.
- Almonaci-Hernández, C.A., K. Juárez-Moreno, M. E. Castañeda-Juarez, H. Almanza-Reyes, A. Pestryakov y N. Bogdanchikova. 2017. **Silver nanoparticles for the rapid healing of diabetic foot ulcers.** Human Exp. Toxicol. 9: 31–948.
- Alvarez, R.C., S.J. Nissen y S.G. Ernst. 1994. **Selection, enrichment and initial characterization of an elongated cell culture of tobacco.** Plant Sci. 103: 73 – 79.
- Apel, K. y H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: **Metabolism, oxidative stress, and signal transduction.** Annu. Rev. Plant Biol. 55: 373-399.
- Asghar, M.N., I.U. Khan, M.N. Arshad y L. Sherin. 2007. **Evaluation of antioxidant activity using an improved dmpd radical cation decolorization assay.** Acta. Chim. Slov. 54: 295-300.
- Batley, G.E., J.K. Kirby y M.J. McLaughlin. 2013. **Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments.** Acc. Chem. Res. 46: 854–862.

- Bello-Bello, J.J., J.L. Spinoso-Catillo, S. Arano-Avalos, E. Martínez-Estrada, M. E. Arellano-García, A. Pestryakov, Y. Toledano Magaña, J.C. García-Ramos y N. Bogdanchikova. 2018. **Cytotoxic, genotoxic and polymorphism effects on *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews after long-term exposure to argovit silver nanoparticles.** Nanomateriales 8: 754.
- Bhaskar, S., F.R. Tian, T. Stoeger, W. Kreyling, J.M. de la Fuente, V. Grazu, P. Borm, G. Estrada, V. Ntziachristos y D. Razansky. 2010. **Multifunctional nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: Perspectives on tracking and neuroimaging.** Part. Fibre Toxicol. 7: 1–25.
- Bienert, G.P., J.K. Schjoerring y T.P. Jahn. 2006. **Membrane transport of hydrogen peroxide.** Biochem. Biophys. Acta. 1758: 994-1003.
- Boatwright, J.L. y K. Pajerowska-Mukhtar. 2013. **Salicylic acid: an old hormone up to new tricks.** Mol. Plant Pathol. 14: 623-634.
- Borrego, B., G. Lorenzo., J.D Mota-Morales., H. Almanza-Reyes, F. Mateos, E. Lopez-Gil, N. de la Losa, V.A. Burmistrov, A.N. Pestryakov, A. Brun y N. Bogdanchikova. 2016. **Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of rift valley fever virus *in vitro* and *in vivo*.** Nanomed. 12: 1185 - 1192.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem y R.L. Jones. 2000. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** Amer. Soc. Plant Physiol. U.S.A. 1367: 528 -565.
- Calva, C.G. y V.J. Pérez. 2005. **Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro.** Rev. Dig. Univ. 6: 1067-6079.
- Carew, D.P. y E.J. Staba. 1965. **Plant tissue culture; its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies.** Lloydia 28: 1-26.

- Castro-Mercado, E. y E. García-Pineda. 2013. **Peróxido de hidrógeno: molécula de señalización involucrada en el desarrollo vegetal**. En: Fronteras en la bioquímica del desarrollo de las plantas. Beltrán-Peña E. y J. López-Bucio (Eds). Morevalladolid S. de R.L. de C.V. Pp. 40-52.
- Charalampidis, P.S., P. Veltsistas, S. Karkabounas y A. Evangelou. 2009. **Blue CrO₅ assay: A novel spectrophotometric method for the evaluation of the antioxidant and oxidant capacity of various biological substances**. Eur. J. Med. Chem. 44: 4162-4168.
- Chen, J.-Q., X.P. Meng, Y. Zhang, M. Xia y X.P. Wang. 2008. **Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice**. Biotechnol. Lett. 30: 2191–2198.
- Chen, R., T.A. Ratnikova, M.B. Stone, S. Lin, M. Lard, G. Huang, J.S. Hudson y P.C Ke. 2010. **Differential uptake of carbon nanoparticles by plant and mammalian cells**. Small 6: 612–617.
- Chichiriccó, G. y A. Poma. 2015. **Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants**. Nanomat. 5: 851-873.
- Comotto, M., A.A. Casazza, B. Aliakbarian, V. Caratto, M. Ferretti y P. Perego. 2014. **Influence of TiO₂ nanoparticles on growth and phenolic compounds production in photosynthetic microorganisms**. Sci. World J. 2014:9
- Conlan, I. y M. Raff. 1999. **Size control in animal development**. Cell Sci. 96: 235-244.
- Cox, A., P. Venkatachalam, S. Shivendra y S. Nilesh. 2016. **Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research**. Plant Physiol. Biochem. 107: 147-16.

- Crozier, A., Y. Kamiya, G. Bishop y T. Yokota. 2000. **Biosynthesis of hormones and elicitors molecules**. In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Ed.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. 850-929.
- Cui, M., W. Zhang, Q. Zhang, Z. Xu, Z. Zhu, F. Duan. 2011. **Induced over- expression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice**. Plant Physiol. Biochem. 49: 1384–1391.
- Da Costa, M.V.J. y P.K. Sharma. 2016. **Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa***. Photosynthetica 54: 110-119.
- Dashek, W.V. y M. Harrison. 2006. **Plant Cell Biology**. Ed. Routledge y CRC Press. Taylor & Francis Group. Sci. Pub. U.S.A. pp. 197–226.
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranová, M. van Montagu, D. Inzé y F. van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol. Life Sci. 57: 779-795.
- De la Rosa, G., M.L. Lopez-Moreno, J. Hernandez-Viezcas, M.O. Montes, J.R. Peralta-Videa y J.L. Gardea-Torresdey. 2011. **Toxicity and biotransformation of ZnO nanoparticles in the desert plants *Prosopis juliflora-velutina*, *Salsola tragus* and *Parkinsonia florida***. Int. J. Nanotechnol. 8: 492–506.
- De Smet, I., H. Zhang, D. Inzé y T. Beeckman. 2006. **A novel role for abscisic acid: emergence of a core signaling network**. Ann. Rev. Plant Biol. 61:651-679.
- Dellapenna, D. y B.J. Pogson. 2006. **Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids**. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 711-738.
- Dimkpa, C., J. Mclean, D. Latta, E. Manangón, D. Britt y W. Johnson. 2012. **CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat**. J. Nanopart. Res. 14: 1–15.

Dixon, R. A. 1985. **Plant cell culture: a practical approach**. Ed. IRL PRESS. Oxford. U.K. Pp.1-20.

Dixon, R. A., y N.L Paiva. 1995. **Stress-induced phenylpropanoid metabolism**. Plant Cell 7: 1085–1097.

Dizaj, S.M., F. Lotfipour, M. Barzegar-Jalali, M.H. Zarrintan y K. Adibkia. 2014. **Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles**. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 44: 278–284.

Evans, D.A., W.R. Sharp y C.E. Flick. 1981. **Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis**. In T.A. Thorpe (Ed.) Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. pp. 45–113.

Farias Escalera. A., E. Beltrán Peña y M. A. Pardo Galván. 2005. **Control molecular del ciclo celular eucariótico**. Ciencia Nicolaita. 42: 37-56.

Field, B., A.S. Fiston-Lavier, A. Kemen, K. Geisler, H. Quesneville y A.E. Osbourn, 2011. **Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions**. Proc. Natl. Acad. Sci. 108: 16116-16121.

Foltman, H. y A. Quadir. 2012. **Excipient update, Polyvinylpyrrolidone (PVP) - one of the most widely used excipients in pharmaceuticals: an overview**. Drug Deliv. Tech. 6: 22-27.

Franci, G., A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli y M. Galdiero. 2015. **Silver nanoparticles as potential antibacterial agents**. Molecules 20: 8856–8874.

Franco-Molina, M.A., E. Mendoza-Gamboa, C.A. Sierra-Rivera, R.A. Gomez-Flores, P. Zapata-Benavides, P. Castillo-Tello y C. Rodríguez-Padilla. 2010. **Antitumor**

activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. J. Exp. Clin. Cancer Res. 29.

Franklin, C.I. y R.A. Dixon. 1994. **Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures.** Dixon R.A., and Gonzales R.A. (Eds.) Plant Cell Culture. The practical approach series. Pp. 230: 1 -25.

Franklin, G., L.F.R. Conceição, E. Kombrink y A.C.P. Dias. 2009. **Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress.** Phytochem. 70: 60–68.

Fu, P. P., Q. Xia, H. M. Hwang, P.C. Ray y H. Yu. 2014. **Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species.** J. Food Drug Anal. 22: 64–75.

Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe y I.K. Vasil. 1976. **Plant tissue culture media.** In Vitro. 12: 473 – 478.

Gardea-Torresdey, J.L., E. Gomez, J. Peralta-Videa, J. Parsons, K. Tiemann, H. Troiani y M.J. Yacaman. 2003. **Use of XAS and TEM to determine the uptake of gold and silver and nanoparticle formation by living alfalfa plants.** Abstr. Pap. Am. Chem. Soc. 225, 837.

Gatehouse J.A. 2008. **Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants.** Plant Physiol. 146: 881-887.

Gechev, T.S., F. Van Breusegem, J.M. Stone, I. Denev y Laloi C. 2006. **Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death.** Bioessays 28:1091-1101.

Geelen, D.N.V. y D.G. Inzé. 2001. **A bright future for the bright yellow-2 cell culture.** Plant Physiol. 127:1375 – 1379.

- Geisler-Lee, J., M. Brooks, J.R. Gerfen, Q. Wang, C. Fotis, A. Sparer, X.M. Ma, R.H. Berg y M. Geisler. 2014. **Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana***. *Nanomat.* 4: 301-318.
- Geisler-Lee, J., Q. Wang, Y. Yao, W. Zhang, M. Geisler, K.G. Li, Y. Huang, Y.S. Chen, A. Kolmakov y X.M. Ma. 2013. **Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana***. *Nanotoxicol.* 7: 323-337.
- Ghorbanpour, M. y J. Hadian. 2015. **Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro***. *Carbon* 94: 749–759.
- Gould K.S., J. McKelvie y K.R. Markham. 2002. **Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury**. *Plant Cell Environ.* 25: 1261-1269.
- Gould, A. 1984. **Control of the cell cycle in cultured plant cells**. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 1: 315-344.
- Green J.M. y M.D.K. Owen. 2011. **Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management**. *J. Agric. Food. Chem.* 59: 5819-5829.
- Heller, R. 1953. **Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultivés *in vitro***. *Ann. Sci. Natl. Biol. Veg.* 14: 1-223.
- Henzler, T. y E. Steudle. 2000. **Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: Model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels**. *J. Exp. Bot.* 51: 2053-2066.

- Hong, J., J.R. Peralta-Videa y C. Rico. 2014. **Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO₂ nanoparticles on cucumber (*Cucumis sativus*) plants.** Environ. Sci. Technol. 48: 4376–4385.
- Hoshino, A., N. Manabe, K. Fujioka, K. Suzuki, M. Yasuhara y K. Yamamoto. 2007. **Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: Surface modification regulates biological function, including cytotoxicity.** J. Artif. Organs 149–157.
- Hossain, Z., G. Mustafa y S. Komatsu. 2015. **Plant responses to nanoparticles stress.** Int. J. Mol. Sci. 16: 26644-26653.
- Huerta-Heredia A. A., I. Vera-Reyes y A.C. Ramos-Valdivia. 2013. **Participación del estrés oxidativo en la señalización e inducción del metabolismo secundario de plantas.** En: Fronteras en la Bioquímica del desarrollo de las plantas. Beltrán-Peña E. y J. López-Bucio (Eds). Morevalladolid S. de R.L. de C.V. Pp. 108-114.
- Huh, A.J. y Y.J. Kwon. 2011. **Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotic's resistant era.** J. Control. Rel. 156: 128–145.
- Ichikawa, T. y K. Syño. 1991. **Tobacco genetic tumors.** Plant Cell Physiol. 32: 1123-1128.
- Imin N., M. Nizamidin y D. Daniher. 2005. **Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments.** Plant Physiol. 137: 1250-1260.
- Ishida, S., Y. Takahashi y T. Nagata. 1993. **Isolation of an auxin-regulated gene encoding a G protein β subunit-like protein from tobacco BY-2 cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 11152–11156.

Jafar, G. y G. Hamzeh. 2013. **Ecotoxicity of nanomaterials in soil**. Ann. Biol. Res. 4: 86–92.

Juarez-Moreno, K., E.B. Gonzalez, N. Girón-Vazquez, R.A. Chávez-Santoscoy, J.D. Mota-Morales, L.L. Perez-Mozqueda, M.R. Garcia-Garcia, A. Pestryakov y N. Bogdanchikova. 2017. **Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines**. Human and Exp. Toxicol. 9: 931-948.

Kabir, E., V. Kumar, K.H Kim, A.C.K. Yip y J.R. Sohn. 2018. **Environmental impacts of nanomaterials**. J. Environ. Manag. 225: 261–271.

Kato, K., T. Matsumoto, A. Koiwai, S. Mizuasaki, K. Nishida, M. Noguchi y E. Tamaki. 1972. **Liquid suspension culture of tobacco cells**. Terui, G. (Ed.). Fermentation technology today. Proc. IV IFS. Osaka, Japan. Pp. 890: 689-695.

Kaveh, R., Y.S. Li, S. Ranjbar, R. Tehrani, C.L. Brueck y B. Van Aken. 2013. **Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions**. Environ. Sci. Technol. 47: 10637-10644.

Kedare, S.B. y R.P. Singh. 2011. **Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay**. J. Food Sci. Technol. 48: 412-422.

Khodakovskaya, M., E. Dervishi, M. Mahmood, Y. Xu, Z. Li, F. Watanabe y A.S. Biris. 2009. **Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth**. ACS Nano. 3: 3221–3227.

Klasen, H.J. 2000. **A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver**. Burns. 26:131-138.

- Korasick, D. A. y T.A. Enders. 2013. **Auxin biosynthesis and storage forms**. J. Exp. Bot. 9: 2541-2555.
- Krikorian, A.D. y D.L. Berquam. 1969. **Plant cell and tissue culture: The role of Haberlandt**. Bot. Rev. 35: 59-88.
- Krystofova, O., J. Sochor, O. Zitka, P. Babula, V. Kudrle, V. Adam y R. Kizek. 2013. **Effect of magnetic nanoparticles on tobacco BY-2 cell suspension Culture**. Int. J. Environ. Res. Public Health. 10: 47-71.
- Lara, H.H., E.N. Garza-Treviño, L. Ixtepan-Turrent y D.K. Singh. 2011. **Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and viricidal compounds**. J. Nanobiotechnol. 9: 30.
- Lee, W.M., Y.J. An, H. Yoon y H.S Kweon. 2008. **Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles**. Environ. Toxicol. Chem. 27: 1915–1921.
- Leopoldini M., N. Russo, S. Chiodo y M. Toscano. 2006. **Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin**. J. Agric. Food Chem. 54: 6343-6351.
- Lestari E.G. 2006. ***In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance**. Biodiversitas 7: 297-301.
- Linsmaier, E.M. y F. Skoog. 1965. **Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures**. Physiol. Plant. 18: 100-127.
- Locatelli, E., M. Naddaka, C. Uboldi, G. Loudos, E. Fragogeorgi, V. Molinari y M.C. Franchini. 2014. **Targeted delivery of silver nanoparticles and alisertib: *in vitro* and *in vivo* synergistic effect against glioblastoma**. Nanomed. 9: 839-849.

- Lopez-Moreno, M.L., G. de la Rosa, J.A. Hernandez-Viezcas, H. Castillo-Michel, C.E. Botez, J.R. Peralta-Videa y J.L. Gardea-Torresdey. 2010. **Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants.** Environ. Sci. Technol. 44: 7315–7320.
- Loyola-Vargas, V.M. y F. Vázquez-Flota. 2006. **Plant Cell Culture Protocols.** En: Methods in Molecular Biology, vol. 318. Walker J.M. (Ed.). Humana Press Inc. Second edition. U.S.A.
- Loyola-Vargas, V.M. y N. Ochoa-Alejo. 2018. **An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives.** En: Plant Cell Culture Protocols. Meth. Mol. Biol. Loyola-Vargas V.M. y Ochoa-Alejo N. (Eds). Vol 1815. Springer Science.
- Ma, X., J. Geisler-Lee, Y. Deng y A. Kolmakov. 2010. **Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation.** Sci. Total Environ. 408: 3053-3061.
- Maiti, S., I. Fournier, S.K. Brar y M. Cledon. 2016. **Nanomaterials in surface water and sediments: fate and analytical challenges.** J. Hazard. Toxic. Radio. Waste 1: 20.
- Marslin, G., C.J. Sheeba y F. Gregory. 2017. **Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst.** Front. Plant Sci. 8: 832.
- Matsukura, S., J. Mizoi, T. Yoshida, D. Todaka, Y. Ito y K. Maruyama. 2010. **Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes.** Mol. Genet. Gen. 283: 185–196.
- Matsuoka, K., T. Demura, I. Galis, T. Horiguchi, M. Sasaki, G. Tashiro y H. Fukuda. 2004. **A comprehensive gene expression analysis toward the understanding of**

growth and differentiation of tobacco BY-2 cells. Plant Cell Physiol. 45: 1280 – 1289.

Mhamdi, A. y F. V. Breusegem. 2018. **Reactive oxygen species in plant development.** Development 145.

Miller, C.O., F. Skoog y M.H. Von-Saltza. 1955. **Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid.** J. Am. Chem. Soc. 77: 1392.

Miralles, P., T.L. Church y A.T. Harris. 2012. **Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants.** Environ. Sci. Technol. 46: 9224-9239.

Mirzajani, F., H. Askari, S. Hamzelou, Y. Schober, A. Rompp y A. Ghassempour. 2014. **Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 108: 335–339.

Mishra, V.K. y A. Kumar. 2009. **Impact of metal nanoparticles on the plant growth promoting rhizobacteria.** Dig. J. Nanomater. Biostruct. 4: 587–592.

Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery y F. Van Breusegem. 2004. **Reactive oxygen gene network of plants.** Trends Plant Sci. 9: 490-498.

Mohsenzadeh, S., M. Esmaeili, F. Moosavi, M. Shahrtash, B. Saffari y H. Mohabatkar. 2011. **Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution.** Afr. J. Biotech. 10: 8160–8165.

Moller, I.M., P.E. Jensen y A. Hansson. 2007. **Oxidative modifications to cellular components in plants.** Annu. Rev. Plant Biol. 58: 459-481.

Morgan, D.O. 2007. **The cell cycle: principles and control.** New Science Press Ltd, Sinauer Associates, Inc., Publishers and Oxford University Press. U. K. Pp. 297.

- Mukhopadhyay, S.S. 2014. **Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints.** Nanotechnol. Sci. Appl. 7: 63–71.
- Munguía-Rodríguez, A., J. López-Bucio, M. Martínez-Trujillo y E. Beltrán-Peña. 2018. **Vías de señalización de las hormonas vegetales.** En: Fronteras en la Biología: Señalización y Comunicación de las Plantas. Beltrán-Peña E., M. Martínez-Trujillo y J. López-Bucio (Eds.) Morevalladolid S. de R.L. de C.V. Pp. 2-16.
- Nadworny, P.L., J. Wang, E.E Tredget y R.E. Burrell. 2010. **Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis.** J. Inflamm. Lond. 7-13.
- Nagata T., Y. Nemoto y S. Hasezawas. 1992. **Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants.** Int. Rev. of Cyt. 132: 1-30.
- Nagata, T. 2004. **Improvements of the molecular toolbox for cell cycle studies in Tobacco BY-2 cells.** In: Biotechnology in agriculture forestry. Nagata T., Haseqawa S. e Inzé D. (Eds). Vol 53. Springer, Berlin Heidelberg. Pp: 7-8.
- Nagata, T. y F. Kumangai. 1999. **Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line.** Meth. Cell Sci. 21: 123 – 127.
- Nagata, T., S. Hasezawa, D. y D. Inzé 2004. **When I encountered Tobacco BY-2 Cells.** In: Biotechnol Agr. Forest, vol 53. Nagata T. H. Lörz y J. M. Widholm (Eds). Springer, Berlin Heidelberg. Pp: 1-5.
- Nagata, T., S. Ishida, S. Nagata y Y. Takahashi. 1999. **Factors affecting cell division in plant cells.** In: Plant Biotech & *in vitro* Biol. Altman A. (Ed.). 21st Century. Kluwer, Norwell, M.A.

- Nair, P.M.G. y I.M. Chung. 2014. **Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana***. Environ. Sci. Pollut. Res. 21: 8858-8869.
- Neelakandan A.K. y K. Wang. 2012. **Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications**. Plant Cell Rep. 31: 597-620.
- Nowack, B. y T.D. Bucheli. 2007. **Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment**. Environ. Pollut. 150:5–22.
- Ochoa-Meza, A.R., A. R. Álvarez-Sánchez, C.R. Romo-Quíñonez, A. Barraza, F.J. Magallón-Barajas, A. Chávez-Sánchez, J.C. García-Ramos, Y. Toledano-Magaña, N. Bogdanchikova, A. Pestryakov y C. Humberto Mejía-Ruiz. 2019. **Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system**. Fish Shellfish Immunol. 84: 1083–1089.
- Orozco-Cárdenas M.L., J. Narváez-Vásquez y C.A. Ryan. 2001. **Hydrogen peroxide acts as second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin and methyl jasmonate**. Plant Cell 13: 179-191.
- Pahlich, E., C. Muller y H.J. Jager. 2007. **New insights into the dynamics of the glutathione-ascorbate redox system of plants**. J. Appl. Bot. Food Qual. 81: 110–120.
- Parsons, J.G., M.L. Lopez, C.M. Gonzalez, J.R. Peralta-Videa y J.L. Gardea-Torresdey. 2010. **Toxicity and biotransformation of uncoated and coated nickel hydroxide nanoparticles on mesquite plants**. Environ. Toxicol. Chem. 29: 1146–1154.

- Perilli, S., L. Moubayidin y S. Sabatini. 2010. **The molecular basis of cytokinin function.** Curr. Opin. Plant Biol. 13: 21-26.
- Piao, M.J., K.A. Kang e I.K. Lee. 2011. **Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis.** Toxicol. Lett. 201: 92-100.
- Poborilova, Z., R. Opatrilova y P. Babula. 2013. **Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a *BY-2* plant cell suspension culture model.** Environ. Exp. Bot. 91: 1–11.
- Poelman, E.H., J.J.A. Van Loon y M. Dicke. 2008. **Consequences of variation in plant defense for biodiversity at higher trophic levels.** Trends Plant Sci. 13: 534-541.
- Qian, H., X. Peng, X. Han, J. Ren, L. Sun y Z. Fu. 2013. **Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model: *Arabidopsis thaliana*.** J. Environ. Sciences-China 9: 1947-1956.
- Rai, M., A. Yadav y A. Gade. 2009. **Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.** Biotechnol. Adv. 27: 76-83.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans. 1999. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** Free Radic. Biol. Med. 26: 1231-1237.
- Roco, M. C. 2011. **The Long View of Nanotechnology Development: The National Nanotechnology Initiative at 10 years.** J. Nanopart. Res. 13: 427-445.
- Saxena, D., S. Flores y G. Stotzky. 1999. **Transgenic plants. Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn.** Nature 2: 480-481.

- Sewelam, N., K. Kazan y P.M. Schenk. 2016. **Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road**. Front. Plant Sci. 7:187.
- Shimizu, T., K. Eguchi, I. Nishida, K. Laukens, E. Witters, H. Van Onckelen y T. Nagata. 2006. **A novel cell division factor from tobacco 2B-13 cells that induced cell division in auxin-starved tobacco BY-2 cells**. Naturwissenschaften 93: 278-285.
- Singh, A. K., B.U. Choudhury y B.A.M. Bouman. 2002. **Proceedings of the international workshop on water-wise rice pro-duction In: Water-wise rice production**. B. A. M. Bouman, H. Hengsdijk, B. Hardy, P. S. Bindraban, T. P. Tuong, and J. K. Ladha (Eds.) Los Baños. Philippines. Pp. 237–248.
- Singh, R.J. 2002. **Plant cytogenetics**. CRC Press. Second edition. 463: 7-57, 277-326.
- Skoog, F. y C.O. Miller. 1957. **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro**. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118–131.
- Smita, S., S.K. Gupta, A. Bartonova, M. Dusinska, A.C. Gutleb y Q. Rahman. 2012. **Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach**. Environ. Health 11: 1-13.
- Soenen, S.J., W.J. Parak, J. Rejman y B. Manshian. 2015. **(Intra) Cellular stability of inorganic nanoparticles: effects on cytotoxicity, particle functionality, and biomedical applications**. Chem. Rev. 113: 2109-2135.
- Sosan, A., D. Svistunenko, D. Straltsova, K. Tsiurkina, I. Smolich, T. Lawson. 2016. **Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants**. Plant J. 85: 245–257.

- Soundappan, I., T. Bennet, N. Morffy, Y. Liang, J.P. Stanga, A. Abbas, O. Leyser y D.C. Nelson. 2015. **SMAX1-LIKE/D53 family members enable distinct MAX2-dependent responses to strigolactones and karrikins in Arabidopsis.** Plant Cell 27: 3143-3159.
- Spinoso-Castillo, J.L., R.A. Chavez-Santos, N. Bogdanchikova, J.A. Pérez-Sato, V. Morales-Ramos y J.J. Bello-Bello. 2017. **Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system.** Plant Cell Tissue Organ Cult. 129:195–207.
- Stepanova, A.N. y J.M. Alonso. 2009. **Ethylene signaling and response: Where different regulatory modules meet.** Curr. Opin. Plant Biol. 12: 548-555.
- Steward, F.C. 1969. Plant Physiology: 4 Treatise. Academic Press. Pp. 3-224.
- Street, H.E. 1969. The induction of cell division in plant cell suspension cultures. In: Colloq. Int. C.N.R.S. (Ed.) Les cultures de tissues de plants. Paris., France. Pp. 177-93.
- Street, H.E. 1977. Cell (suspension) cultures techniques. In: Street H.E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing, Oxford., England, pp. 61-102.
- Szalai, G., T. Kellos, G. Galiba y G. Kocsy. 2009. **Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions.** J. Plant. Growth Regul. 28: 66–80.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. Fisiología Vegetal. Castello de la Plana. Vol. 2. Publicaciones de la Universitat Jaume I, D.L. pp. 910-915.

- Tempé, J. y J. Schell. 1985. **La manipulación de las plantas**. Mundo Científico 7: 792-801.
- Tepe, M. y H. Harms. 1995. **Influence of abiotic stress on the GSH/GSSG system of plant-cell cultures**. Zeitschrift Pflanzen. Boden. 158: 75–78.
- Thimann, K.V. y C.L. Schneider. 1939. **The relative activities of different auxins**. Am. J. Bot. 26: 328–333.
- Thwala, M., N. Musee, L. Sikhwivhilu y V. Wepener. 2013. **The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters**. Environ. Sci. Process. Impacts 15: 1830–1843.
- Todaka, D., K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki. 2015. **Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants**. Front. Plant Sci. 6:84.
- Tripathi, D. K., S. Singh, S. Singh, P.K. Srivastava, V.P. Singh, S. Singh. 2017. **Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings**. Plant Physiol. Biochem. 110: 167–177.
- Vance, M. E., T. Kuiken, E.P. Vejerano, S.P. McGinnis, Jr. Hochella y D. Rejeski. 2015. **Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory**. Beilstein J. Nanotechnol. 6: 1769-1780.
- Vazquez-Muñoz, R., B. Borrego, K. Juárez-Moreno, M. García-García, J. Mota, N. Bogdanchikova y A. Huerta-Saqueroa. 2017. **Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter?** Tox. Lett. 276: 11-20.

- Vecerová, K., Z. Vecera, B. Docekal, M. Oravec, A. Pompeiano, J. Tríska. 2016. **Changes of primary and secondary metabolites in barley plants exposed to CdO nanoparticles.** Environ. Pollut. 218: 207–218.
- Wang, J., C. Asbach, H. Fissan, T. Hulser, T.A.J. Kuhlbusch, D. Thompson y D.Y.H. Pui, 2011. **How can nanobiotechnology oversight advance science and industry: Examples from environmental, health, and safety studies of nanoparticles (nano-EHS).** J. Nanopart. Res. 1373–1387.
- Wang, Z.Y. 2012. **Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels.** Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 7-8.
- Wang, Z.Y., J. Li, J. Zhao y B. Xing. 2011. **Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter.** Env. Sci. Tech. 45: 6032–6040.
- Wasternack, C. y B. Hause. 2013. **Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in annals of botany.** Ann Bot. 111: 1021-1058.
- White, P.R. 1963. **The Cultivation of Animal and Plant Cells.** 2nd ed. Ronald Press, New York U.S.
- Wickramasuriya A.M. y J.M. Dunwell. 2015. **Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis *in vitro*.** BMC Genomics 16: 301.
- Woodward, A. W. y B. Bartel. 2005. **Auxin: regulation, action, and interaction.** Ann. Bot. 95: 707-735.

- Xia, B., B. Chen, X. Sun, K. Qu., F. Ma y M. Du. 2015. **Interaction of TiO₂ nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia Closterium*: growth inhibition, oxidative stress and internalization.** Sci. Total Environ. 508: 525-533.
- Yamaguchi, S. 2008. **Gibberellin metabolism and its regulation.** Annu. Rev. Plant Biol. 59: 225-251.
- Ye, X., S. Al-Babili, A. Kloti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer y I. Potrykus. 2000. **Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm.** Science 287: 303–305.
- Yeoman, M.M. 1970. **Early development in callus cultures.** Int. Rev. Cytol. 29: 383-409.
- You-yu, S., H. Jui-Hung, C. Jui-Chang y C. Huey-wen. 2014. **Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression.** Plant Physiol. Biotech. 83: 57-64.
- Zhao, L., B. Peng, J.A. Hernandez-Viezcas, C. Rico, Y. Sun y J. R. Peralta-Videa. 2012. **Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO₂ nanoparticles: cross talk among H₂O₂, heat shock protein, and lipid peroxidation.** ACS Nano 6: 9615–9622.

