

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN Y
TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

Por:

Q.F.B. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS

con orientación terminal en Farmacología y Toxicología

Agosto 2010

El proyecto de la tesis fue realizado en:

Departamento de Farmacología y Toxicología
de la Facultad de Medicina, UANL.

Agradecimientos

A Dios por darme la vida, los medios necesarios para lograr mis metas, por rodearme de su amor cuando más he necesitado y por todas las personas que cruzaste en mi camino.

A la Dr.med Lourdes Garza Ocañas por permitirme ser parte de este proyecto, por su asesoría, apoyo y sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. José Miguel Yacamán por proporcionar las NPs de Ag para este estudio.

Al Dr. en C. Víctor Armando, al M.V.Z. Gilberto Arévalo, a los Q.C.B. Mónica González, Arturo Longoria y a la TLC Martha Laura Hernández por su apoyo en el área de bioensayos, de absorción atómica y de cultivo de células.

A la Dr. en C. María Teresa Zanatta Calderón y al Dr. med. Juan Antonio Cuellar López por sus valiosos comentarios y sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

.A mis compañeros, pero sobre todo amigos: Omar, Christian, Cris, Arge, Zuly, Paty, Sandra y Sergio por su cariño y solidaridad en mis dificultades.

A todo el personal del Departamento de Farmacología y Toxicología, quienes fueron mi familia durante la realización de este trabajo.

Al PAICyT (UANL) y al CONACYT por la beca otorgada

Dedicatoria

A mis padres: Alicia y Florentino, que siguen siendo un apoyo y ejemplo.

A mi esposo e hijo: Homero y Diego, quienes son el motor de mi vida.


**Al Dr. med. Oscar Torres Alanís y a la Dr. med. María Victoria Bermúdez,
por marcar mi vida con sus enseñanzas (QEPD)**

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN Y TOXICIDAD DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

Aprobación de Tesis:




Dr. med. Lourdes Garza Ocañas
Director de Tesis




Dr. Miguel José Yacamán
Director Externo de Tesis



Dr. C. Víctor Armando Tamez Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dr. C. María Teresa Zanatta Calderón
Co-Director de Tesis



Dr. med. Juan Antonio Cuéllar López
Co-Director de Tesis



Dr. med. Juan O Galindo Galindo
Subdirector de Estudios de Posgrado

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título de estudio:

EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN Y TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Número de páginas:

Candidato para la obtención del Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología.

Área de estudio: Farmacología y Toxicología

Propósito y Método de estudio: El desarrollo de la nanotecnología ha producido un gran número de productos comerciales basados en nanopartículas y de particular interés, es su uso terapéutico en el área de la salud. Tal es el caso de las nanopartículas de plata para las cuales se ha reportado actividad antibacteriana así como contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Por lo anterior los estudios preclínicos para la evaluación de la cinética de distribución y particularmente de la toxicidad de las nanopartículas de plata constituyen un campo de gran importancia para poder establecer su seguridad en el humano. En el presente trabajo se evaluó la cinética de distribución de nanopartículas de plata, se determinó la eliminación de las nanopartículas de plata por orina y heces, así como su toxicidad *“in vitro”* e *“in vivo”*. Para la evaluación de la cinética de distribución se utilizaron ratas wistar (130 ±10 g) las cuales fueron mantenidas en ciclos de 12h luz/obscuridad y con acceso a agua y alimento *ad libitum*, los animales fueron divididos en 6 grupos (n=6). Grupos 1, 2 y 3 recibieron las nanopartículas de plata (50mg/Kg) vía IP. Los grupos 4, 5 y 6 (grupos control) recibieron agua destilada. Los animales de los grupos 1, 2 y 3 y sus respectivos controles fueron sacrificados a las 24h, 4 y 7 días respectivamente y se obtuvieron muestras de los siguientes órganos: hígado, riñón, corazón, pulmón cerebro y bazo y de sangre. La cinética de distribución se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión con Espectroscopía de Energía Dispersiva por rayos X (EEDX) en los órganos, y se determinó el contenido de plata en los órganos y sangre por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA). Para determinar la eliminación de nanopartículas por orina y heces se formaron 2 grupos (n=6). El grupo 1 recibió las nanopartículas de plata (50mg/Kg) vía IP. El grupo 2 (grupo control) recibió agua destilada, los grupos fueron habituados en jaulas metabólicas en las condiciones de laboratorio antes mencionadas y se recolectaron muestras de orina y heces en los días 1, 4, 7 y 21 después de la administración de nanopartículas de plata. Se determinó la concentración de Ag mediante EAA. Para evaluar la toxicidad *“in vitro”*, se utilizaron células de hígado de Chang y células L929, las cuales se expusieron a 12 concentraciones de nanopartículas de plata durante 24 y 48 h, se evaluó la actividad mitocondrial con la prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT); la producción de estrés oxidativo, se evaluó en células de hígado de Chang expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y la actividad oxidante se determinó mediante la prueba del diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA); la producción de óxido nítrico (NO), usando el reactivo de Griess se evaluó en una línea celular de Macrófagos (ATCC J774). La evaluación de toxicidad *“in vivo”* se evaluó en ratas Wistar expuestas a diferentes concentraciones de NPs de Ag. **Conclusiones:** Se determinó la presencia de plata en todos los órganos evaluados. Los órganos en los que se encontraron mayores concentraciones de plata fueron: hígado, bazo y corazón siguiendo riñón y pulmón. Tanto las imágenes de microscopía electrónica como de EEDX demostraron la presencia de nanopartículas de plata en hígado, corazón y riñón. No se detectó la presencia de nanopartículas en cerebro pero en el análisis de microscopía electrónica se demostró daño a membranas y organelos así como citoplasma con presencia de vacuolas lo que indica que iones de plata atraviesan la barrera hematoencefálica e interactúan con las células de tejido nervioso. Se determinó la excreción de NPs de Ag en orina tanto por la medición de plata por EAA como por la detección de las NPs de Ag por EEDX. Las NPs de Ag fueron citotóxicas tanto para las células de hígado de Chang como para las células L929 en ambos periodos de exposición y además estimularon la producción de óxido nítrico por los macrófagos. Las nanopartículas de plata no produjeron la muerte de las ratas Wistar expuestas en ninguno de los periodos evaluados.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
APROBACIÓN DE TESIS	v
RESUMEN	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción a la Nanotecnología	1
1.1.1 Nanociencia y Nanotecnología	1
1.1.2 Nanomateriales	2
1.1.3 Aplicaciones de la Nanotecnología	2
1.2 Nanomedicina	3
1.2.1 Aplicaciones de la nanomedicina	3
1.3 Nanopartículas	4
1.3.1 Producción de nanopartículas	5
1.3.2 Nanopartículas de utilidad clínica	6
1.3.3 Efecto de las nanopartículas sobre la salud	8
1.4 Nanopartículas de la plata (NPs de Ag)	11
1.4.1 Evaluación de la actividad biológica de las NPs de Ag	12
1.4.2 Estudios de toxicidad de las NPs de Ag	14
1.5 Etapas para el desarrollo de medicamentos	16
1.6 Objetivo general	20
1.6.1 Objetivos específicos	21
2. MATERIAL Y MÉTODOS	22
2.1 MATERIAL	22
2.1.1 Material biológico	22

2.1.1.1 Líneas celulares	22
2.1.1.2 Animales	22
2.1.2 Material químico	22
2.1.2.1 NPs de Ag (NPs de Ag)	22
2.1.3 Material, reactivos y equipo	23
2.1.3.1 Material y equipo en general	23
2.1.3.2 Reactivos	24
2.1.3.2.1 Reactivos para el cultivo de líneas celulares, prueba de MTT, prueba de DCFDA y producción de óxido nítrico.	24
2.1.3.2.2 Reactivos para la determinación de Ag mediante EAA	26
2.1.3.2.3 Reactivos para la evaluación mediante EEDX.	26
2.2 MÉTODOS	27
2.2.1 Evaluación de la actividad biológica de las NPs de Ag “ <i>In vitro</i> ”	27
2.2.1.1 Procedimiento para el cultivo de líneas celulares	27
2.2.1.2 Evaluación de citotoxicidad	27
2.2.1.2.1 Cultivo de células de hígado de Chang y fibroblastos en placas de 96 celdillas.	27
2.2.1.2.2 Exposición de las células a NPs de Ag	28
2.2.1.2.3 Evaluación microscópica	28
2.2.1.2.4 Prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT)	28
2.2.1.2.5 Cálculo del % de viabilidad celular	29
2.2.1.3 Evaluación de la producción de estrés celular oxidativo por las NPs de Ag mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)	29
2.2.1.3.3 Cálculos	30
2.2.1.5 Evaluación del efecto de las NPs de Ag sobre macrófagos “ <i>in vitro</i> ”	30

2.2.1.5.1 Cultivo de macrófagos y fibroblastos en placas de 96 celdillas	30
2.2.1.5.2 Exposición de macrófagos y fibroblastos a NPs de Ag	31
2.2.1.5.3 Cuantificación de NO mediante el ensayo de Griess	31
2.2.1.5.4 Determinación indirecta del factor de necrosis tumoral alfa	32
2.2.2 Evaluación de la distribución de NPs de Ag en ratas Wistar	33
2.2.2.1 Exposición de ratas Wistar a NPs de Ag	33
2.2.2.2 Obtención de muestras	33
2.2.2.3 Evaluación de la presencia de las NPs de Ag mediante Espectroscopía de Energía Dispersiva por rayos X (EEDX).	34
2.2.2.3.1 Tratamiento de las muestras	34
2.2.2.4 Cuantificación de Ag por EAA	34
2.2.2.4.1 Tratamiento de las muestras	34
2.2.2.4.2 Estándares de plata	35
2.2.2.4.3 Curva de calibración	36
2.2.2.4.4 Procedimiento	36
2.2.2.4.5 Cálculo para determinar la concentración de Ag	36
2.2.3 Determinación de la concentración de plata en muestras de orina y heces	37
2.2.3.1 Exposición de los animales a las NPs de Ag	37
2.2.3.2 Obtención de las muestras	37
2.2.3.3 Tratamiento de las muestras	37
2.2.3.4 Estándares de plata y curva de calibración	38
2.2.3.5 Procedimiento	38
2.2.3.6 Cálculo para determinar la concentración de Ag	38
2.2.4 Evaluación de la toxicidad producida por las	38

3. RESULTADOS	40
3.1 Evaluación de la citotoxicidad	40
3.1.1 Revisión microscópica y prueba de reducción del MTT	40
3.2 Evaluación de estrés celular oxidativo producido por las NPs de Ag mediante la prueba de DCFDA	42
3.3 Efecto de las NPs de Ag sobre la producción de NO y determinación indirecta del TNF- α	43
3.3.1 Producción de NO	43
3.3.2 Determinación indirecta de la liberación del TNF- α	44
3.4 Evaluación de la cinética de distribución	46
3.4.1 Determinación de plata en órganos	46
3.4.2 Determinación de plata en muestras de sangre	51
3.4.3 Determinación de la presencia de NPs de Ag la técnica de Espectroscopía de Energía Dispersiva de rayos X (EEDX)	52
3.4.4 Concentración de plata en muestras de orina y heces	55
3.5 Evaluación de la toxicidad de NPs de Ag <i>in vivo</i>	56
4. DISCUSIÓN	57
5. CONCLUSIONES	64
6. BIBLIOGRAFÍA	65
Resumen autobiográfico	71

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Porcentaje de viabilidad de células de Hígado de Chang obtenido después de 24 h de exposición a NPs de Ag.	40
Figura 2. Porcentaje de viabilidad de células L929 obtenido después de 24 (a) y 48 h (b) de exposición a NPs de Ag.	41
Figura 3. Efecto de las nanopartículas de plata sobre la producción de estrés celular oxidativo en células de hígado de Chang	43
Figura 4. Producción de óxido nítrico por macrófagos expuestos a nanopartículas de plata durante 24 h	44
Figura 5. Efecto de de medio de cultivo de 50 y 100 µL tomados de la placa de cultivo de macrófagos expuestos a nanopartículas de Ag	45
Figura 6. Concentraciones de plata de las muestras de órganos de ratas Wistar (bazo, cerebro, hígado, pulmón y riñón) después de 1, 4 y 7 días de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.	46
Figura 6.1 Corte de la gráfica 6, en la que se observa que el bazo es el segundo órgano con la mayor cantidad de plata	47
Figura 7. Concentraciones de plata en las muestras de órganos de ratas Wistar (bazo, cerebro, hígado, pulmón y riñón) después de 1 día de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p	48
Figura 8. Concentraciones de plata en las muestras de órganos correspondientes a 4 días de exposición de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.	48

Figura 9. Concentraciones de plata de las muestras de órganos de ratas Wistar (bazo, cerebro, hígado, pulmón y riñón) correspondientes al periodo de 7 días después de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p	49
	49
Figura 9.1. Corte de la gráfica 9 para una mejor apreciación de las concentraciones de plata en órganos de ratas Wistar.	
Figura 10 Órganos de ratas Wistar con mayor concentración de plata después de 1, 4 y 7 días de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p .	50
Figura 11. Concentraciones de plata en muestras de sangre de ratas Wistar obtenidas después de 1, 4 y 7 días después de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.	51
Figura 12. Las nanopartículas de plata se observan como puntos luminosos en muestras de hígado (a), corazón (b) y riñón (c) de ratas Wistar expuestas a 50 mg/kg mediante la técnica EEDX.	53
Figura 13. Micrografía de tejido cerebral de ratas Wistar expuestas a 50 mg/kg de peso administradas vía i.p., en donde se observan membranas con aspecto luminoso	54
Figura 14. Micrografía de tejido cerebral de ratas Wistar expuestas NPs de Ag.	55
Figura 15. Concentraciones de plata en muestras de heces obtenidas después de 1, 4, 7 y 21 días de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.	56

TABLAS

	Página
Tabla 1. Preparación de la curva de calibración para la determinación de plata	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a la Nanotecnología

El interés por la nanotecnología y el uso de nanomateriales surgió con mayor fuerza en las últimas décadas, estos últimos ya existían desde hace varios siglos. Sin embargo la primera referencia de nanotecnología fue dada en una conferencia impartida en 1959 por uno de los grandes físicos del siglo pasado, el teórico y divulgador Richard Feynman, quien auguró una gran cantidad de nuevos descubrimientos en el caso de poder fabricar materiales de dimensiones atómicas o moleculares. Después de esperar varios años para el avance en las técnicas experimentales, en los años 80 se desarrolló la Microscopía Túnel de Barrido (STM) o de Fuerza Atómica (AFM), lo que hizo posible primero observar los materiales a escala atómica y después manipular átomos individuales.

1.1.1 Nanociencia y Nanotecnología

La **nanociencia** estudia los fenómenos y la manipulación de materiales de magnitudes atómicas y moleculares cuyas propiedades son significativamente diferentes a sus escalas mayores.¹ La nanociencia se ha convertido en un campo científico con entidad propia de la cual se desprende la nanotecnología.

La **nanotecnología** es la aplicación que se encarga del diseño, caracterización y producción de nanoaparatos, nanoherramientas y nanomateriales. El significado del prefijo “nano” es una dimensión que equivale a 10^{-9} , y si se fija como unidad el metro entonces un nanómetro corresponde a la mil millonésima parte del metro.²

1.1.2 Nanomateriales

Los nanomateriales se definen así porque uno o más de sus componentes se encuentran en un rango de 1 a 100 nm e incluyen nanotubos, nanofibras y **nanopartículas**. Las nanopartículas son consideradas como partículas individuales con un diámetro menor a 100 nm, lo que puede originar tanto cambios en las propiedades físicas (tamaño del área de superficie, carga de superficie, forma, tamaño, paso a través de barreras que se consideraban impermeables) y químicas (solubilidad, reactividad).¹

1.1.3 Aplicaciones de la Nanotecnología

La nanotecnología considerada por muchos como el peldaño siguiente en la ciencia, integra la ingeniería con la biología y la física con la química. Esto deriva en una tendencia progresiva a la miniaturización de la tecnología y combinación con otras tecnologías.¹ La nanotecnología integra disciplinas y ciencias como la Biología, la Biotecnología, la Química, la Física, entre otras, lo que ha incrementado la cantidad de proyectos, descubrimientos, avances científicos y tecnológicos². Las aplicaciones de la nanotecnología van en aumento en distintos campos como la ingeniería química, mecánica, electrónica, médica, etc.

1.2 Nanomedicina

En el área de la salud la nanotecnología ha adquirido particular importancia pues debido a las propiedades que su tamaño le confiere a los nanomateriales producidos por ésta, actualmente es empleada como una herramienta para explorar sitios desconocidos en diferentes campos como en la medicina oncológica y cardiovascular por mencionar algunos.

El Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos de América ha introducido el término de **Nanomedicina**, para el uso de la nanotecnología en humanos.³ La Nanomedicina es definida como la vigilancia, reparación, construcción y control de los sistemas biológicos a nivel molecular usando nanomateriales, nanoaparatos y nanoestructuras, lo cual permite la posibilidad de curar enfermedades desde dentro del cuerpo y a un nivel celular o molecular.² Para lograr esta meta la nanotecnología se concentra en desarrollar y combinar los nuevos nanomateriales mediante el ensamblaje de átomos o moléculas para obtenerlos a una escala celular o incluso a un tamaño afín de sus organelos con el objetivo de tener una medicina personalizada.³

1.2.1 Aplicaciones de la nanomedicina

Las aplicaciones de la nanomedicina han aumentado mediante el desarrollo de tecnologías como: nanoarreglos, arreglos de proteínas, nanoporos, dispositivos para inmunoensayos, nanosensores, entre otros. Dentro de las principales aplicaciones de la nanomedicina se encuentran los marcadores biológicos fluorescentes, sistemas de liberación de fármacos, biodetección de patógenos, sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN), ingeniería de tejidos, destrucción

de tumores por calentamiento (hipertermia), separación y purificación de células y moléculas,⁴ la monitorización (imágenes), reparación de tejidos, mejora de los sistemas biológicos, diagnóstico, etc. La nanotecnología de aplicación clínica tienen el potencial de ser usadas también en laboratorios para el diagnóstico de infecciones, siendo ésta un avance significativo en el diagnóstico molecular.³

Todas las aplicaciones constituyen una nueva era científica y asistencial en las que trabajan en la actualidad una gran cantidad de laboratorios y centros de nanotecnología en todo el mundo. La nanomedicina es por mucho, una nueva posibilidad para proporcionar una terapia a nivel molecular con ayuda de distintos nanomateriales.

La nanotecnología utiliza diversos nanomateriales como los liposomas, fullerenos, *quantum dots*, nanotubos, nanoarmazones, nanosomas y nanopartículas con tamaño de radio controlado.⁵

1.3 Nanopartículas

Las nanopartículas han existido por siglos, algunos ejemplos son las partículas de humo. En algunas civilizaciones antiguas ya se utilizaban por sus propiedades ópticas y medicinales. Las nanopartículas metálicas en particular se pueden citar en la cultura egipcia, la cual empleaba las nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener la salud. La civilización china, además de emplearlas con fines curativos las utilizaba como colorantes inorgánicos en porcelana. Un caso de gran interés es el vaso de Lycurgus, creado por los romanos en el siglo IV d.C. tiene una característica

interesante, su color es verde si la luz es reflejada y cambia a rojo si la luz es transmitida a través de él. El análisis de este vaso muestra que está compuesto de una matriz de vidrio que contiene una pequeña cantidad de nanopartículas de oro y plata las cuales son responsables de éste fenómeno. Aún cuando se tenían antecedentes del uso de nanopartículas, no fue sino hasta 1857 cuando se realiza un estudio sistemático de la síntesis y propiedades de coloides de oro. Y desde esa época hasta la fecha se han logrado grandes avances en el conocimiento de las nanopartículas y se han desarrollado métodos para su síntesis con la finalidad de poder diseñar la forma, tamaño, cubierta, composición, entre otras propiedades y con esto controlar su comportamiento. La modificación del tamaño de los materiales en nanopartículas les confiere un cambio de propiedades según se reduce el tamaño, es decir algunos incrementan su actividad eléctrica y calórica, mejorándola; otros incrementan su resistencia y también pueden presentar diferentes propiedades magnéticas e incluso pueden cambiar de color y reflejo de la luz cuando se modifica su tamaño. Además presentan una mayor superficie en relación a su masa, propiedad que les confiere una mayor capacidad de interacción con otros materiales y una mayor reactividad.⁶

1.3.1 Producción de nanopartículas

Las nanopartículas pueden ser divididas principalmente en 2 grupos: nanopartículas lábiles las cuales se desintegran en sus componentes moleculares (liposomas, nanosomas, micelas, etc.) y las nanopartículas insolubles (dióxido de titanio, dióxido de sílica, óxidos metálicos, etc).⁷

Los métodos mediante los cuales se obtienen las nanopartículas se pueden clasificar en 3 categorías: condensación de vapor, síntesis química y procesos en estado sólido como la molienda. Partículas con recubrimiento de sustancias hidrofílicas o lipofílicas de acuerdo a la aplicación deseada.

Condensación de vapor: este método es utilizado para nanopartículas metálicas y óxidos de metal-cerámica, esto involucra la evaporación de un metal sólido seguido de una rápida condensación para formar grupos de medidas nanométricas que se sedimentan (ordenan) en forma de polvo. Distintos métodos para la vaporización de los metales pueden ser usadas y con la variación de las condiciones del medio se puede variar la naturaleza y tamaño de las nanopartículas. En este método se utilizan gases nobles en la fabricación de las nanopartículas metálicas para evitar la oxidación. La principal ventaja de este método es la baja contaminación. El tamaño final de las nanopartículas es controlado por la variación de parámetros como la temperatura, entorno gaseoso y velocidad de evaporación.

Síntesis química. Es una de las técnicas ampliamente utilizadas que consiste en el crecimiento de nanopartículas en un medio líquido compuesto de varios reactivos. Este método es usado para crear *quantum dots* y es mejor que las técnicas de condensación de vapor para el control de la forma de nanopartículas. La técnica es por lo general de bajo costo y de un alto volumen, sin embargo la contaminación de los precursores químicos pueden ser un problema. Esto puede interferir con uno de los usos comunes de nanopartículas, la sinterización y la creación de cubiertas de superficie.

Procesos en estado sólido: La pulverización o molienda puede ser usada para crear nanopartículas. El material molido, tiempo y condiciones de

molienda pueden afectar las propiedades de las nanopartículas. Este método es usado en la fabricación de nanopartículas que no pueden ser fabricadas con los métodos antes mencionados. La contaminación del material de molienda puede ser emitido.⁷

1.3.2 Nanopartículas de utilidad clínica

En la última década las nanopartículas han sido la clase de nanomateriales que por sus diversas propiedades han sido atractivas para el desarrollo comercial, por lo que se ha incrementado la fabricación en diversas industrias como la Mecánica, Biomédica, Farmacéutica, Cosmética, Alimenticia, Agrícola, Química, de la Construcción, Automotriz, Textil, del Caucho, la Aeronáutica, la Informática, la Computación, etc. Actualmente se están realizando una considerable cantidad de trabajos con nanopartículas de diferentes materiales, que por su utilidad terapéutica han alcanzado ensayos clínicos o incluso, en algún caso, han sido aprobadas para su utilización en humanos.^{10, 11} Todo ello ha sido posible por las propiedades que ofrecen estos sistemas para mejorar la seguridad y eficacia de numerosos fármacos. Entre las ventajas que aportan el uso de nanopartículas se pueden citar la capacidad para atravesar las barreras biológicas como la piel, las mucosas gastrointestinal, respiratoria y la barrera hematoencefálica, la capacidad para alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción, para alcanzar compartimentos intracelulares y la capacidad para controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción.⁸

Algunos ejemplos de la aplicación específica de las nanopartículas son el diagnóstico y el tratamiento de trastornos cardiovasculares en donde se sugiere

el uso de nanopartículas para obtener imágenes moleculares y como parte de los stents liberadores de fármacos.⁹ De igual forma juegan un papel importante en los avances en oncología ya que se ha perfeccionado el diagnóstico molecular mediante su uso como medio de contraste para estudios de resonancia magnética, lo que ha facilitado la detección temprana de tumores y a la vez el desarrollo y mejoramiento de fármacos antineoplásicos.¹⁰

Las nanopartículas se producen a partir de diversos materiales orgánicos e inorgánicos (cerámicos, metales, polímeros) y en el área de la salud se ha dado particular importancia a la obtención de nanopartículas a partir de metales. En el 2007 Priyabrata Mukherjee y *cols*, reportaron que la unión de anticuerpos utilizados para el tratamiento de la leucemia linfocítica a nanopartículas de oro incrementaba la destrucción de las células malignas en comparación con los pacientes a los que solo se les administraba el anticuerpo además, se observó un aumento en la penetración a las células e incluso a algunos organelos.¹¹ En el 2010 Brown S. D. y *cols*. prepararon un medicamento antineoplásico, el oxilaplatino unido a la nanopartícula de oro, con lo cual se logró mejorar la liberación del fármaco y además se observó una mayor penetración en el tejido pulmonar.¹⁰ De igual forma Cherukuri P. y *cols*. en este mismo año usaron nanopartículas de oro unidas al anticuerpo monoclonal cetuximab y observaron una mayor penetración del complejo a las células, además de que al realizar la terapia con radiofrecuencia se observó un aumento en la efectividad en la destrucción de tumores por calentamiento (hipertermia) y una disminución en la citotoxicidad.¹²

1.3.3 Efecto de las nanopartículas sobre la salud

Desde hace mucho se sabe que la exposición laboral a partículas en el lugar de trabajo puede tener consecuencias sobre la salud de las personas expuestas. Entre ellas se incluyen las partículas de humo y nanopartículas de materiales utilizados en diferentes industrias. Su variedad supone también la variabilidad en la toxicidad o posibles efectos sobre la salud de estos materiales. Algunos de los efectos potenciales de los nanomateriales son:

Translocación: debido a su pequeño tamaño las nanopartículas pueden alcanzar zonas del organismo que no son accesibles a partículas de mayor tamaño. Esto significa un incremento de la posibilidad de que las partículas atraviesen las barreras celulares, incluyendo que puedan pasar al sistema circulatorio distribuyéndose así a otros órganos o incluso alcanzar el cerebro tras la inhalación desde las vías respiratorias superiores.

Incremento de la toxicidad: el efecto tóxico de partículas insolubles parece estar relacionada con la superficie de las partículas, en lugar de su masa. Las nanopartículas presentan un tamaño de área superficial mayor que partículas más grandes de igual masa, lo que se traduciría en un incremento de la toxicidad de estos nanomateriales.

Modificación de la solubilidad: Ciertos materiales considerados insolubles o poco solubles en mayor tamaño (fuera de la escala nano) ven incrementada su solubilidad cuando se producen en escala nano. Este efecto produciría una mayor biodisponibilidad de estos nanomateriales, que no existiría, o en todo caso en menor grado, en sus homólogos en la escala «macro».

Nuevas propiedades toxicológicas: Si las nanopartículas presentan propiedades físico-químicas nuevas a diferencia de las mismas partículas de

mayor tamaño, existe la posibilidad de que esto vaya acompañado de nuevos efectos con potencial tóxico.

Aquellas que tienen una estructura fibrosa podrían tener una mayor persistencia y acumulación en los pulmones y como consecuencia provocar inflamación y otras alteraciones, incluidos posibles efectos cancerígenos.⁵¹

A pesar del uso de nanopartículas en el área de la salud y sus beneficios, existen reportes que indican que algunas nanopartículas que no son usadas en esta área, pero que están presentes en procesos industriales y que son manipuladas por humanos, han producido efectos tóxicos los cuales han sido demostrados mediante ensayos "*in vitro*" (líneas celulares) o "*in vivo*" (animales). Los efectos nocivos varían dependiendo del modelo biológico, las rutas de exposición, el diámetro de la nanopartícula y consisten en muerte celular, estrés oxidativo, reacciones inflamatorias, desarrollo de tumores, etc.¹

Existen numerosos estudios hechos con diversos tipos de nanopartículas en los cuales se ha demostrado su toxicidad, esto no resulta sorprendente si dichas nanopartículas han sido fabricadas a partir de materiales con naturaleza tóxica, sin embargo otros estudios han demostrado que las nanopartículas son tóxicas por sí mismas mostrando toxicidad aguda o bien aumentando la toxicidad de algunos materiales, al respecto en un estudio realizado en ratones se observó que nanopartículas de carbono los hicieron mas susceptibles a una endotoxina bacteriana.¹⁴

En el 2007 Hussain y cols. realizaron un ensayo con células neuronales PC-12 la cuales fueron expuestas a nanopartículas de óxido de manganeso y los resultados mostraron que las nanopartículas penetraron la célula, disminuyeron la actividad mitocondrial y además provocaron depleción de la dopamina.¹⁵ En

ese mismo año Murdock C. y cols. expusieron la misma línea celular pero a nanopartículas de cobre y se observó que también éstas produjeron depleción de la dopamina ¹⁶. Bradich- Stolle y cols. expusieron queratinocitos de ratón a nanopartículas de dióxido de titanio, reportaron una disminución de la proliferación celular y además un aumento en la producción de estrés oxidativo.
17

Weaver y cols. reportaron que la administración vía subcutánea de nanopartículas de dióxido de titanio a ratones produjeron una respuesta inflamatoria aguda en el sitio de la inyección y un aumento en la circulación periférica de granulocitos como consecuencia de la respuesta inmune.¹¹ En estudios *in vitro* realizados con nanopartículas de oro se ha observado la captura de las nanopartículas dentro de los lisosomas.¹⁸ Por otro lado en estudios realizados en ratones expuestos a nanopartículas de oro vía intraperitoneal y vía intravenosa, se observó la presencia de las nanopartículas en los lisosomas de macrófagos hepáticos.¹⁹

1.4 Nanopartículas de la plata

Uno de los metales nobles con el que se están sintetizando nanopartículas es la plata, por sus propiedades fisicoquímicas y debido a que la plata ha sido utilizada por sus propiedades antimicrobianas hace cientos de años, pues ha demostrado ser tóxica en contra de un amplio rango de microorganismos como los hongos, bacterias e incluso virus. Su aplicación como propuesta médica esta documentada desde el año 750 d.C. En 1901 se publica el primer artículo que describe a la plata como un agente antibacteriano.⁴ Posteriormente varias formas químicas de plata (sulfadiazina argéntica, nitrato de plata, acetato de

plata y otras sales) fueron utilizadas en el tratamiento de enfermedades mentales, epilepsia, adicción a la nicotina, gastroenteritis y enfermedades venéreas como la gonorrea y sífilis.²⁰

1.4.1 Evaluación de la actividad biológica de las nanopartículas de plata

Actualmente las investigaciones relacionadas con las nanopartículas de plata (NPs de Ag) tienen entre sus objetivos la búsqueda de agentes antimicrobianos y en diversos estudios se ha planteado su uso en formulaciones antimicrobianas, lo que constituye un nuevo y promisorio campo de estudio.⁴ En el 2005, Morones y cols., demostraron el efecto bactericida de las NPs de Ag (1 y 10 nm) sobre *E.coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae* y *S. typhus*.⁴ En ese mismo año, en Elechiguerra y cols. evaluaron el efecto de las NPs de Ag contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y demostraron su interacción con el virus posiblemente por interacción con los residuos de sulfuro de las glicoproteínas presentes en la envoltura viral, lo que impide su unión con la célula huésped.²¹ En el año 2010 Lara y cols. investigaron el posible mecanismo de acción de las NPs de Ag en contra del VIH-1, y sus resultados fueron similares a los obtenidos por Elechiguerra y además concluyeron que debido a que las nanopartículas actúan en contra del virus en una etapa temprana del ciclo de replicación podrían evitar el desarrollo de resistencia del virus.²²

Con base a este mecanismo de acción, Yacamán y cols. plantearon la posibilidad del uso de NPs de Ag en un preparado de uso vaginal con el fin de evitar el contagio con este virus y/o combatir sus efectos. También se ha

sugerido que las NPs de Ag podrían ser usadas de para combatir el virus de papiloma humano.²³

El efecto bactericida de las NPs de Ag ha sido demostrado en diversos microorganismos como *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Vibrio colerae* observando una inhibición en la reproducción bacteriana penetración de las nanopartículas al núcleo y donde destruyen al DNA.²¹

En el 2007, Siddhartha y cols. reportaron la actividad antibacteriana de NPs de Ag, en relación dosis-dependiente y que la actividad antibacteriana fue mayor en contra de bacterias gram negativas que en gram positivas.²⁴

En el 2009 Asha Rani y cols. expusieron fibroblastos de pulmón humano y células de glioblastoma de origen humano a NPs de Ag, y observaron endocitosis de las nanopartículas y su presencia dentro de los núcleos y citoplasma de ambos tipos celulares en los cuales se observó inestabilidad cromosómica y mitótica, sin embargo las células de pulmón se recuperaron mientras que las células de glioblastoma cesaron su proliferación. Por lo anterior sugirieron que las células cancerosas podían ser susceptibles al daño por el estrés producido por las NPs de Ag.²⁵

En el 2009 Ruden S. y cols. expusieron cultivos de diversos microorganismos a combinaciones de antimicrobianos con NPs de Ag y observaron efectos sinérgicos en la actividad antimicrobiana, en algunos casos la combinación mejoró la actividad intrínseca del antimicrobiano y en otros mejoró la permeabilidad hacia la membrana del microorganismo.²⁶

En un estudio realizado en el 2009 por Sheikpranbabu y cols. en células epiteliales de retina porcina expuestas a NPs de Ag, se demostró la inhibición

del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la interleucina 1-beta que inducen la permeabilidad por la activación de la vía de cinasas. Por lo anterior sugieren su potencial terapéutico para enfermedades oculares como la retinopatía diabética.²⁷ Colleen M y cols. evaluaron el efecto de las nanopartículas de plata en contra de *Pseudomona aeruginosa* y la toxicidad en células de epiteliales de córnea, los resultados mostraron que las nanopartículas tuvieron actividad antimicrobiana y que pueden ser una estrategia para evitar la colonización de bacterias que puede ocurrir con el uso prolongado de lentes de contacto.²⁸

1.4.2 Estudios de toxicidad de las nanopartículas de plata

Aunque las NPs de Ag parecen tener una aplicación promisoriosa como antimicrobiano debido a las propiedades que su composición y magnitud le confieren existe la posibilidad de que su acción sobre las células del organismo humano provoquen efectos adversos, por lo que la evaluación de su posible toxicidad es necesaria para establecer su seguridad en caso del posible uso en el humano. Los atributos fisicoquímicos únicos de las nanopartículas, hacen que éstas puedan producir condiciones químicas que inducen a un ambiente prooxidante causando un desequilibrio en el sistema energético celular dependiendo del potencial redox, provocando efectos biológicos adversos, que van desde la activación de rutas inflamatorias hasta la muerte celular. En estudios realizados con NPs de Ag en diversas líneas celulares, como HepG2 y macrófagos entre otras, se demostró que la toxicidad fue dependiente del tamaño de la nanopartícula y que en gran parte fue mediada por la producción de estrés oxidativo.^{29,30} Se ha reportado que a

exposición de monocitos de origen humano a NPs de Ag indujo la producción de especies reactivas de oxígeno, que finalmente llevó a muerte celular por apoptosis .³¹

En estudios *in vitro* con células de hepatoma expuestas a NPs de Ag y de otros metales, se observó que la actividad mitocondrial disminuyó significativamente en células expuestas a NPs de Ag y hubo un incremento en la liberación de LDH, lo cual no ocurrió en la células expuestas a nanopartículas de otros metales. Además se observó que las NPs de Ag también disminuyeron los niveles de glutatión (GSH) e incrementaron las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual sugiere que la toxicidad de las NPs de Ag en hepatocitos puede estar mediada por la producción de estrés oxidativo.³² La producción de citotoxicidad y formación de micronúcleos en células de hepatoma humano expuestas a NPs de Ag, también ha sido reportada.³³ Por otro lado se ha propuesto que las NPs de Ag pudieran interactuar con el sistema inmune y producir un efecto inmunomodulador estimulándolo o inhibiéndolo .³⁴

En un estudio realizado en la línea celular RAW264.7 , se observó toxicidad de NPs de Ag mediada por apoptosis además de la disminución de GSH y el incremento de la secreción de óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).³⁵

Las nanopartículas de diferentes tamaños, pueden llegar a cruzar la barrera hematoencefálica o bien producir daño sobre ésta, modificando su permeabilidad. Existen reportes de la evaluación biológica de NPs de Ag, en los que se mostró la liberación de iones de plata (Ag⁺) que podrían traslocarse a circulación sanguínea y acumularse en algunos órganos como el hígado y el riñón, lo que podría producir hepatotoxicidad o toxicidad renal. El tamaño de las

NPs de plata es cercano al de los iones de Ag^+ y algunos reportes mencionan que podría haber una traslocación en el organismo y ocasionar la misma toxicidad que los iones.³⁶

En el 2010 Sharma y cols. realizaron un ensayo “*in vivo*” en el cual utilizaron ratas a las cuales se les administró nanopartículas de diferentes metales, entre ellos la plata, por diferentes vías: intravenosa, intraperitoneal e intracerebral. Se concluyó que la barrera hematoencefálica sufrió daño ya que se presentó edema cerebral, este efecto fue mayor en los animales expuestos a nanopartículas de plata en comparación con los animales que recibieron nanopartículas producidas a partir de otros metales.³⁷

1.5 Etapas para el desarrollo de medicamentos

Existe una gran necesidad de la industria farmacéutica, médicos y pacientes de mejorar los tratamientos farmacológicos como la innovación en las formulaciones farmacéuticas y la modificación de moléculas o compuestos para reducir la toxicidad, el costo, etc. Esta necesidad ha logrado el desarrollo de mejores formulaciones de inyectables, orales, implantes de dispositivos de fármacos, formulaciones de liberación transdérmica, entre otras. Sin embargo estas preparaciones muestran desventajas en su distribución en diferentes tejidos, particularmente en el tejido cerebral pues la barrera hematoencefálica formada por células gliales resulta impenetrable para un gran número de medicamentos convencionales.

La nanotecnología surge como una posible solución al problema de la distribución de fármacos debido a características relacionadas con el tamaño, los nanomateriales pueden tener un uso potencial en el desarrollo de

productos y equipo médico con la ventaja de traspasar barreras no penetrables.²⁴ La diferencia entre la nanomedicina y la medicina convencional es que la nanomedicina está basada en moléculas químicas pequeñas. Así, además de cubrir la actividad terapéutica también se combina la habilidad de distribuir los medicamentos en regiones o tejidos específicos del cuerpo, incluso en células específicas logrando la respuesta terapéutica.³

El desarrollo de un medicamento es un proceso que toma muchos años y es muy costoso, las evaluaciones se realizan en 10 a 15 años desde el descubrimiento de un compuesto con actividad terapéutica y solo 1 compuesto de alrededor de 10,000 evaluados llegan al mercado. Dos etapas importantes por las que un compuesto debe ser analizado antes de ser comercializado son la Preclínica y la Clínica la cual se divide en cuatro fases.

La fase preclínica es de investigación y desarrollo, en la que se comprueba la actividad terapéutica del compuesto y se evalúa la seguridad mediante ensayos realizados en modelos *in vitro* (cultivo celular) e *in vivo* (animales). En esta fase se evalúa la farmacocinética del compuesto en los organismos vivos y se debe demostrar que la sustancia no sea tóxica. Los resultados de esta etapa dan la pauta para el diseño de la forma farmacéutica y la vía de administración del compuesto.

En la etapa clínica las pruebas se hacen con voluntarios sanos y en pacientes. Suele ser la parte más larga (de 2 a 10 años). esta etapa se compone de 4 fases: Fase I. Las pruebas se hacen con grupos pequeños de voluntarios sanos, Fase II. Las pruebas se hacen en un número mayor de pacientes diagnosticados pero sin tratamiento. En este caso lo que se quiere comprobar es la eficacia, la dosis adecuada y ampliar datos de la seguridad. Fase III. Se

hacen pruebas aleatorias y controladas con un placebo (sustancia sin efecto) o con una sustancia frecuentemente usada para tratar la enfermedad. Si no existen problemas y se demuestra que el medicamento cumple los requisitos, se registra para que haga su entrada en el mercado. Una vez que el nuevo medicamento ha pasado todos los controles previos y recibe la autorización para ser comercializado, empieza una nueva etapa de control. Fase IV. de vigilancia postcomercialización que se ocupa de las actividades relacionadas con la detección, valoración, conocimiento y prevención de los efectos adversos o cualquier otro problema relacionado con el fármaco (interacciones con otros fármacos o alimentos y reacciones adversas)

Hace algunos años algunas industrias farmacéuticas han sido aprobadas por la FDA (Foods and Drug Administration) para el desarrollo de medicamentos utilizando la nanotecnología, obviamente el costo de esta nueva tecnología ha sido extremadamente elevada. Hoy en día el gasto por año es de \$9 billones de dólares aproximadamente en todas las investigaciones a nivel mundial.. La nanotecnología esta experimentando una expansión en distintas áreas, incluso en los países en vías de desarrollo se ha decidido que esta nueva tecnología podría representar una inversión en el futuro económico y social. ³

El incremento de la producción de nanopartículas para diversos usos, hace necesario evaluar los riesgos potenciales asociados en los diferentes campos y desarrollar estrategias de prevención y para el manejo adecuado de éstas, particularmente en el caso de las nanopartículas con potencial farmacológico.

Considerando el potencial uso farmacológico de las NPs de Ag, el hecho de que no se conoce su distribución en los diferentes órganos y la escasez de estudios relacionados con su toxicidad en este trabajo se evaluó su cinética de distribución en un modelo *in vivo* y su toxicidad *in vivo* e *in vitro*.

Para la evaluación de la cinética de distribución y toxicidad *in vivo* se utilizaron ratas Wistar y para la evaluación de la toxicidad *in vitro* se utilizaron líneas celulares y se determinaron los siguientes parámetros: citotoxicidad y producción de estrés oxidativo en células de hígado de Chang y producción de óxido nítrico por macrófagos.

1.6 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la cinética de distribución y la toxicidad de las nanopartículas de plata.

1.6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de plata.
2. Evaluar la producción de estrés celular oxidativo por las nanopartículas de plata, *In vitro*.
3. Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata sobre la liberación de óxido nítrico por los macrófagos, *In vitro*.
4. Evaluar la cinética de distribución de las nanopartículas de plata en ratas Wistar.
5. Evaluar la eliminación de nanopartículas de plata en orina.
6. Evaluar la toxicidad de nanopartículas de plata *In vivo*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Material biológico

2.1.1.1 Líneas celulares

Para los estudios *In vitro* se utilizaron 3 líneas celulares: células de hígado de Chang (CCL13), macrófagos (J774) y fibroblastos (L929) obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, EUA.

2.1.1.2 Animales

Para los estudios *In vivo* se utilizaron ratas Wistar hembras, entre 6 y 7 semanas de edad, nulíparas, con un peso promedio de 130 ± 10 g, las cuales se mantuvieron en jaulas de acrílico con tapa de rejilla metálica y/o jaulas metabólicas, bajo condiciones estándar de laboratorio: ciclo luz-oscuridad de 12 horas, temperatura de 22 °C y a las que se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Las ratas fueron obtenidas del Bioterio del Departamento de Farmacología y Toxicología, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y el estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento antes mencionado.

2.1.2 Material químico

2.1.2.1 Nanopartículas de plata

Las NPs de Ag de 2 nm de diámetro fueron proporcionadas por el Dr. Miguel José Yacamán del Departamento de Física de la Universidad de Texas en Austin, EUA.

Las NPs de Ag fueron sintetizadas en atmósfera de aire reducida. Se utilizó nitrato de plata (AgNO₃; Aldrich) 0.6857 M y se mezcló con una solución acuosa de albúmina sérica bovina(BSA), como agente reductor se usó una solución de borohidruro de sodio (NaBH₄; 99%; Aldrich) preparada al momento la cual se adicionó a la mezcla anterior, se agitó fuertemente y se observó que la suspensión tomó una coloración oscura.

2.1.3 Material, reactivos y equipo

2.1.3.1 Material y equipo en general

Autoclave Market Forge Sterilmatic

Balanza analítica Mettler-Toledo AB204

Balanza Granataria Mette- Toledo PB3001

Cámara Neubauer

Campana de Flujo laminar (Labconco)

Desionizador de agua Millipore

Equipo de disección

Espectrofluorómetro

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer.

Espectrofotómetro Bio Assay Reader HTS7000 (Perkin Elmer)

Frascos de cultivo T25 Costar 3055

Horno de Microondas MDS-2000.

Incubadora modelo 5410 (Napco)

Invertoscopio Axiovert 100 (Carl Zeiss)

Lámpara de Ag de cátodo hueco.

Matraces volumétricos de 10, 50, 100 mL

Membranas de filtración de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore)

Microscopio electrónico de transmisión

Microtomo

Pipetas automáticas y puntillas 10-100 μL , 20-200 μL y de 100-1000 μL

Pipetas lineales de 5, 10 y 25 mL

Pipetas pasteur

Placa de calentamiento y agitador magnético (Sigma)

Placas para cultivo celular de 96 y 24 celdillas (Costar)

Potenciómetro Φ 320 pH Meter (Beckman)

Reservorio

Termómetro

Tubos vacutainer 13X100 (Becton Dickinson)

Tubos de ensayo 13X100 (Pyrex)

Tubos de ensayo 20X200 con tapa de rosca (Pyrex)

Tubos de grafito pirolítico.

Vasos de precipitado de diferentes capacidades (Pyrex)

Vasos para microondas

2.1.3.2 Reactivos

2.1.3.2.1 Reactivos para el cultivo de líneas celulares, prueba de MTT, prueba de DCFDA y producción de NO.

Ácido acético

Ácido clorhídrico

Ácido tiobarbitúrico

Ácido tricloroacético

Agua bidestilada

Alcohol etílico

Alcohol isopropílico

Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT)(Sigma)

Cloruro de calcio

Cloruro de sodio (Sigma)

D- medio esencial mínimo (Sigma)

Diacetato de 2',7',-diclorofluoresceína (DCFDA)

Formaldehído

Fosfato de sodio monobásico (Sigma)

Fostato de potasio dibásico (Sigma)

Lipopolisacárido

Malondialdehído

Medio esencial mínimo (Sigma)

Medio RPMI 1640 (Sigma)

Nitrato de sodio

Reactivo de Griess

Rojo Neutro

Suero de caballo

Suero fetal bovino (Sigma)

Tripsina (Sigma)

Xantina oxidasa grado IV (Sigma)

2.1.3.2.2 Reactivos para la determinación de Ag mediante EAA

Ácido Nítrico

Agua bidestilada

Argón

Estándar de plata (Ag, 1000 ppm)

Estándar de magnesio (Mg, 1000 ppm)

Estándar de paladio (Pd, 1000 ppm)

Pentobarbital sódico inyectable (Sigma)

2.1.3.2.3 Reactivos para la evaluación mediante EDS-EX.

Acetato de uranilo

Acetona

Ácido clorhídrico

Ácido pícrico

Agua ultrapura

Azul de toluidina

Borato de sodio

Cacodilato de sodio

Citrato de plomo

Glutaraldehído

Hidróxido de sodio

Nitrato de uranilo

Parafolmaldehído

Resinas epóxicas

Tetraóxido de osmio

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Evaluación de la actividad biológica de las nanopartículas de plata *In vitro*

2.2.1.1 Procedimiento para el cultivo de líneas celulares

Para la evaluación de citotoxicidad y producción de estrés oxidativo se utilizaron células de hígado de Chang y fibroblastos los cuales se sembraron en frascos de cultivo usando como nutriente medio esencial mínimo (MEM), para sembrar las células de hígado de Chang se suplementó al 10% con suero fetal bovino, en el caso de los fibroblastos se utilizó suero de caballo. Los frascos se incubaron a 37 °C en un ambiente de 5% CO₂ y 95% aire, hasta la formación de la monocapa celular (2-3 días).

La evaluación de la producción de óxido nítrico se realizó en macrófagos y para la determinación de manera indirecta del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se usaron fibroblastos. Las condiciones para su cultivo fueron las mismas que ya se han mencionado.

2.2.1.2 Evaluación de citotoxicidad

2.2.1.2.1 Cultivo de células en placas de 96 celdillas de células de hígado de Chang y fibroblastos

La monocapa celular se expuso a 1 mL de tripsina al 0.25% durante 5-10 minutos para desprender las células del frasco de cultivo y separarlas entre sí. Al término de este tiempo se adicionaron 2 mL de medio para bloquear la acción de la tripsina. De esta suspensión celular se tomaron 0.1 mL y se depositaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) para determinar la concentración celular. La densidad celular se ajustó a 2×10^4 células por 0.1 mL con el medio y suero correspondiente. Posteriormente a

cada pozo de la placa se les adicionó 0.1 mL de la suspensión celular. Las placas se sellaron e incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire hasta la formación de monocapa celular (1-2 días).

2.2.1.2.2 Exposición de las células a nanopartículas de plata

Se retiró el medio de cultivo a las placas de 96 celdillas y se les agregó 0.1 mL de MEM. Se evaluaron diferentes concentraciones de NPs de Ag (rango de 0.002 - 0.425 g/ml). Las placas se incubaron a 37°C, en un ambiente de 5% de CO₂ y 95% de aire durante 24 y 48 h.

2.2.1.2.3 Evaluación microscópica

Después de la exposición de las células a las NPs de Ag, las células de las placas se revisaron microscópicamente con diferentes factores de amplificación (100X, 40X y 20). Con el fin de observar la adhesión celular y relacionarla con el resultado de la absorbancia obtenida por la lectura espectrofométrica de las placas.

2.2.1.2.4 Prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT)

La prueba de MTT se fundamenta en la capacidad de las deshidrogenasas succínicas mitocondriales de las células vivas para reducir el metiltiazoltetrazolio a formazán, que es detectado espectrofotométricamente de acuerdo método de Mosman.³⁸

Después de la exposición de las células a las NPs de Ag, se retiró el medio de cultivo a la placa de 96 celdillas, se añadió 0.1 mL de MTT (0.5 mg /mL) en cada celdilla. Y se incubó durante 3 h. Posteriormente se retiró el MTT y se adicionaron 0.2 mL de alcohol isopropílico + ácido clorhídrico al 10% y la placa fue incubada en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min.

Finalmente se midió la absorbancia a λ de 570 nm. La lectura de las celdillas controles fueron consideradas como 100% de viabilidad.

2.2.1.2.5 Cálculo del % de viabilidad celular

El promedio de la absorbancia de las celdillas control se consideró como 100% de viabilidad celular y se utilizó para calcular la viabilidad de las células expuestas.

2.2.1.3 Evaluación de la producción de estrés celular oxidativo por las nanopartículas de plata mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

Para la evaluación de la producción de estrés oxidativo se utilizó al diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) como indicador de especies reactivas de oxígeno, de acuerdo con el método de Bass y cols.³⁹

El DCFDA captado por las células, es metabolizado por esterasas intracelulares a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) que en presencia de radicales libres se oxida a diclorofluoresceína (DCF) que es un compuesto fluorescente.⁴⁰

Las placas de 96 celdillas que contenían a las células de Chang fueron expuestas a diferentes concentraciones de NPs de Ag (rango de 0.012 a 0.050 mg/mL). Posteriormente, se les añadió 0.2 mL de una solución que contenía DCFDA (0.05 mg/mL) y xantina oxidasa (0.06 U/mL), las placas fueron selladas e incubadas a 37 °C. se realizaron lecturas, a los 30 min y después cada hora durante 6 h, a una λ de 585 nm de excitación y 530 nm de emisión.

Como control positivo de estrés oxidativo se utilizaron las celdillas con MEM, DCFDA y xantina oxidasa y como control negativo se utilizaron celdillas con MEM y DCFDA.

2.2.1.3.3 Cálculos

Se calcularon los valores promedios y desviación estándar de lectura de fluorescencia emitida por las células de las celdillas correspondientes a cada concentración de NPs de Ag, medio o xantina oxidasa.

2.2.1.5 Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata sobre macrófagos *in vitro*

2.2.1.5.1 Cultivo de macrófagos y fibroblastos en placas de 96 celdillas

La monocapa formada por los macrófagos en los frascos de cultivo fue removida cuidadosamente con ayuda de un raspador, se tomaron 0.1 mL de la suspensión y se contó el número de células, se ajustó a una densidad celular de 2×10^5 cel/mL, se depositaron 0.1 mL en cada pocillo de placas de 96 celdillas y se incubaron a condiciones antes mencionadas hasta formación de monocapa celular (1-2 días).

La monocapa formada por fibroblastos contenida en los frascos para cultivo se expuso a 1 ml de tripsina 0.25% durante 5-10 minutos para desprender las células del frasco de cultivo y separarlas entre si. Al término de este tiempo se adicionaron 2 mL de MEM para bloquear la acción de la tripsina. De ésta suspensión celular se tomaron 0.1 mL y se depositaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) para determinar la concentración celular. La densidad celular se ajustó a 2×10^4 células por 0.1 mL con MEM como nutriente y suplementado al 10% con suero de caballo. Posteriormente se adicionaron 0.1 mL de la suspensión a cada celdilla de la placa, la placa fue sellada e incubada a 37 °C con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, hasta la formación de monocapa celular (1-2 días).

2.2.1.5.2 Exposición de macrófagos y fibroblastos a NPs de Ag

Una vez formada la monocapa celular se retiró el medio de las celdillas de las placas de macrófagos y fibroblastos. Se depositaron 0.1 mL de medio de cultivo (D-MEM o MEM) a cada celdilla.

Para la evaluación de la producción de NO, los macrófagos fueron activados con lipopolisacárido (0.01 mg/mL), se evaluaron diferentes concentraciones (rango de 0.002- 3.4 mg/mL) de NPs de Ag. Las celdillas usadas como control contenían medio de cultivo + LPS. Las placas se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante 24 h.

Para la determinación del TNF- α , pasadas 3 h se retiró de la incubadora una placa de macrófagos y de ésta se tomaron 0.1 y 0.05 mL del medio de cultivo y se depositaron a 2 placas de fibroblastos respectivamente. La placa con 0.05 mL se le añadieron 0.05 mL de MEM. Estas placas se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante 24 h.

2.2.1.5.3 Cuantificación de NO mediante el ensayo de Griess.

La producción de NO fue medido determinando la concentración de nitritos en el sobrenadante del cultivo celular a las 24 h mediante el ensayo de Griess. Los nitritos son un producto estable de óxido nítrico y la reacción de Griess (sulfanamida 1% y N-(1-naphtyl) dihidroclorato de ethylenediamina en lleva a la formación de un cromóforo a partir de la diazotación de la sulfanilamida por ácido nítrico seguido por una conjugación de aminas bicíclicas como la N-1-(naphtyl ethyendiamine).^{41,42}

Después del tiempo de incubación se midieron 0.1 mL del medio de cultivo de cada celdilla y se traspasaron a una placa nueva en el mismo orden de la placa original, se preparó una curva de NaNO₂ para establecer la concentración de NO de las celdillas

de estudio, se adicionó 0.1 mL del reactivo de Griess y la placa se incubó durante 30 min en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente la absorbancia fué medida a una λ de 570 nm.

Cálculos de la concentración de óxido nítrico

La concentración de NO se calculó tomando en cuenta las concentraciones utilizadas en la curva y las absorbancias obtenidas. Se obtuvieron el promedio y desviación estándar.

2.2.1.5.4 Determinación indirecta del Factor de necrosis tumoral alfa

Para determinar la presencia de citocinas se utilizó el sobrenadante de una placa de macrófagos expuestos a nanopartículas de plata, éste se depositó en placas con fibroblastos y se realizó la prueba de MTT a las 24 h.

Cálculos del % de la viabilidad celular

El promedio de las lecturas de las celdillas control se consideró como el 100% de viabilidad celular y se utilizó para calcular el % de viabilidad celular de las celdillas que contenían células expuestas a nanopartículas de plata. También se calcularon las desviaciones estándar.

Todas las evaluaciones “*in vitro*” se realizaron en tres ocasiones en días distintos.

2.2.2 Evaluación de la distribución de nanopartículas de plata en ratas Wistar

2.2.2.1 Exposición de las ratas Wistar a las nanopartículas de plata

Se formaron 6 grupos de ratas con una n=6, los grupos experimentales fueron 1, 3 y 5 los cuales recibieron 50 mg/Kg de NPs de Ag vía intraperitoneal (i.p.), los grupos 2, 4 y 6 fueron sus respectivos controles y solo recibieron agua.

Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico en condiciones de laboratorio ya antes mencionadas. Los tiempos de exposición fueron: grupos 1 y 2 durante 24 hrs, grupos 3 y 4 durante 4 días y grupos 5 y 6 durante 7 días.

2.2.2.2 Obtención de muestras

Al finalizar el periodo de exposición los grupos fueron anestesiados con una solución de pentobarbital sódico (33 mg/kg) administrado vía i.p. y se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena renal. La sangre fue colectada en tubos libre de anticoagulante. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de refrigeración de 4°C para su conservación.

Inmediatamente las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, se perfundió el cadáver con una solución de glutaraldehído y se extrajeron los siguientes órganos: bazo, cerebro, corazón, hígado, pulmón y riñón, de los cuales se tomó una pequeña sección la cual fue macerada y fijada en glutaraldehído para procesarla mediante técnicas histológica y analizarla por Microscopía Electrónica de Transmisión con Espectroscopía de Energía Dispersiva por rayos X (TME con EEDX); el resto del órgano fue pesado y colocado en un recipiente previamente etiquetado para su tratamiento para la cuantificación de plata por EAA.

2.2.2.3 Evaluación de la presencia de las nanopartículas de plata mediante Espectroscopía de Energía Dispersiva por rayos X (EEDX).

Para determinar la presencia de las NPs de Ag se utilizó el EDX que es un microanálisis con rayos X en el microscopio de transmisión electrónica. La muestra se barre durante varios minutos y los rayos X son colectados y analizados por el equipo, la respuesta es analizada por el Microscopio electrónico de transmisión.

2.2.2.3.1 Tratamiento de las muestras

La sección tomada de los órganos fue fijada en osmio, procesada con resinas epóxicas, se obtuvieron cortes finos con el ultramicrotomo los cuales fueron contrastados para el análisis mediante TME con EEDX para determinar la presencia de NPs de Ag.

2.2.2.4 Cuantificación de Ag por EAA

La concentración de plata en sangre y tejidos fue determinada por Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de grafito, automuestreador automático y corrector de fondo. El método se basa en que a partir de muestras y estándares de concentración conocida se obtienen átomos de plata en estado elemental a través de los cuales se hace pasar un haz de luz. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de átomos presentes.

2.2.2.4.1 Tratamiento de las muestras

Sangre. Las muestras de sangre fueron centrifugadas para la obtención de suero el cual fue utilizado directamente para la medición de plata.

Tejidos. Para la determinación de plata los órganos se llevaron a digestión húmeda utilizando ácido nítrico concentrado para eliminar la materia orgánica, se realizaron las diluciones necesarias con agua desionizada para asegurar que la concentración de las muestras estuviera dentro del margen de la curva de calibración al ser procesadas por el equipo.

Todo el material utilizado para la preparación y el análisis de muestras para la determinación de plata se sometió a técnicas especiales de limpieza química con el fin de evitar contaminación de plata y polvo.

2.2.2.4.2 Estándares de plata (Ag)

A partir de una solución estándar de Ag (1000 $\mu\text{g/mL}$), se preparó una solución stock de 10 $\mu\text{g/mL}$. En un matraz volumétrico de 100 mL se colocaron: 3 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado, 1 mL del estándar de plata y se aforó con agua tipo 1 (desionizada). Los estándares utilizados para realizar la curva de calibración fueron preparados a partir de la solución stock como se indica en la tabla 1

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración.

Solución_Ag 10 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	HNO_3 (μL)	Volumen_final (mL)	Concentración de Ag ($\mu\text{g/mL}$)
Blanco	500	10	0
50	500	10	5
100	500	10	10
200	500	10	20
400	500	10	40
600	500	10	60

2.2.2.4.3 Curva de calibración

La curva fue utilizada para optimizar la señal del equipo, se realizó antes de iniciar el análisis de muestras, para lo cual se midieron 100 µL de cada estándar por separado y se mezclaron con 800 µL de HNO₃ 10% + 100 µL de una solución modificadora de paladio-magnesio, fueron colocados en orden en el automuestreador del equipo y se les midió la absorbancia, el criterio de aceptación para determinar la linealidad de la curva fue un coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.995$.

2.2.2.4.4 Procedimiento

Una vez preparada la curva de calibración y que se aceptó la linealidad de respuesta se procedió a analizar las muestras de la siguiente manera:

Suero: se colocaron en copas de muestreo 100 µL de muestra + 900 µL de solución modificadora.

Órganos: se colocaron en copas de muestreo 900 µL de muestra + 100 µL de solución modificadora.

Las muestras fueron homogenizadas al bombear con la pipeta de manera suave y repetida utilizando la puntilla como agitador, se colocaron en el automuestreador para su determinación de plata en el equipo. Se aceptaron los valores se encontraban dentro del rango de la curva, cuando alguna muestra excedió el intervalo, a ésta se le realizó una dilución adecuada y se analizó nuevamente.

2.2.2.4.5 Cálculo para determinar la concentración de Ag

Los cálculos se realizaron a partir de la lectura del equipo y tomando en cuenta las diluciones que se realizaron de la muestra original, se obtuvieron el promedio y la desviación estándar. Los niveles de plata en suero se reportan en µg/ dL y los resultados obtenidos de las muestras de órganos se reportan como µg/ g de órgano.

2.2.3 Determinación de la concentración de plata en muestras de orina y heces

2.2.3.1 Exposición de los animales a las nanopartículas de plata

Se formaron 2 grupos de ratas Wistar con una n=6, el grupo experimental fue el grupo 1, este grupo recibió una dosis de 50 mg/Kg de NPs de Ag vía i.p., el grupo 2 fue el respectivo control y éste solo recibió agua desionizada vía i.p. Ambos grupos fueron habituados en condiciones de laboratorio ya antes mencionadas y colocados individualmente en jaulas metabólicas para la recolección de las muestras de orina y heces.

2.2.3.2 Obtención de las muestras

Los tiempos de muestreo fueron los días 1, 4 y 7 posteriores a la administración de la dosis de nanopartículas. Se recolectaron muestras de orina y heces de 24 h, se midieron o pesaron y se colocaron en frascos de plástico lavadas y etiquetadas previamente y se almacenaron en congelación hasta su análisis.

2.2.3.3 Tratamiento de las muestras

Las muestras obtenidas fueron digeridas utilizando el horno de microondas para eliminar la materia orgánica.

Heces: fueron previamente deshidratadas durante 8 h a una temperatura de 70°C, se pulverizaron para homogenizar la muestra y se pesaron 0.5 g los cuales se depositaron en un vaso de teflón para microondas y se les agregaron 3 mL de agua tipo I + 3 mL de HNO₃ concentrado.

Orina: se midieron 3 mL de la muestra de orina, se depositaron en un vaso para microondas y se adicionaron 2 mL de HNO₃ concentrado.

Los vasos para microondas fueron colocados en el carrusel del aparato para llevar acabo la digestión.

2.2.3.4 Estándares de plata y curva de calibración

Los estándares de plata y la curva de calibración se prepararon en la misma forma y condiciones para las muestras de suero y órganos.

2.2.3.5 Procedimiento

Después de aceptar la linealidad de la curva se midieron las muestras de la siguiente manera:

Orina: en una copa de muestreo se depositaron 600 μL de muestra + 300 μL de solución modificadora + 100 μL de agua tipo I.

Heces: en una copa de muestreo se depositaron 100 μL de muestra + 900 μL de solución modificadora.

Las muestras se homogenizaron de la misma forma que se hizo con las muestras de órganos y se colocaron en el automuestreador para su determinación de plata en el equipo. Se aceptaron los valores se encontraban dentro del rango de la curva, cuando alguna muestra excedió el intervalo, a ésta se le realizó una dilución adecuada y se analizó nuevamente.

2.2.3.6 Cálculo para determinar la concentración de plata

Los cálculos se realizaron a partir de la lectura del equipo, se obtuvieron el promedio y la desviación estándar. El resultado de las muestras de orina se reportaron en $\mu\text{g/L}$ y el resultado de las muestras de heces en $\mu\text{g/g}$.

2.2.4 Evaluación de la toxicidad producida por las nanopartículas de plata

Se determinó la toxicidad aguda tomando como base el protocolo #420 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), en el cual se establece que los animales son expuestos a una dosis de 5mg/Kg de la sustancia a

evaluar y después de un período de 24 h se evalúa el parámetro de mortalidad si no hay mortalidad se procede a evaluar una dosis de 50 mg/Kg.

Para esta prueba se formaron 6 grupos de ratas con una n=6, los grupos experimentales fueron 1 y 2, los cuales recibieron 5 y 50 mg/Kg respectivamente de NPs de Ag vía intraperitoneal (i.p.), los grupos 3 y 4 fueron sus respectivos controles y solo recibieron agua. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico en condiciones de laboratorio ya antes mencionadas.

Después la administración de la dosis más baja (grupo 1) se evaluó la mortalidad a las 24 h, posteriormente se expuso el siguiente grupo con su respectivo control y fue evaluado el parámetro de mortalidad nuevamente 24 h después.

Los 4 grupos de animales se mantuvieron en observación durante un periodo de 60 días habituados en las mismas condiciones. Y se evaluó nuevamente la mortalidad.

3. RESULTADOS

3.1 Evaluación de la citotoxicidad

3.1.1 Revisión microscópica y prueba de reducción del MTT

Después de la exposición de las células de hígado de Chang y células L929 a las NPs de Ag, se determinó la viabilidad celular mediante la evaluación microscópica y con la prueba de reducción de MTT y se observó que las nanopartículas de plata disminuyeron hasta un 60% la viabilidad de las células de hígado de Chang a partir de la concentración de 53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h de exposición (Figura 1) y no se observó incremento la toxicidad en el período de 48 h. En el caso de las células L929 la reducción de la viabilidad celular fue de un 50% a la concentración de 106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el período de 24 h de exposición y de casi el 80% para la misma concentración en el periodo de 48 h de exposición (Figura 2).

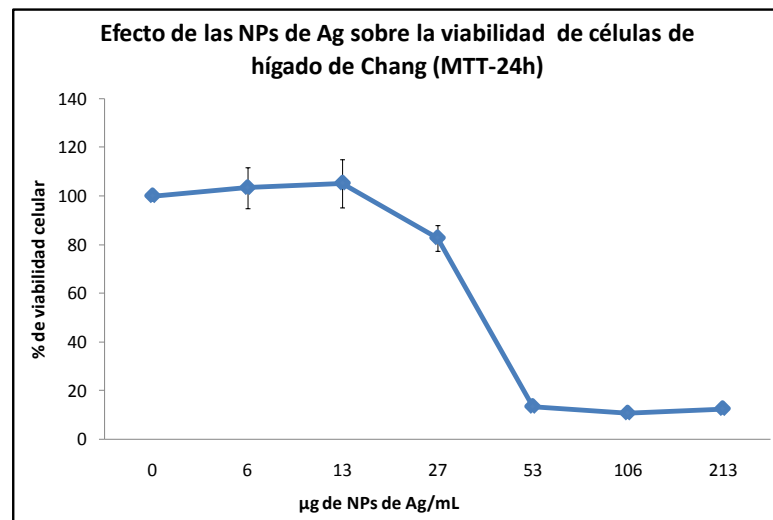
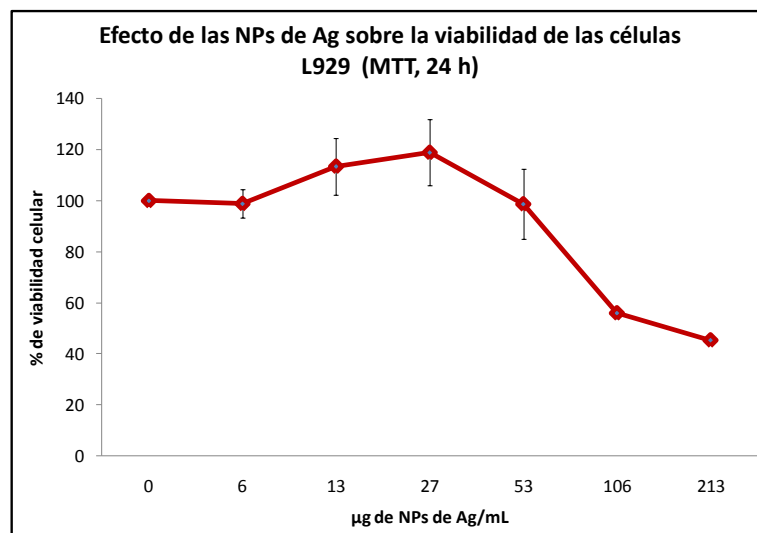
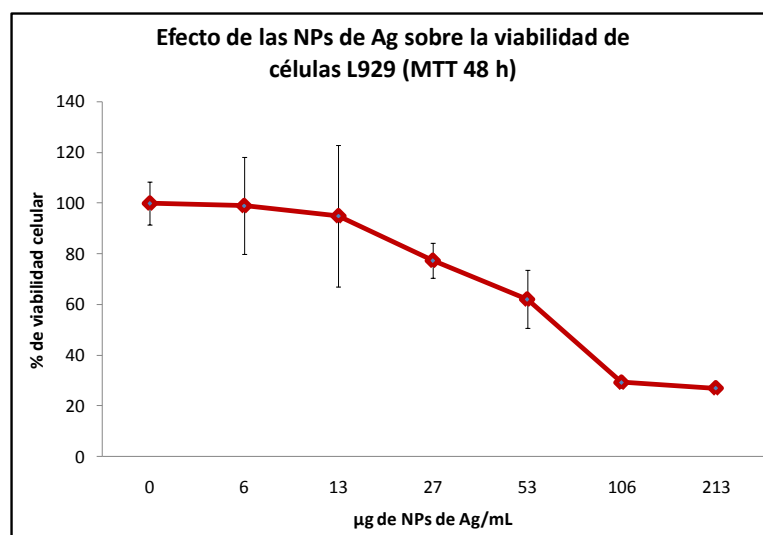


Fig. 1. Porcentaje de viabilidad de células de Hígado de Chang obtenido después de 24 h de exposición a NPs de Ag mediante la prueba de reducción del MTT. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes.



(a)



(b)

Fig. 2. Porcentaje de viabilidad de células L929 obtenido después de 24 (a) y 48 h (b) de exposición a NPs de Ag mediante evaluación microscópica y prueba de reducción de MTT. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes.

3.2 Evaluación de estrés celular oxidativo producido por las nanopartículas de plata mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

Al evaluar el efecto de las NPs de Ag sobre la producción de estrés celular por la xantina oxidasa (enzima inductora de radicales libres) se observó que a las concentraciones evaluadas se inhibió la actividad oxidante de la enzima.

Las tres concentraciones evaluadas (12.5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína debido a la presencia de radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). Este efecto se observó durante las 6 horas de medición continua (es decir cada hora) así como en una medición que se realizó a las 24 h después del inicio de la evaluación.

Los resultados de la prueba de DCFDA en células de hígado de Chang se muestran en la figura 3.

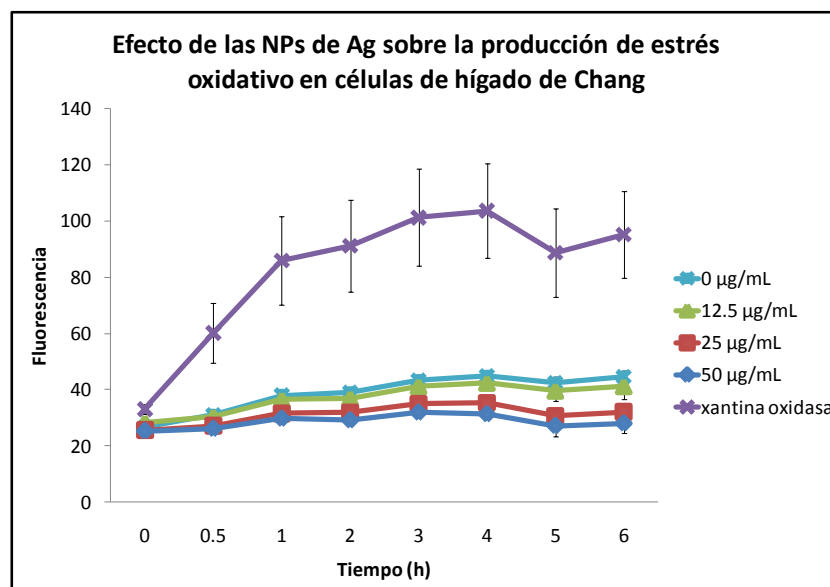


Fig. 3. Efecto de las nanopartículas de plata sobre la producción de estrés celular oxidativo en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes.

3.3 Efecto de las NPs de Ag sobre la producción de óxido nítrico y determinación indirecta de liberación del factor de necrosis tumoral -alfa

3.3.1 Producción de NO

Al evaluar el efecto de las nanopartículas de plata sobre la producción de NO por macrófagos se observó que éstos produjeron una cantidad significativa de NO a partir de la concentración de 53 µg/mL de NPs de Ag durante una exposición 24 h.

Las concentraciones de nanopartículas de plata evaluadas fueron las mismas que se utilizaron para la evaluación de la citotoxicidad. En la figura 4 se muestran los resultados de la producción de NO en el rango de concentraciones de 6 a 425 µg/mL

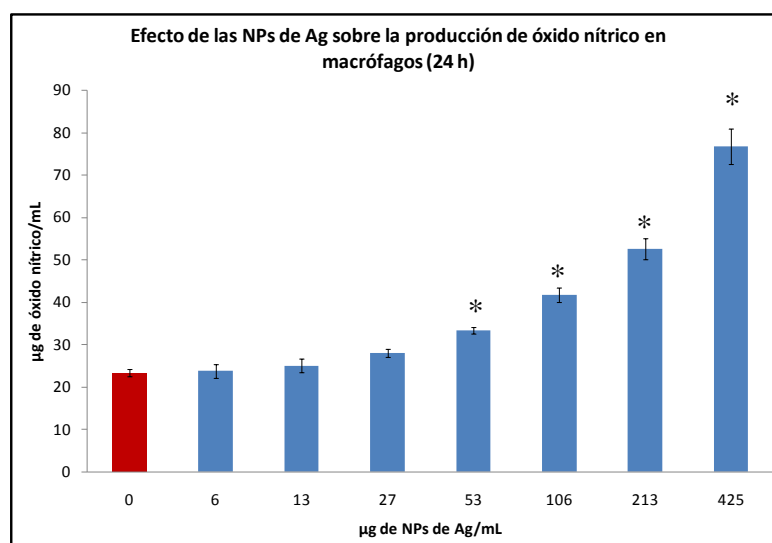


Figura 4. Producción de óxido nítrico por macrófagos expuestos a nanopartículas de plata durante 24 h. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes.

3.3.2 Determinación indirecta de la liberación del TNF- α

En los resultados obtenidos para la determinación indirecta de la liberación del TNF- α , se observó una disminución de casi 50% de la viabilidad de células L929 expuestas a 50 μ L y a 100 μ L de medio de cultivo de macrófagos expuestos a NPs de Ag a la concentración de 106 μ g/mL respectivamente durante 24 h. (Figura 5)

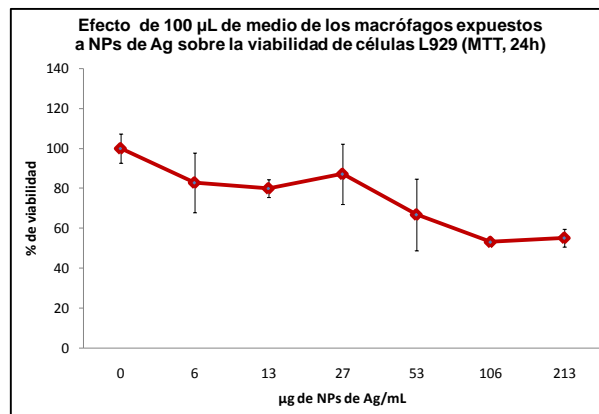
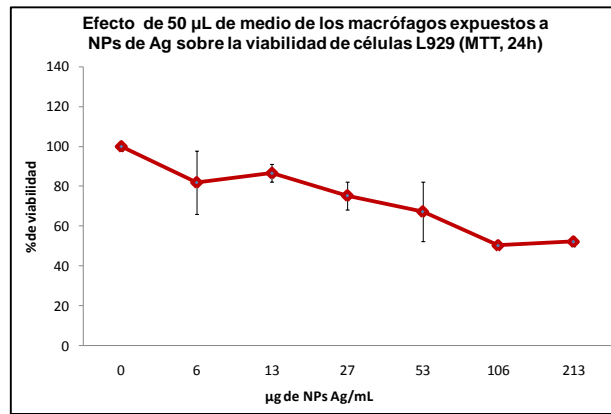


Figura 5. Efecto de de medio de cultivo de 50 y 100 μ L tomados de la placa de cultivo de macrófagos expuestos a nanopartículas de Ag sobre la viabilidad celular de células L929.

3.4 Evaluación de la cinética de distribución

3.4.1 Determinación de la concentración de plata en órganos

Al evaluar la cinética de distribución en ratas Wistar expuestas a las NPs de Ag mediante la determinación de la concentración de plata en las muestras de los diferentes órganos por la técnica de absorción atómica se observó que la plata estuvo presente en todos los órganos que se evaluaron aunque las concentraciones en algunos de ellos como es el caso del hígado, bazo y corazón fueron mayores. En la figura 6 se muestra una visión general de las concentraciones de plata en todos los órganos evaluados a los 3 diferentes periodos de exposición.

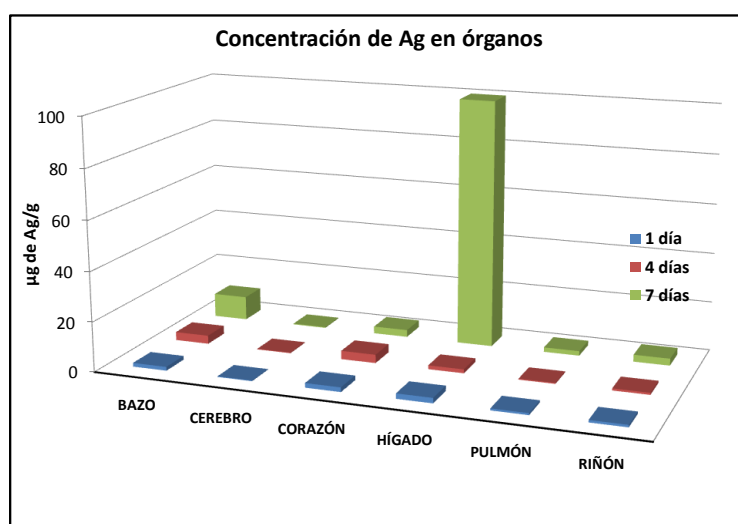


Figura 6. Concentraciones de plata de las muestras de órganos de ratas Wistar (bazo, cerebro, hígado, pulmón y riñón) después de 1, 4 y 7 días de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.,

Para una mejor visualización se cortó la gráfica anterior en la escala de 10, con el fin de observar las concentraciones del resto de los órganos, en donde se observa que el segundo órgano con la mayor concentración de plata fue el bazo, posteriormente le siguen el corazón, riñón, pulmón y finalmente el

cerebro el cual fue el órgano en el cual se depositó la cantidad más baja, casi nula (figura 6.1).

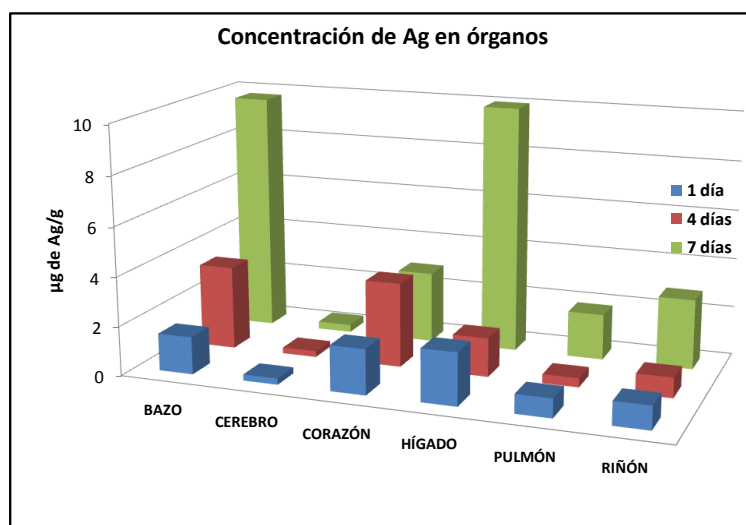


Figura 6.1. Corte de la gráfica 6, en la que se observa que el bazo es el segundo órgano con la mayor cantidad de plata durante los 3 periodos de exposición.

A continuación se muestran los gráficos de las concentraciones de plata en las muestras de órganos por cada tiempo de exposición, en la figura 7 se muestran los resultados de los órganos de ratas expuestas durante el periodo de 1 día, en donde se observa que el corazón y el bazo fueron los órganos con mayor contenido de plata. En la figura 8 se graficaron los resultados que corresponden a la exposición de 4 días, en este caso los órganos con mayor concentración fueron hígado y bazo. Y finalmente en la figura 9 se representan los resultados correspondientes a 7 días de exposición después de la administración de 50 mg/kg de NPs de Ag, en éste periodo se repite nuevamente el corazón y el bazo como los órganos con mayor concentración de plata, sin embargo el hígado se observa que tuvo una acumulación muy grande, casi 50 veces mas que en el periodo de 4 días para este mismo órgano. Debido a este resultado, las concentraciones de plata para el resto de

los órganos no se aprecian bien por lo que se decidió cortar esta gráfica para una mejor visión de las concentraciones restantes (figura 9.1)

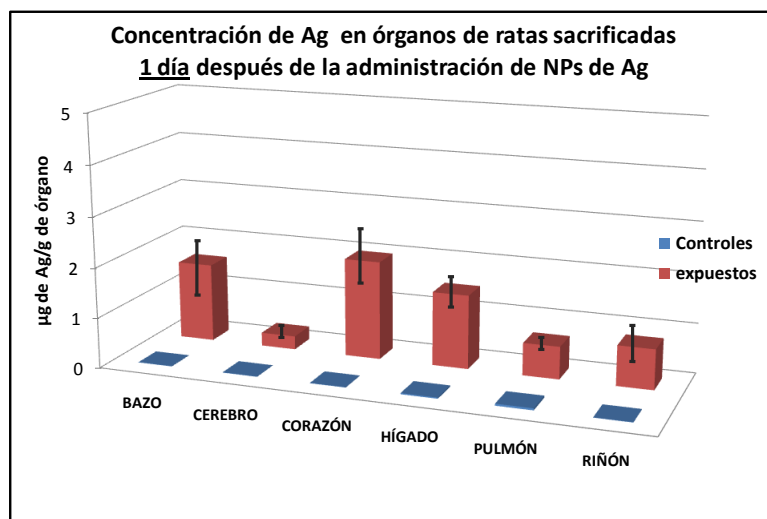


Figura 7. Concentraciones de plata en las muestras de órganos de ratas Wistar (bazo, cerebro, hígado, pulmón y riñón) después de 1 día de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p. en donde se aprecia que los órganos con mayor cantidad de plata fueron corazón, bazo e hígado en comparación con el resto.

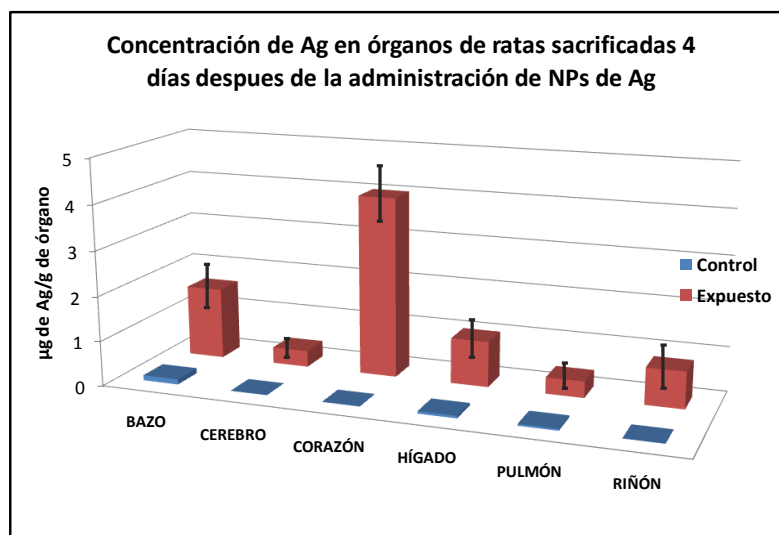


Figura 8. Concentraciones de plata en las muestras de órganos correspondientes a 4 días de exposición de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p., se muestra que para este periodo el corazón y el bazo son los órganos con la mayor concentración de plata en comparación con el resto.

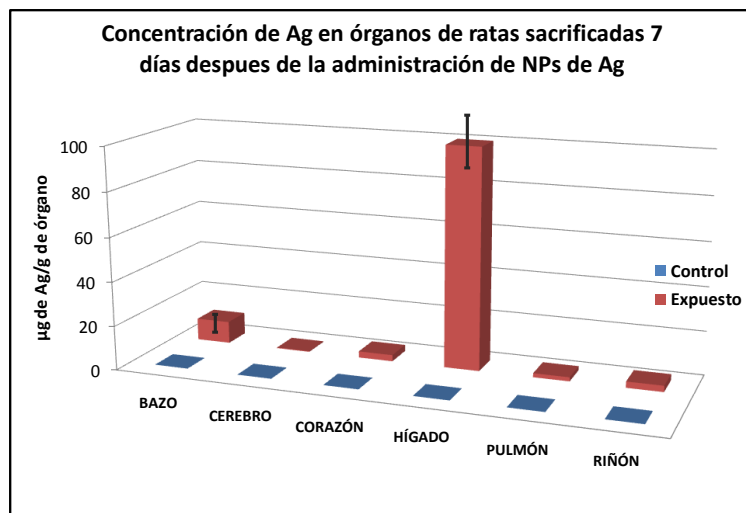


Figura 9. Concentraciones de plata de las muestras de órganos de ratas Wistar (bazo, cerebro, hígado, pulmón y riñón) correspondientes al periodo de 7 días después de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p., se observa que los órganos con las mayor concentración fueron el hígado y el bazo.

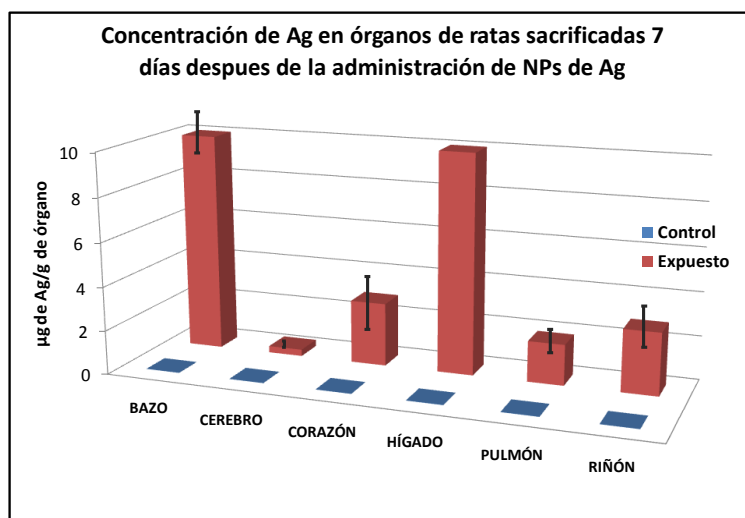


Figura 9.1. Corte de la gráfica 9 para una mejor apreciación de las concentraciones de plata en órganos de ratas Wistar (bazo, cerebro, hígado, pulmón y riñón) obtenidos después 7 días de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.

Los órganos en los que se encontraron las mayores concentraciones de plata en los tres tiempos de exposición fueron: hígado, bazo y corazón. (figura 10)

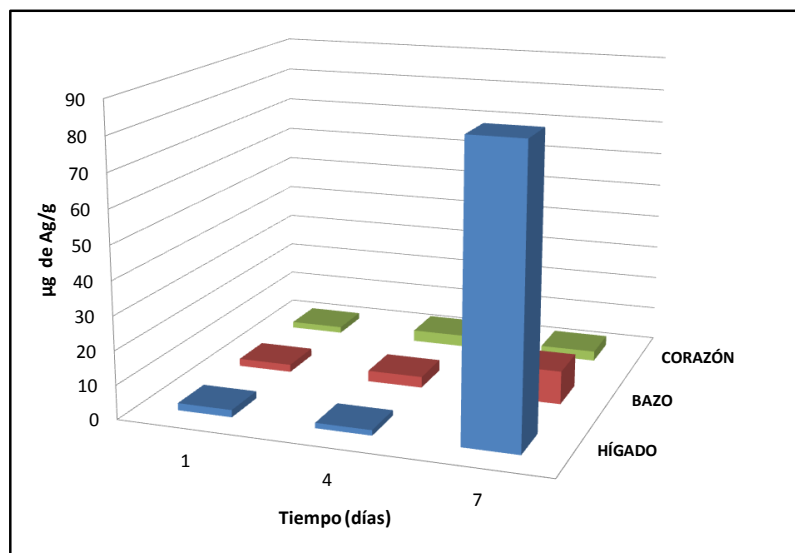


Figura 10. Órganos de ratas Wistar con mayor concentración de plata después de 1, 4 y 7 días de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p .

3.4.2 Determinación de concentración de plata en muestras de sangre

Se determinó la concentración de plata en sangre utilizando el suero, los tiempos a los que se obtuvieron las muestras fueron: 1, 4 y 7 días posteriores a la administración de 50 mg/Kg de NPs de Ag. La plata se detectó en los tres tiempos muestreados y se observó que la concentración disminuyó en relación con el tiempo (figura 11).

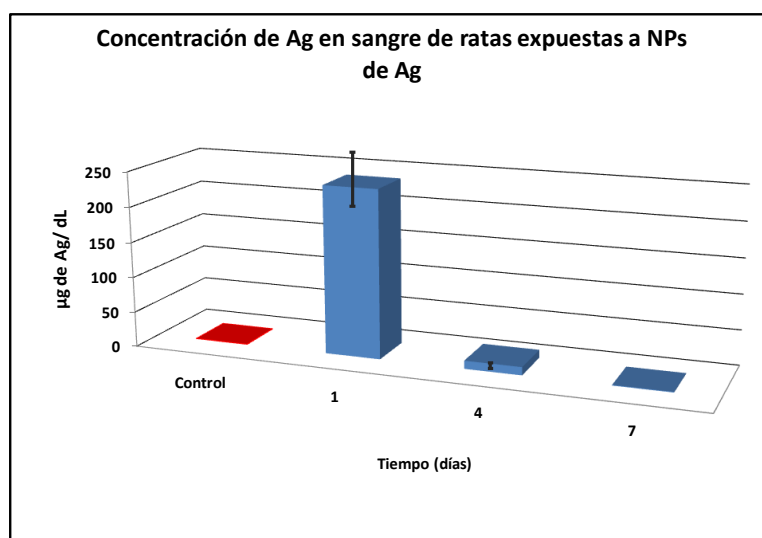


Figura 11. Concentraciones de plata en muestras de sangre de ratas Wistar obtenidas después de 1, 4 y 7 días después de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.

3.4.3 Determinación de la presencia de nanopartículas de plata mediante la técnica de Espectroscopía con Energía Dispersiva de rayos X (EEDX)

En la figura 12 se muestra una micrografía de la nanopartícula de plata de 2 nm de diámetro mediante la técnica de EEDX.

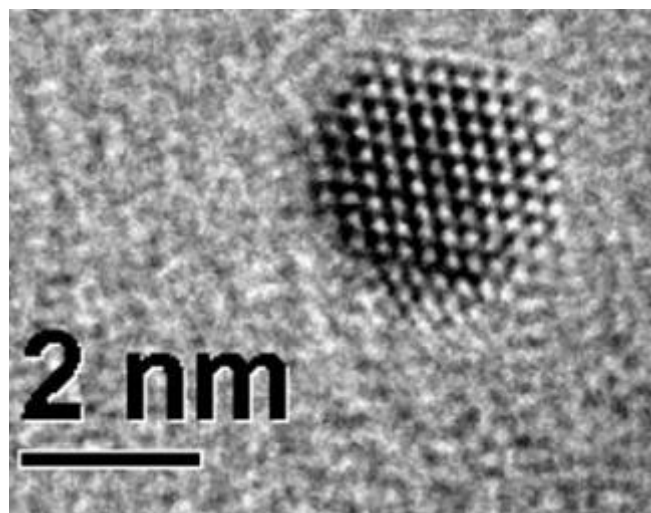


Figura 12. Nanopartículas de plata de 2 nm observada mediante la técnica de Espectroscopia por la Energía Dispersiva de X.

Las NPs de Ag se observaron en las muestras de los órganos de hígado, corazón, bazo, riñón y pulmón de ratas Wistar expuestas a 50 mg/kg de NPs de Ag administradas vía i.p., en la figura 12 se muestran micrografías de hígado, corazón y riñón.

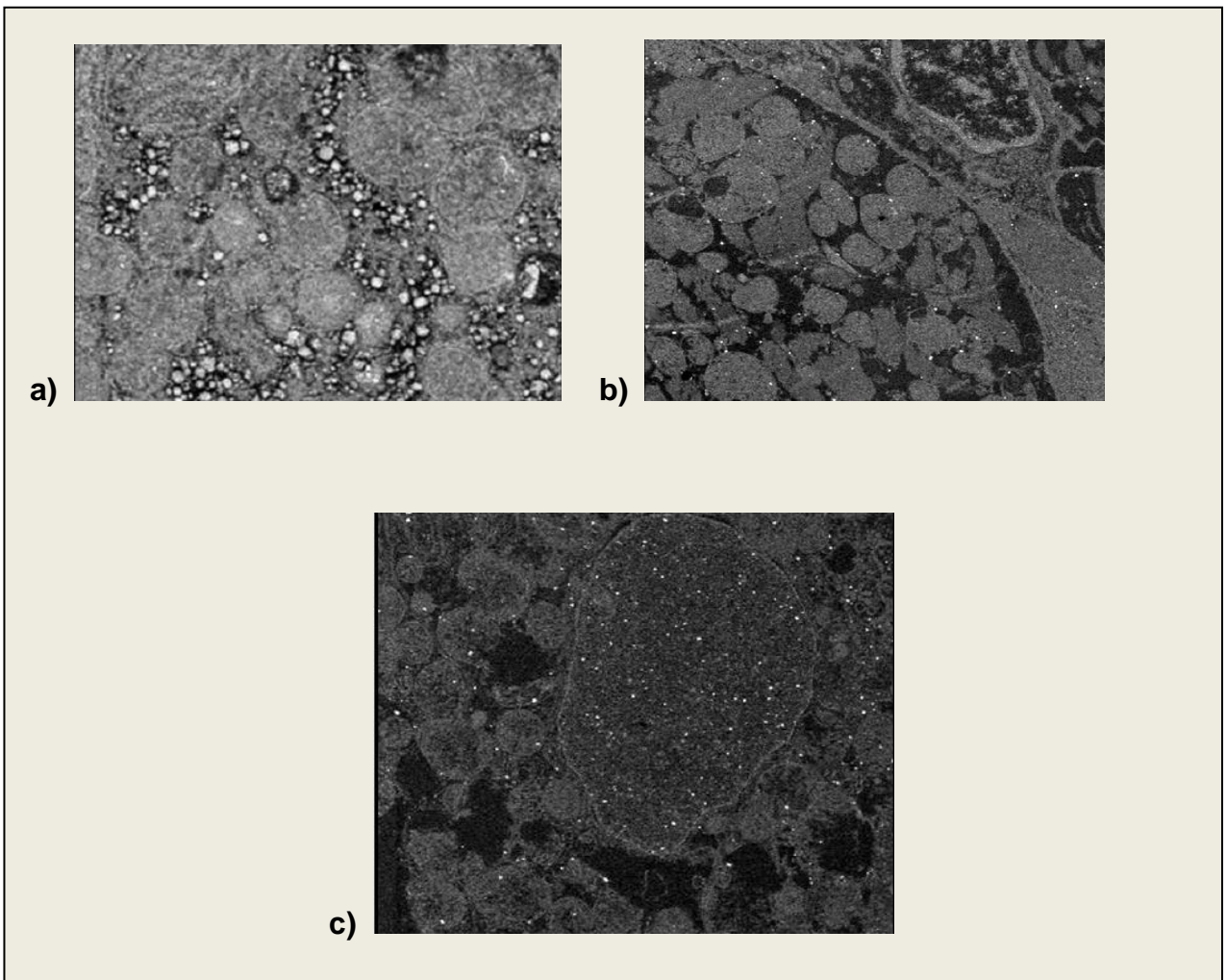


Figura 12. Las nanopartículas de plata se observan como puntos luminosos en muestras de hígado (a), corazón (b) y riñón (c) de ratas Wistar expuestas a 50 mg/kg mediante la técnica EEDX.

En las muestras de cerebro obtenidas de las mismas ratas de este estudio no se observó la presencia de nanopartículas de plata y solo se observó una luminosidad entre el tejido cerebral. En la figura 13 se muestra una micrografía en donde solo se observa la membrana de células del tejido cerebral con un aspecto luminoso.

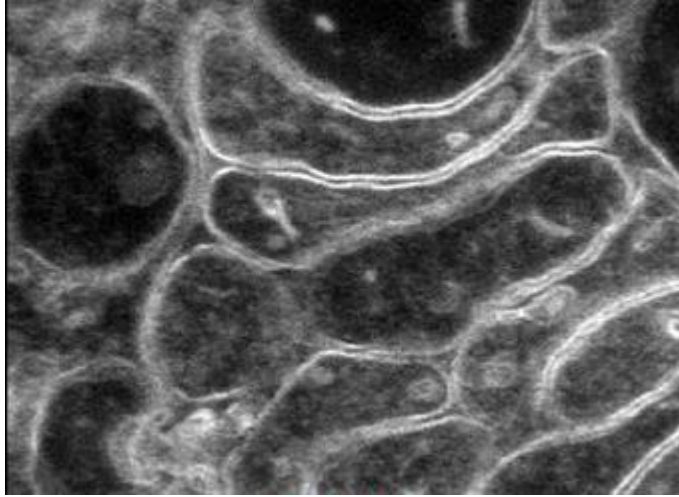


Figura 13. Micrografía de tejido cerebral de ratas Wistar expuestas a 50 mg/kg de peso administradas vía i.p., en donde se observan membranas con aspecto luminoso.

3.4.4 Determinación de la concentración de plata en muestras de orina y heces

Se determinó la concentración de plata en muestras de orina obtenidas después de 1, 4, 7 y 21 días de la administración de 50 mg/Kg de NPs de Ag vía i.p., se observó que la concentración de plata disminuyó significativamente a partir de los 4 días, se mantuvo muy similar a los 7 días y tuvo un ligero descenso a los 21 días (figura 14).

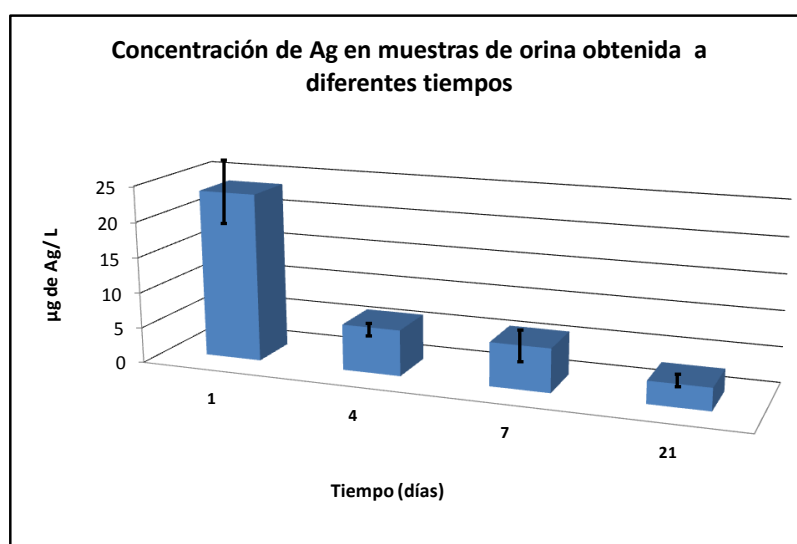


Figura 14. Concentraciones de plata en muestras de orina obtenidas después de 1, 4, 7 y 21 días de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.

Por otro lado las concentraciones de plata en las muestras de heces se comportaron de manera oscilatoria con relación al tiempo. Las muestras obtenidas los días 4 y 21 fueron las que tuvieron las concentraciones mayores de plata con respecto a los días 1 y 7, estos resultados se muestran de manera gráfica en la figura 15.

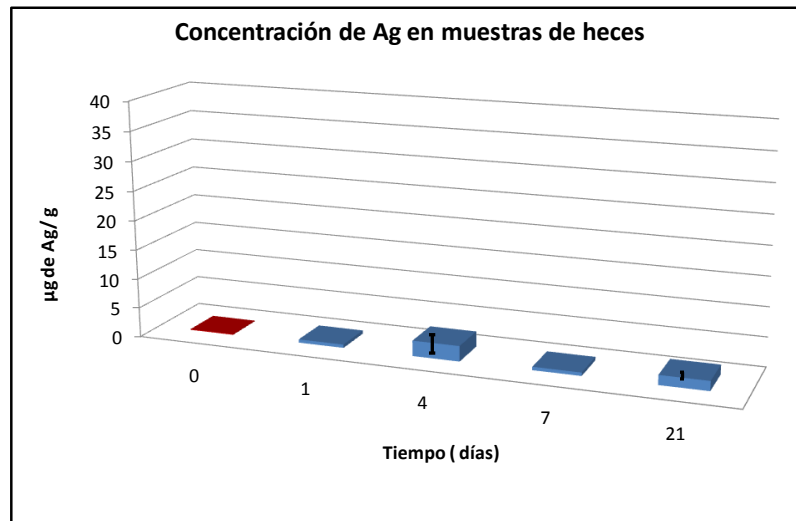


Figura 15. Concentraciones de plata en muestras de heces obtenidas después de 1, 4, 7 y 21 días de la administración de 50 mg/Kg de nanopartículas de plata vía i.p.

3.5 Evaluación de la toxicidad de nanopartículas de Ag *in vivo*

Al evaluar la toxicidad de NPs de Ag en ratas se observó que no hubo muertes a ninguna de las concentraciones evaluadas (5 y 50 mg/kg) en el periodo de exposición de las 24 h que establece el protocolo #420 de la OCDE. El período de observación se extendió hasta 60 días y ninguno de los animales murió.

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron diferentes pruebas *in vitro* e *in vivo* con las NPs de Ag con el fin de evaluar su cinética de distribución y su toxicidad.

Las NPs de Ag fueron elegidas porque se les ha atribuido potencial terapéutico, incluso actualmente se está proponiendo su uso como medicamento, pues en diversos estudios *in vitro* se ha demostrado que poseen actividad antibacteriana (*E. coli*, *E. aureus*, *P. aureoginosa*, *S. typhi* entre otras), actividad antiviral (VIH y VPH) y se menciona que además pueden ser utilizadas en métodos de diagnóstico como medio de contraste.

Dentro de la batería de ensayos preclínicos *in vitro* utilizados como métodos de toxicología para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular. La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado a partir de diferentes pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales líneas celulares, cultivos primarios y cultivo de órganos aislados.

En éste proyecto la evaluación de la citotoxicidad se realizó utilizando la prueba de reducción del MTT la cual se fundamenta en la capacidad de las

mitocondrias de la células vivas para reducir el MTT a formazán que es detectado espectrofotométricamente y la absorbancia leída es directamente proporcional a la viabilidad celular. Este estudio se llevó acabo en células de Hígado de Chang y en las células L929 con el fin de determinar la toxicidad en diferentes líneas celulares, al respecto se observó que las nanopartículas de plata fueron citotóxicas para ambas líneas celulares. Las células L929 fueron menos sensibles a las nanopartículas de plata que las células de hígado de Chang pero de igual forma las nanopartículas de plata disminuyeron su viabilidad celular a bajas concentraciones. A la fecha no existen estudios de evaluación de citotoxicidad de nanopartículas de plata de 2 nm. En un estudio realizado por Hussain SM. y cols. demostró que nanopartículas de plata de 7 a 15 nm fueron citotóxicas para la línea de células de hígado de rata y además las nanopartículas fueron encontradas dentro de la mitocondria. Lo anterior pudiera sugerir que las nanopartículas de plata pudieran resultar citotóxicas para diferentes líneas celulares produciendo daño a nivel mitocondrial lo cual puede ser evaluado con la prueba de reducción del MTT. Sin embargo es necesario realizar evaluaciones con diferentes líneas y distintas pruebas de viabilidad celular utilizando nanopartículas de plata de 2 nm.

La evaluación de la producción de estrés celular oxidativo por especies reactivas de oxígeno se hizo mediante la medición de fluorescencia emitida por el metabolito desacetilado de la DCFDA dentro de la célula. Esta prueba es ampliamente utilizada para determinar la capacidad oxidante de diversos compuestos. Esta prueba se realizó en células de hígado de Chang. Al respecto se observó que ninguna de las concentraciones de las nanopartículas

de plata evaluadas produjo efecto oxidante pues la fluorescencia emitida por la concentración mas alta de nanopartículas de plata fue casi 3 veces menor que la emitida por la xantina oxidasa la cual se utilizó como control positivo en esta prueba.

Por los resultados obtenidos en la evaluación de la citotoxicidad y la evaluación del efecto de la producción de estrés oxidativo se puede sugerir que la citotoxicidad presentada en células de hígado de Chang no fue mediada por la producción de estrés oxidativo. Sin embargo en estudios realizados con nanopartículas de mayor tamaño a las que se utilizaron en este trabajo, se ha reportado que las nanopartículas de plata produjeron estrés oxidativo y que éste fue el principal responsable de la citotoxicidad.^{30, 31, 35,}

En el presente estudio se encontró que las nanopartículas de plata estimularon la producción de óxido nítrico por los macrófagos activados. Esto indica que dichas nanopartículas pudieran actuar como una señal de activación de macrófagos. Se sugiere que las nanopartículas de este tamaño podrían producir esta respuesta *in vivo* sobre los macrófagos e inducir su activación, o bien podrían interactuar con señales de preactivación de macrófagos como la del interferón gamma e incrementar su potencial inmunoterapéutico en contra de enfermedades infecciosas y cáncer. La activación de los macrófagos provoca la liberación de diferentes mediadores de citotoxicidad en contra de microorganismos infecciosos y células tumorales. En estos efectos citotóxicos participan intermediarios reactivos que incluyen intermediarios reactivos de oxígeno (peróxido, superóxido) y los intermediarios reactivos de nitrógeno que incluye el óxido nítrico, el cual es relevante para infecciones intra-macrofágicas

causadas por microorganismos intracelulares como las micobacterias.⁴³ En este estudio se determinó que a partir de la concentración de 53 µg/mL de nanopartículas de plata se incrementó la producción de óxido nítrico. Estos hallazgos podrían ser relevantes, ya que las posibles propiedades inmunológicas de las nanopartículas de plata podrían ser utilizadas en la terapia de enfermedades infecciosas y cáncer sin embargo este tipo de actividad requiere de posteriores estudios *in vivo* ya que otra posibilidad sería que los macrófagos estén reconociendo a las nanopartículas de plata como un agente extraño y por lo tanto, esta célula del sistema inmune se esté activando con el propósito de destruirlas.

En relación con la evaluación de la cinética de distribución, este estudio fue realizado con un modelo en ratas Wistar, las cuales fueron expuestas a nanopartículas de plata vía i.p. y se determinó la concentración de plata en distintos órganos, algunos de éstos fueron elegidos porque participan en la distribución, metabolismo, eliminación, son altamente irrigados y/o participan en el sistema de defensa.¹⁴ Como parte de la cinética también se cuantificó la concentración de plata en sangre, orina y heces.

Además de la cuantificación del contenido de plata en órganos, en este trabajo también se determinó la presencia de las nanopartículas como tales en las muestras de los órganos evaluados. Los resultados demostraron que las nanopartículas se distribuyeron en todos los órganos evaluados y que el hígado y el bazo fueron los órganos en los cuales se concentraron en mayor cantidad en los tres periodos de exposición evaluados. Esto fue corroborado tanto por la medición de la concentración de plata por absorción atómica como

por la detección de las nanopartículas de plata por la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica. Los resultados concuerdan con los estudios realizados por otros investigadores con nanopartículas de oro¹⁹ en donde se observó que las nanopartículas de oro de distintas magnitudes fueron fagocitadas por las células de Kupffer y posteriormente por macrófagos de otros órganos, esto es de gran importancia particularmente en el caso de los macrófagos hepáticos porque al participar en el aclaramiento de las nanopartículas mediante el proceso de fagocitosis se produce un grado de oxidación dando lugar a la formación de radicales de oxígeno los cuales pueden resultar dañinos¹⁴. La alta concentración de plata encontrada en el bazo puede deberse en parte a que este órgano está altamente irrigado, y a que es parte importante del sistema inmune, en este sentido algunos autores mencionan que las células del sistema inmunológico participan en la distribución de nanopartículas en los diferentes órganos y sugieren que células como los macrófagos pudiesen ser los responsables de transportar las nanopartículas dentro del organismo a través de diferentes barreras.¹⁹ Esto explicaría la presencia de las nanopartículas de plata observadas en muestras de hígado, bazo, corazón, riñón y pulmón. Se ha descrito que la distribución, de las nanopartículas depende de las propiedades de cada tipo de nanopartícula en particular, y que estando dentro de la célula éstas, podrían concentrarse dentro del citoplasma o en organelos como los lisosomas, por lo tanto los efectos tóxicos que las nanopartículas pudieran producir, serían en el orden de acumulación en los diferentes órganos, y sugieren el siguiente orden de acumulación son hígado > bazo > médula > cerebro¹⁴ En este sentido los resultados obtenidos en este estudio coinciden en que el hígado es uno de los

órganos donde se acumuló la mayor cantidad de Ag y de nanopartículas como tales y el cerebro también fue el órgano con menor cantidad de plata.

En cuanto a los niveles de plata en las muestras de sangre se observó que hubo una disminución en la concentración de plata en relación al tiempo, lo cual es congruente con la cinética de distribución que siguieron las nanopartículas las cuales tendieron a depositarse en los órganos, hecho que fue demostrado tanto con la determinación de la concentración de plata, como la observación de la presencia de las nanopartículas en ellos. El depósito de las nanopartículas en órganos implica su aclaración de sangre y explica que la concentración en la misma disminuyera.

Por otro lado el aclaramiento renal también fue determinante para la disminución de la concentración de plata detectada en sangre. En la determinación de plata en muestras de orina se estableció que éstas fueron filtradas por el riñón y la disminución de las concentraciones de plata en orina en relación al tiempo (se evaluaron 4 tiempos distintos posteriores a la administración de las nanopartículas) reflejó la disminución de la presencia de nanopartículas en sangre. En las muestras de orina de 21 días posteriores a la administración de las nanopartículas aún se logró cuantificar plata, esto pudiese deberse a que después de cierto tiempo hubo una redistribución de las nanopartículas de plata de los órganos hacia la sangre y nuevamente hubo filtración renal de las mismas y excreción a través la orina. Con respecto a las muestras de heces, las concentraciones fueron muy bajas por lo que se sugiere que la eliminación de las nanopartículas de plata es en su mayoría por vía renal. Lo anterior coincide con lo reportado por Sadauskas y cols. quien a postulado en forma de hipótesis que las nanopartículas se eliminan por orina

como resultado de una simple filtración.¹⁹ En este trabajo se demostró además la filtración de las nanopartículas de plata como tales, ya que el análisis de las muestras de orina mediante la técnica de Espectroscopía de Energía Dispersiva por rayos X evidenció la presencia íntegra de éstas en las muestras evaluadas a diferentes tiempos.

Las pruebas para la evaluación de la toxicidad "*in vivo*", incluyen un gran número de protocolos llevados a cabo en diferentes modelos animales y por diferentes vías de administración, en este proyecto se utilizaron ratas Wistar y la vía i.p. para la administración de las nanopartículas y se evaluó mortalidad en dos períodos 24h y 60 días. Las nanopartículas de plata no fueron tóxicas para ninguna de las dosis evaluadas, ya que ninguno de los animales falleció durante el periodo de 24 h ni en el periodo de observación de 60 días el cual fue más prolongado que el recomendado por la OCDE. La diferencia entre los resultados para la evaluación de la toxicidad *in vitro* e *in vivo* puede ser el resultado de la participación de mecanismos de defensa de un organismo superior o completo. Los resultados de este estudio permitieron establecer la distribución de las nanopartículas de plata en todos los órganos, su eliminación vía renal.

5. CONCLUSIONES

1. Las nanopartículas de Ag fueron citotóxicas.
2. Las nanopartículas de Ag no produjeron estrés celular oxidativo "*in vitro*".
3. Las nanopartículas de plata estimularon la producción de óxido nítrico por macrófagos "*in vitro*".
4. Los órganos con mayor concentración de Ag en ratas expuestas a nanopartículas fueron: el hígado y bazo.
5. La concentración de Ag en sangre disminuyó en relación al tiempo.
6. Se detectó la presencia de nanopartículas de plata en: hígado, bazo, corazón, riñón y pulmón
7. Se demostró la eliminación de nanopartículas de Ag por orina
8. Las nanopartículas de plata no fueron tóxicas en el modelo "*in vivo*" utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Borm P. J. A., Robbins D., Haubold S. *et al.* "The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC". *Part. Fiber Toxicol.*, 3:11, 2006.
2. Diccionario de nanotecnología disponible en: <http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologías/diccionario/diccionario.htm>
3. Medina C., Santos M. J., *et al.* "Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance". *British Journal of Pharmacology*, (2007).
4. Jerez-Urriolagoitia Mónica Marcela. "Efecto bactericida de nanopartículas de plata sobre microorganismos resistentes a los antibióticos". (Fac. de Cs. Biológicas, UANL) 2006
5. Surendiran A., Sandhiya S., *et al.*, "Novel applications of nanotechnology in medicine". *Indian J. Med. Res.*, 2009.
6. Gutiérrez C., *et al.*, "Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial". *Contacto Nuclear*, 2005.
7. Holister P., Willem Weener J., Román C., *et al.*, " Nanoparticles" *Científica*, 2003
8. Irache J. M., *et al.*, "Nanomedicine: nanoparticles with medical applications", *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 2008. 31:1
9. Godin B., Sakamoto J. H., *et al.* "Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases". *Trends Pharmacol. Sci.* 2010
10. Brown S. D., Nativo P., *et al.* "Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin". *Journal of American Chemical Society*. 2010

11. Mukherjee P., Bhattacharya R., Bone N., *et al.*, "Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (BCLL): enhancing apoptosis". *Journal of Nanobiotechnology*, May 8, 5:4, 2007
12. Cherukuri P., Curley S. A., *et al.*, "Use of nanoparticles for targeted, noninvasive thermal destruction of malignant cells". *Methods Mol Biol.*, 2010
13. Jiménez R., *et al.* "Medidas preventivas y de control para nanopartículas y nanomateriales". *Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS)*. 2008.
14. Monteiro-Riviere N. A., Tran L., *et al.*, "Nanotoxicology, Characterization, doping and health effects", *Ed. Informa healthcare*, 2007
15. Hussain S. M., Javorina A. K., Schrand A. M., *et al.* "The interaction of Manganese Nanoparticles with PC-12 Cells induces Dopamine Depletion". *Toxicological Sciences*, 92(2), 456-463, 2006
16. Murdock *et al.* "Effects of Copper Nanoparticles on viability and Function of PC-12 Cells". *The Toxicologist*. 2007
17. Braydich-Stolle *et al.*, "The effect of titanium Dioxide nanoparticles in mouse keratinocytes". *The Toxicologist*, 2007
18. De Lapuente J. *et al.* "In vitro cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles" *J Toxlet*, 2010
19. Sadauskas E., Wallin H., Meredin S. *et al.* "Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism". *Particle and Fibre Toxicology*, 4:10, 2007
20. Drake P. L., Hazelwood K. J. *et al.*, "Exposure-Related health effects of silver and silver compounds: a review". *Ann. Occup. Hyg.*, 49 (7), 575-585, 2005

21. Elechiguerra J. L., Burt J. L., Morones J., *et al.*, "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1". *J. of Nanobiotechnology*,3:6, 2005.
22. Lara H. H., Ayala-Nuñez N. V., Ixtepan-Turrent L. and Rodriguez-Padilla C. "Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1". *Journal of Nanobiotechnology*. Jan 20;8:1, 2010
23. Yacamán *et al.* "Pursuing the use of silver nanoparticles in vaginal cream against HIV". *Gaceta Biomédica*, 2006
24. Siddhartha S., Tanmay B., Arnab R. *et al.* "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles". *Nanotechnology*, 18:22, 5103, 2007
25. Asha Rani P. V., Prakash Hande M., *et al.* "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles". *BMC Cell Biology*, 2009
26. Ruden S., Hilpert K., *et al.*, "Synergistic Interaction between Silver Nanoparticles and Membrane-Permeabilizing Antimicrobial Peptides". *American Society for Microbiology*, 2009
27. Sheikpranbabu S., Kalishwaralal K., *et al.*, "Silver nanoparticles inhibit VEGF- and IL-1 induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells". *Nanobiotechnology*, 2009
28. Colleen M., Nicole L., *et al.*, "Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles". *Nanobiotechnology*, 2007
29. Carlson C., Hussain S. M., Schrand A. *et al.* "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species". *J. Phys. Chem. B*. 112.13608-13619, 2008.
30. Kim S., Choi J. E., *et al.* "Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells". *Toxicol In Vitro*. 2009.

31. Foldbjerg R., Olesen P., *et al.* "PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes". *Toxicol. Lett.*, 2009
32. Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M. *et al.*, "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells". *Toxicol. In Vitro*, 19, 975-983, 2005.
33. Kawata K., Osawa M., *et al.*, "In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells". *Environ. Sci. Technol.* 2009
34. Zolnik B. S., González-Fernández A., *et al.*, "Nanoparticles and the immune system". *Endocrinology*. 2010
35. Park E. J., Yi J., *et al.*, "Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism". *Toxicol In Vitro*. 2009
36. Tang J., Xi T., "Status of biological evaluation on silver nanoparticles". *Toxicol In Vitro*. 2009
37. Sharma H. S., Hussain S., *et al.*, "Influence of nanoparticles on blood-brain barrier permeability and brain edema formation in rats". *Acta Neurochir Suppl.*, 2010
38. Mosmann T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunology Methods*. 1983
39. Bass D. A., Parce J. W., *et al.* "Flow cytometric studies of oxidative stress product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation". *J. Immunol.*, 1983

40. Margaret M., Tarpey, David A., Wink, *et al.* " Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations". *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004
41. Margaret M., Tarpey, David A., Wink, *et al.* " Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations". *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004
42. Granger, D. L., Taintor R. R., *et al.* "Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction". *Methods Enzimol.* 1996
43. Taméz R. S., Rodríguez C., Tamez P., *et al.*, "Activación de macrófagos y linfocitos *in vitro* por extractos metanólicos de hojas de plantago mayor" *Ciencia UANL*, 4(3): 304-313