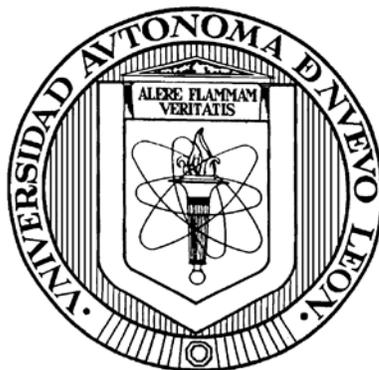


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACIÓN DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA
PLATA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN
DOS MODELOS ANIMALES**

Por:

M.C.P. Jesús Triana Verástegui

**Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con orientación en Farmacología y Toxicología**

Julio 2014

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA PLATA
DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
DE PLATA EN DOS MODELOS ANIMALES**

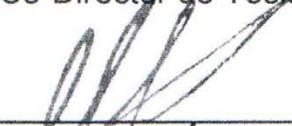
Aprobación de Tesis:



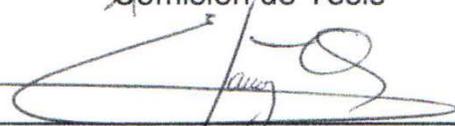
Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS
Director de Tesis



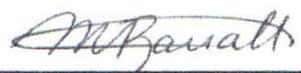
Dr. med. ORALIA BARBOZA QUINTANA
Co-Director de Tesis



Dr. MIGUEL JOSÉ YACAMÁN
Comisión de Tesis



Dr. C. EDUARDO JAVIER TAMEZ DE LA O
Comisión de Tesis



Dr. C. MARÍA TERESA ZANATTA CALDERÓN
Comisión de Tesis



Dr. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

A la Dr. *med.* Lourdes Garza Ocañas, por darme bases de investigación, además de su asesoría y apoyo, su presencia fue indispensable para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Miguel José Yacáman y a la Dr. *med.* Oralia Barboza Quintana, quienes brindaron material, conocimiento y trabajo desde sus respectivos departamentos.

Al Dr. C. Eduardo Javier Tamez de la O y a la Dr. C. María Teresa Zanatta Calderón, de quienes tuve el placer no solo contar con su apoyo académico y laboral, también agradezco haber contado (y espero seguir haciéndolo) con su amistad.

Al M.V.Z. Gilberto Arévalo Martínez, al Q.C.B. Arturo Longoria Garza y al Q.C.B. René García Martínez, quienes me asesoraron en las técnicas de manejo de animales de laboratorio, en el proceso y en la lectura de las muestras biológicas.

A Helda Sanchez, Armando Morales, Gabriel Torres, Mauricio Graciano, Gilberto Mendez, Lennon Saenz y Dulce Romero, por su apoyo en diferentes momentos cruciales en el desarrollo de este trabajo.

A todo el personal del Departamento de Farmacología y Toxicología, a mi familia y amigos, por su comprensión y solidaridad durante el desarrollo de este trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada (251551)

Al PAICYT por el apoyo recibido (Proyecto CS751-11)

DETERMINACIÓN DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA PLATA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN DOS MODELOS ANIMALES

Presentado por:

M.C.P. Jesús Triana Verástegui

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dr. med. Lourdes Garza Ocañas, con el apoyo del Servicio de Patología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el Departamento de Física y Astronomía de la Universidad de Texas en San Antonio.

Jesús Triana Verástegui

Fecha de graduación: Julio 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

DETERMINACIÓN DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA PLATA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN DOS MODELOS ANIMALES.

Número de páginas: 83

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

Área de estudio: Farmacología y Toxicología

Las nanopartículas de plata (NPP) han demostrado tener actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral, sus usos clínicos actuales incluyen impregnación de gasas, espumas vaginales y catéteres, por lo que realizar estudios preclínicos en modelos animales para establecer su cinética y posibles efectos tóxicos es prioritario. **Objetivo:** Determinar el perfil farmacocinético de la plata posterior a la administración de NPP en perros Beagle y evaluar su distribución en órganos, posible daño tisular y vías de eliminación en ratas. **Material y Métodos:** Para determinar los parámetros farmacocinéticos se utilizaron 4 perros Beagle machos adultos a los cuales se les administró 5mg/Kg de NPP vía IP en dosis única, posteriormente se les tomaron 19 muestras de sangre durante los 35 días del estudio y se determinó la concentración de plata por medio de espectrometría de absorción atómica. Los parámetros farmacocinéticos (ABC , $C_{máx}$, $T_{máx}$, $t_{1/2}$ y K_e) se determinaron con el paquete computacional WinNonlin versión 6.3 y SPSS versión 13. Para determinar la distribución de la plata en órganos se utilizaron 10 ratas Wistar hembras divididas en dos grupos: el grupo expuesto que recibió 10mg/Kg de NPP vía IP en dosis única y el grupo control que recibió agua destilada, los animales se sacrificaron a los 14 días para la extracción de sangre y órganos (hígado, riñón, bazo y cerebro), una parte de los órganos se utilizó para determinar la concentración de plata y la otra para análisis histopatológico por microscopía óptica. La determinación de la presencia de NPP se realizó por espectrometría de energía dispersiva por rayos X en muestras de hígado, riñón, bazo y cerebro de ratas (expuestas a NPP y control). Para determinar la excreción de plata, las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas individuales, se recolectaron muestras de orina y heces durante las 8 semanas del estudio y se cuantificó la concentración de plata. **Resultados:** Los parámetros farmacocinéticos obtenidos de las concentraciones séricas de plata de los perros expuestos a las NPP fueron: ABC de 22,931 $\mu\text{g}/\text{dL}/\text{h}$, $C_{máx}$, 291 μg , $T_{máx}$ de 6.5h, $t_{1/2}$ de 98.5h y una K_e de 0.0072/h. Se observó un fenómeno de redistribución de la plata a los 3 días posteriores a su administración. El órgano en el que se cuantificó la mayor concentración de plata fue el bazo. Se detectaron NPP en hígado, riñón y cerebro de ratas y en este último se observaron datos de daño neuronal. La principal vía de excreción de la plata en ratas fue la fecal. **Conclusiones y Contribuciones.** En el modelo de ratas se estableció que las NPP utilizadas en este estudio atravesaron la barrera hematoencefática y produjeron daño neuronal. El presente constituye el primer estudio de evaluación de los parámetros farmacocinéticos de la plata en perros Beagle después de la administración de nanopartículas de plata.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción a la nanotecnología	1
1.1.1 Nanociencia, nanotecnología y nanomateriales	1
1.1.2 Aplicaciones de la nanotecnología	2
1.2 Nanomedicina	3
1.2.1 Aplicaciones de la nanomedicina	4
1.3 Nanopartículas	4
1.3.1 Nanopartículas de utilidad clínica	5
1.3.2 Efecto de las nanopartículas sobre la salud	7
1.4 Nanopartículas de la plata	8
1.4.1 Producción de nanopartículas de plata	9
1.4.2 Actividad biológica de las nanopartículas de plata	11
1.4.3 Espectro antimicrobiano de las nanopartículas de plata	12
1.4.4 Estudios para el uso de las nanopartículas de plata en humanos	14
1.4.4.1 Tratamiento de heridas	15
1.4.4.2 Gel vaginal	16
1.4.4.3 Preservativo en cosméticos	16
1.4.4.4 Dispositivos médicos	16

1.4.4.5	Terapia contra el cáncer	18
1.4.5	Estudios de toxicidad de las nanopartículas de plata	19
1.5	Etapas para el desarrollo de medicamentos	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo general	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAL Y MÉTODOS	24
3.1	Material	24
3.1.1	Animales	24
3.1.2	Nanopartículas de plata	25
3.1.3	Material y equipo	25
3.1.4	Reactivos	26
3.2	Métodos	27
3.2.1	Determinación de presencia de plata en muestras de suero de perros	27
3.2.1.1	Exposición de los perros a nanopartículas de plata	27
3.2.1.2	Obtención de muestras	28
3.2.2	Evaluación de la distribución de plata en ratas	28
3.2.2.1	Exposición de las ratas a nanopartículas de plata	28
3.2.2.2	Obtención de muestras	29

3.2.2.3 Procesamiento de muestras para la evaluación del daño a órganos	29
3.2.3 Evaluación de la presencia de nanopartículas de plata en órganos de ratas	30
3.2.3.1 Exposición de las ratas a las nanopartículas de plata	30
3.2.3.2 Obtención de muestras	30
3.2.3.3 Procesamiento de muestras	31
3.2.4 Determinación de la presencia de plata en muestras de orina y heces en ratas	31
3.2.4.1 Exposición de las ratas a nanopartículas de plata	31
3.2.4.2 Obtención de muestras	32
3.2.5 Determinación de la concentración de plata por Espectrometría de Absorción Atómica	32
3.2.5.1 Preparación de la curva de calibración	33
3.2.5.2 Procesamiento de muestras para la determinación de plata	34
3.2.5.3 Lectura de muestras	34
3.2.5.4 Cálculo para determinar la concentración de plata	35
3.2.6 Procesamiento de los datos	35
3.2.6.1 Descripción de la metodología para el	

	cálculo de parámetros farmacocinéticos	35
4	RESULTADOS	37
	4.1 Evaluación de la cinética de plata en perros	37
	4.1.1 Determinación de plata en suero	37
	4.1.2 Parámetros farmacocinéticos	38
	4.1.3 Evaluación de los perros	40
	4.2 Evaluación de la cinética de plata en ratas	41
	4.2.1 Evaluación de la distribución de plata y nanopartículas de plata	41
	4.2.1.1 Concentración de plata en suero y órganos	42
	4.2.1.2 Evaluación de daño a órganos en ratas	44
	4.2.1.3 Determinación de la presencia de nanopartículas de plata en órganos	47
	4.2.2 Evaluación de la eliminación de plata y nanopartículas de plata	49
	4.2.2.1 Determinación de plata en muestras de orina y heces	49
	4.2.2.2 Evaluación de las ratas	52
5	DISCUSIÓN	53
6	CONCLUSIONES	64
	BIBLIOGRAFÍA	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Concentración sérica promedio de la plata de los perros en las primeras 24h y los 35 días posteriores a la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 5 mg/Kg vía IP	39
Figura 2. Concentración sérica de plata en ratas	42
Figura 3. Concentración sérica promedio de plata en ratas expuestas y ratas control	43
Figura 4. Concentración de plata en diferentes órganos en ratas expuestas y ratas control	44
Figura 5. Concentración promedio de plata en el bazo de ratas expuestas y ratas control	44
Figura 6. Microfotografía óptica de riñón de rata expuesta a nanopartículas de plata	45
Figura 7. Microfotografía óptica de hígado de rata expuesta a nanopartículas de plata	46
Figura 8. Microfotografía óptica de bazo de rata expuesta a nanopartículas de plata	46

Figura 9. Microfotografía óptica de cerebro de rata expuesta a nanopartículas de plata	46
Figura 10. Microfotografía electrónica del riñón	47
Figura 11. Microfotografía electrónica del hígado	48
Figura 12. Microfotografías electrónicas de cerebro	48
Figura 13. Microfotografía electrónica y gráfica de la espectrometría de energía dispersiva de rayos X	49
Figura 14. Excreción urinaria de plata en ratas posterior a la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 10 mg/Kg	50
Figura 15. Excreción promedio de plata en las heces de las ratas posterior a la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 10 mg/Kg	51

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características de las soluciones utilizadas en la curva de calibración	33
Tabla 2. Factor de transformación y límite inferior de cuantificación en la lectura de las muestras de heces y órganos	35
Tabla 3. Concentración sérica de plata en perros Beagle expuestos a nanopartículas de plata 5 mg/Kg vía IP	38
Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos de la plata en perros obtenidos de la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 5 mg/Kg vía IP a perros Beagle	39
Tabla 5. Resultados de laboratorio obtenidos antes de la administración de nanopartículas de plata y después de una semana y un mes de iniciado el estudio	41
Tabla 6. Concentraciones de plata en muestras de orina de ratas expuestas a nanopartículas de plata a una dosis de 10 mg/Kg y el grupo control	50
Tabla 7. Excreción de plata en las heces de las ratas, posterior a la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 10 mg/Kg	51

NOMENCLATURA

ABC	Área Bajo la Curva
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración máxima
DE	Desviación Estándar
dL	Decilitro
g	Gramo
h	Hora
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
K_e	Constante de eliminación
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
ppm	Partes por millón
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido
nm	Nanómetro
spp	Especie
$T_{m\acute{a}x}$	Tiempo máximo
$t_{1/2}$	Vida media
°C	Grados Celsius
μg	Microgramo
μL	microlitro

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a la nanotecnología

1.1.1 Nanociencia, nanotecnología y nanomateriales

La historia de la nanotecnología data desde diciembre de 1959 cuando el médico Richard Feynman mencionó durante una conferencia que podría ser posible construir maquinas pequeñas para manufacturar objetos con precisión atómica ⁽¹⁾. Posteriormente, en 1974, Norio Taniguchi utilizó por primera vez la palabra “nanotecnología”, como parte de una tecnología de producción de dimensiones ultrafinas ⁽²⁾. En 1986, Eric Drexler presentó el concepto de la fabricación molecular, despertando el interés científico en el potencial de la nanotecnología ⁽³⁾. Poco después fueron descubiertas las nanopartículas de carbono, conocidas como fullerenos ⁽⁴⁾. A principios de los años 90, la nanotecnología avanza rápidamente.

La nanociencia se define como el estudio de la manipulación de los materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren significativamente de aquellas de mayor escala ⁽⁵⁾.

La nanotecnología se define como el arte y la ciencia de manipular la materia a escala atómica o molecular y su objetivo es proporcionar una mejora significativa en las tecnologías de producción de materiales.

La Agencia de Protección al Medio Ambiente (Estados Unidos) usa la definición de nanotecnología desarrollada por la Iniciativa Nacional de Nanotecnología, que involucra los siguientes conceptos: investigar y desarrollar tecnología a nivel atómica, molecular o macromolecular a una longitud de aproximadamente 1-100 nanómetros, creando y usando estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones nuevas como resultado de su tamaño pequeño y/o intermedio, así como la capacidad de controlar y manipular los materiales a escala atómica ⁽⁶⁾.

Nanomaterial se define como una serie de sustancias donde el rango en una dimensión es menor que 100 nanómetros. Son de interés porque a esas escalas surgen diferentes propiedades como las ópticas, magnéticas, eléctricas, etc. La aplicación de estas propiedades tiene un potencial de gran impacto en la electrónica, medicina y otros campos de la industria ⁽⁷⁾.

1.1.2 Aplicación de la nanotecnología

En un futuro la nanotecnología podría aplicarse en sistemas médicos por ejemplo para mejorar la compatibilidad de los tejidos implantados formando andamios en tejidos de regeneración o incluso para construir órganos artificiales, también podría participar en nuevos tipos de terapias génicas y tratamientos antioxidantes.

Actualmente la nanotecnología es utilizada por compañías y empresas de investigación en el desarrollo de una variedad de técnicas y aplicaciones

innovadoras, como por ejemplo el uso de zeolitas como catalizador para romper o debilitar grandes moléculas de hidrocarburo durante la generación de gasolina.

A nivel industrial la nanotecnología se utiliza para la creación de nanotubos de carbono, usados en procesos de manufactura; en nanocristales para producir cerámica resistente, bloqueadores solares y catalizadores ⁽⁶⁾.

1.2 Nanomedicina

La nanomedicina se define como la aplicación de la nanotecnología a la medicina para preservar y mejorar la salud usando nanomateriales y el conocimiento molecular del cuerpo humano ⁽⁸⁾.

Las herramientas y técnicas basadas en la nanotecnología están emergiendo rápidamente en los campos de la imagen médica y la distribución del fármaco al sitio específico de acción, estos avances tienen como fin el concepto de la medicina personalizada y el potencial para el diagnóstico temprano unido a una terapia dirigida altamente efectiva ⁽⁹⁾. Esta tecnología avanzará en los próximos años, de tal forma que podrán ser fabricados nanodispositivos complejos y hasta nanorobots ⁽⁸⁾, incluso podría ser posible realizar implantes de células y tejidos literalmente “construidos” ⁽¹⁰⁾.

1.2.1 Aplicaciones de la nanomedicina

En el diagnóstico de imagen se ofrece el potencial de ir de un abordaje “genérico” a uno individualizado para lograr mayor eficacia, esto se traduce en reconocimiento temprano de enfermedades y la estadificación de la gravedad o su desarrollo de manera poco invasiva ⁽⁹⁾.

En la liberación controlada de fármacos, la finalidad de los medicamentos que han sido formulados (o reformulados) en estructuras nanométricas es manipular la farmacodinamia, la biodistribución y finalmente su efectividad ⁽⁹⁾.

La nanoterapéutica dirigida al sitio blanco, tiene como meta el diseñar agentes-dispositivo que circulen dentro del cuerpo para liberar el fármaco únicamente en sitios identificados, con efectos indeseados mínimos en otros sitios, adicionalmente podrán emitir “reportes de actividad” a través de señales no invasivas para dar confirmación y predicciones de eficacia ⁽⁹⁾.

1.3 Nanopartículas

Se define como nanopartícula aquélla que posee un tamaño que oscila entre 1 a 100nm. Las nanopartículas metálicas poseen diferentes propiedades físicas y químicas ⁽¹¹⁾, las cuales se relacionan directamente a las interacciones con el material que las recubre ⁽¹²⁾, ya que se ha encontrado que existe diferencia en el tiempo de permanencia plasmática cuando se han utilizado diferentes cubiertas, esto debido a sus diferentes patrones de adsorción a

proteínas y su subsecuente reconocimiento por los órganos del sistema retículo endotelial ⁽¹³⁾.

1.3.1 Nanopartículas con utilidad clínica

Las características biocinéticas de las nanopartículas son atractivas en la medicina, aplicándose en la liberación de fármacos en tejidos donde es difícil alcanzar concentraciones terapéuticas (sistema nervioso central), en la lucha contra el cáncer, en nanosensores intravasculares, dispositivos nanorobóticos y en procedimientos de diagnóstico e imagen ⁽¹⁴⁾.

La nanotecnología se ha utilizado con éxito en el diagnóstico por imagen incluyendo la óptica, nuclear, ultrasonido, tomografía computarizada y resonancia magnética nuclear ⁽⁹⁾. Una de las aplicaciones tempranas en la imagen por resonancia magnética fue el uso de partículas paramagnéticas de óxido de hierro, que pueden ayudar a distinguir entre las células hepáticas normales y las cancerosas, también se han utilizado para realzar nódulos linfáticos metastásicos en pacientes con cáncer de próstata ^(9,15). Más recientemente otros materiales nanométricos han pasado de aplicaciones *in vitro* a aplicaciones *in vivo*, unidos a algunos biomarcadores, por ejemplo, al receptor de folatos sobreexpresado en las células cancerosas y al receptor del factor de crecimiento en tumores y en vasos ateroscleróticos ⁽⁹⁾.

Para la liberación controlada de medicamentos los liposomas son utilizados como acarreadores de medicamentos y antígenos, provienen de

lípidos biológicos que forman vesículas cerradas con un núcleo acuoso ⁽¹⁶⁾. Existen versiones liposomales de fármacos con aplicaciones cosmetológicas y dermatológicas, también existen agentes quimioterapéuticos (como la doxorubicina) envueltos en liposomas. Otra técnica común usada para incrementar la vida media de circulación es alterar la formulación química de los fármacos formando nanopartículas con la adición de polietilenglicol, de hecho, estos son los primeros agentes nanoterapéuticos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Estados Unidos). Los avances en nanotecnología de polímeros han contribuido a técnicas como las membranas de nanoporos implantables, los biochips de liberación controlada y los sistemas de microaguja transdérmica ⁽⁹⁾.

La nanotecnología en el cáncer es un área de investigación multidisciplinaria en la que se unen la ciencia, la ingeniería y la medicina, aportando cada una de ellas, nuevas aplicaciones en la imagen y el diagnóstico molecular. Utilizadas como terapia en el tratamiento del cáncer, las nanopartículas coloidales de hierro y oro poseen propiedades ópticas, magnéticas y físicas únicas ⁽¹⁵⁾. Otro ejemplo es la eficacia terapéutica de la dendrímero Di-s-G5-doxorrubicina *in vivo* en las células de cáncer de cerebro, debida a la mejor penetración de doxorubicina a través de la barrera sangretumoral y a su acumulación en altas concentraciones dentro de los núcleos celulares ⁽¹⁵⁾. La terapia fotodinámica ha emergido como una modalidad alternativa para el tratamiento del cáncer, mediante el daño oxidativo por medio de vías redox sensibles, desencadenando la muerte celular. Un ejemplo de un

sistema óptimo, tanto para imagen diagnóstica como para la terapia fotodinámica es el constituido por las nanopartículas de calcio fosfosilicato ⁽¹⁷⁾.

La nanotecnología ha representado un avance en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer, mejorando la sensibilidad y la especificidad de la imagen, tanto por resonancia magnética como por la tomografía de emisión de positrones gracias a agentes contrastantes que pueden detectar varias señales de la enfermedad, como placas amiloides y redes neurofibrilares.

La nanotecnología permitiría la entrada selectiva de nuevos compuestos terapéuticos que se están desarrollando para el tratamiento del Alzheimer, mejorando su eficacia y reduciendo su toxicidad sistémica ⁽¹⁵⁾.

Las nanopartículas de óxido nítrico han presentado un amplio espectro antibacteriano *in vitro*, mientras que *in vivo* se ha mostrado su actividad en modelos de abscesos dérmicos ⁽¹⁸⁾. La actividad antibacteriana de los metales nanocrystalinos es mayor que la de los iones metálicos comunes ⁽¹⁵⁾.

1.3.2 Efectos de las nanopartículas sobre la salud

La producción industrial de la nanotecnología se ha convertido en una fuente de exposición humana a nanopartículas por diferentes rutas: inhalación, ingestión, cutánea e intravenosa, para evaluar los riesgos es necesario comprender el comportamiento de las nanopartículas, si bien la evaluación/manejo del riesgo de los químicos convencionales está bien

establecida, la evaluación del riesgo de la nanotecnología es un campo emergente ⁽¹⁴⁾.

Existe un incremento en la literatura científica que expone los riesgos potenciales de las nanopartículas, que incluyen: exposición y evaluación de las vías de entrada al organismo (exposiciones ambientales y ocupacionales, crónicas y agudas), relación dosis-respuesta y toxicidad (efectos en órganos como bazo, hígado, riñón, tracto respiratorio y sistema inmune), bioacumulación y biomagnificación y los efectos sobre humanos a nivel macro y micromolecular ⁽¹⁴⁾.

La mayoría de las investigaciones sobre toxicidad de las nanopartículas *in vivo* se han realizado en animales mamíferos, expuestos por vía respiratoria a partículas ultrafinas transportadas por el ambiente, que demuestran efectos significativos en la salud, por ejemplo el daño registrado en los macrófagos alveolares secundario al estrés oxidativo, unido a una respuesta apoptótica. Otras vías de exposición como dérmica y oral son consideradas entradas potenciales al organismo ⁽¹⁴⁾.

1.4 Nanopartículas de plata

La plata cuando es usada como antiséptico en concentraciones apropiadas, es relativamente inerte y se absorbe muy poco por las células de los mamíferos o bacterianas, sin embargo, en la presencia de secreciones se ioniza haciéndose altamente reactiva, para unirse a proteínas y membranas

celulares, controlando así el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias. El uso de las sales de plata como antiséptico inició en los años sesenta, el nitrato de plata al 0.5% fue la solución estándar en la terapia tópica de quemaduras, actualmente el estándar de oro es la sulfadiazina argéntica, introducida por Fox en los años setenta ⁽¹⁹⁾.

Las nanopartículas de plata, además de ser usadas en dispositivos médicos de uso crónico, son incorporadas en calzado, ropa de cama, pinturas, vendajes para heridas, electrodomésticos, cosméticos y plásticos ⁽²⁰⁾. Si bien ya existen en el mercado productos que contienen nanopartículas de plata, su liberación y destino final en el medio ambiente a través del ciclo de la vida es un área de investigación de creciente interés ⁽²¹⁾. Se han probado nanopartículas fabricadas con otros metales, sin embargo las nanopartículas de plata han mostrado resultados más prometedores ⁽²²⁾.

1.4.1 Producción de nanopartículas de plata

Desde la antigüedad se conocen dos abordajes para la preparación de partículas ultrafinas, el método de descomposición de un sólido a partículas más pequeñas y el método de construcción que produce nanopartículas empezando desde los átomos, hasta la formación de moléculas más grandes ⁽¹¹⁾. Los procesos físico-químicos son los más importantes ⁽²³⁾, los microorganismos, tales como bacterias, levaduras y hongos han sido

ampliamente utilizados para la biosíntesis rápida y ecológica de nanopartículas metálicas ⁽²⁴⁾.

Con respecto a la síntesis de nanopartículas metálicas los factores que controlan su tamaño y forma siguen siendo un área de interés significativo ⁽²⁵⁾, en general, las nanopartículas de plata requieren recubrimiento porque pueden sufrir fácilmente agregación, por lo que se buscan materiales inertes y biocompatibles para recubrirlas ⁽²⁶⁾ o que puedan mejorar la permeabilidad transmembrana ⁽²⁷⁾, estos materiales pueden desempeñar a su vez el papel de agente reductor ⁽²⁸⁾.

Existen diversos métodos físicos descritos para la obtención de nanopartículas ^(29,30,31). Se puede realizar la síntesis química asistida por métodos físicos para aumentar la velocidad de producción ^(28,32).

En cuanto a los métodos químicos existen diversos métodos de producción que emplean diferentes agentes reductores ^(16,26,30,33,34,35,36,37,38), entre el que se encuentra el método de reducción del nitrato de plata por medio del borohidruro de sodio ⁽³⁹⁾. También se considera la producción de hidrogeles y biocapas ^(27,40,41,42). Se ha utilizado un método enzimático *in vitro* para la síntesis de nanopartículas de plata usando nitrato reductasa dependiente de NADPH ⁽⁴³⁾.

El método para la síntesis de nanopartículas de plata utilizando microorganismos es un proceso lento ^(23,44,45), se ha reportado que la síntesis por bacterias puede ser intracelular o extracelular ^(23,46), utilizado cocos y bacilos tanto grampositivos como gramnegativos, ^(23,46,47,48), produciendo

nanopartículas con y sin cubierta ^(47,49), estos ensayos han sido apoyados en métodos fisicoquímicos para control del tamaño de partícula o para acelerar la velocidad de producción ^(44,46).

En hongos también se ha descrito la síntesis de nanopartículas de plata intracelular ⁽²³⁾ y extracelular ⁽⁴⁶⁾, utilizando múltiples cepas ^(23,24,48,49,50,51,52), con la ventaja de que son más fáciles de cultivar que las bacterias, proporcionando viabilidad económica.

La síntesis de nanopartículas por medio de plantas no está del todo entendida ⁽⁵³⁾, y se tiene poco control en el tamaño de las nanopartículas producidas ⁽⁵⁴⁾. Sin embargo, se consideran métodos de producción son amigables al medio ambiente con tasas de síntesis comparables o más rápidas a los métodos químicos ⁽⁵⁴⁾, sobre otros procesos de producción biológicos el uso de plantas pueden ser ventajoso al eliminar el proceso de mantener cultivos celulares ⁽⁵³⁾. Se han realizado estudios de producción de nanopartículas con extractos de diversas plantas ^(53,54,56,57,58), o con sus raíces ⁽⁵⁹⁾.

1.4.2 Actividad biológica de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata poseen una gran actividad contra un amplio rango de patógenos: bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos, virus, protozoarios así como a microorganismos resistentes a múltiples fármacos ⁽⁶⁰⁾. Su efectividad depende de las propiedades de la partícula como el tamaño,

forma, tiempo de exposición y el tipo de compuestos. A menor tamaño, mayor área de superficie reactiva, esto explica porque las nanopartículas exhiben mayor actividad biológica que partículas de mayor tamaño ⁽¹⁴⁾, el uso de nanopartículas de plata parece haber aumentado la eficacia antibacteriana de la plata pero no la toxicidad celular ⁽⁶⁰⁾. En teoría la actividad antibacteriana se debe a los siguientes mecanismos de acción: interacción con la membrana y la pared celular, interacciones con aminoácidos y enzimas, obstrucción en el reclutamiento de energía, interacciones con el ADN y ARN y generación de especies reactivas de oxígeno ⁽⁶⁰⁾. La oxidación catalítica de las nanopartículas en iones de plata contribuye a su efecto bactericida ^(61,62).

Aunque existe la posibilidad de resistencia de las bacterias a la plata ⁽⁶¹⁾, es poco probable que los microorganismos patógenos la desarrollen porque el metal ataca a una amplia gama de blancos en los microorganismos, lo que significa que tendrían que desarrollarse una serie de mutaciones simultáneas en la bacteria para quedar protegida ⁽⁶⁰⁾.

Además de los efectos antimicrobianos recientemente se ha demostrado que las nanopartículas de plata tienen efectos antiinflamatorios ⁽⁶³⁾, resultando en una mejora en el proceso de curación de las heridas ^(64,65).

1.4.3 Espectro antimicrobiano de las nanopartículas de plata

Para evaluar la capacidad para destruir microorganismos de manera cualitativa se utiliza la prueba de difusión mediante discos, membranas o pozos

en agar ⁽⁶⁰⁾, también puede evaluarse de manera cuantitativa mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias ⁽³⁸⁾.

Se han realizado estudios que evalúan la efectividad de las nanopartículas de plata *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoneae* y *Bacillus spp* ^(37,38,41,42,47,48,56,57,66,67,68,69,70,71). La actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata ha sido evaluada con menor frecuencia en otras bacterias como *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Vibro cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium bovis* ^(22,38,47,48,70).

La actividad antimicótica de las nanopartículas de plata ha sido evaluada contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium italicum*, *Phoma glomerata*, *Phoma herbarum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma spp*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Curvularia lunata*, *Rhizopus arrhizus* y el fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides* ^(22,30,48,49,51,57,72).

Las nanopartículas metálicas, especialmente las producidas con plata, han mostrado actividad contra un amplio espectro de virus, se ha podido demostrar una interacción directa entre las nanopartículas y las proteínas de superficie de los virus, los estudios han mostrado que pueden ser efectivos contra el HIV-1, hepatitis B, virus sincitial respiratorio, herpes simple tipo 1, influenza y tacaribe ⁽⁷³⁾. En diversos estudios de actividad de las nanopartículas de plata contra el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), se ha demostrado

que las nanopartículas de plata experimentan una interacción dependiente del tamaño (1-10nm) con los residuos sulfuro de las glicoproteínas gp120 del HIV-1 inhibiendo la infectividad ⁽¹²⁾, en otro estudio se muestra la inhibición de la replicación viral *in vitro* en cultivos de células mononucleares de sangre periférica recién infectadas ⁽³¹⁾, además se demostró que la adición de nanopartículas de plata aumenta la potencia neutralizadora de los anticuerpos *in vitro* en la trasmisión del HIV-1 ⁽⁷⁴⁾.

1.4.4 Estudios para el uso de las nanopartículas de plata en humanos

La plata ha sido conocida por su actividad antibacteriana desde hace mucho tiempo ⁽⁶⁰⁾. En forma de nitrato ha sido ampliamente usada como agente cauterizante en pacientes con estomatitis aftosa, epistaxis, para detener hemorragias de cérvix y para prevenir la oftalmopatía gonocócica neonatal. La sulfadiazina argéntica ha sido usada como tratamiento tópico de heridas por quemaduras ⁽⁷⁵⁾, las sales de plata también han sido utilizadas en sífilis y gonorrea ⁽⁷⁶⁾.

El desarrollo de la nanotecnología ha abierto una gama de posibilidades del uso de las nanopartículas de plata como un factor biomédico activo ⁽⁶⁰⁾, uno de los más recientes son sus propiedades contra el cáncer en humanos ⁽⁷⁷⁾.

1.4.4.1 Tratamiento de heridas

Las propiedades antimicrobianas ⁽⁶³⁾, antiinflamatorias ⁽⁷⁵⁾ y la disminución subsecuente en la infiltración de linfocitos y mastocitos ⁽⁷⁸⁾, de las nanopartículas de plata pueden ser importantes en la prevención de la formación de las cicatrices durante la reparación de las heridas ⁽⁷⁵⁾. También se ha descrito que las nanopartículas de plata poseen propiedades angiogénicas ⁽⁵³⁾.

Existen diversos estudios dirigidos a evaluar el uso clínico de las nanopartículas de plata.

Larese y colaboradores evaluaron la penetración de las nanopartículas de plata en piel humana intacta y dañada *in vitro*, demostrando un incremento en la permeabilidad en la piel dañada a las nanopartículas de plata ⁽⁷⁹⁾. Kwan y colaboradores demostraron que las nanopartículas de plata mejoraron las propiedades de tensión y llevaron a una alineación fibrilar mejor en la piel reparada *in vivo* ⁽⁶⁴⁾.

Aramwit y colaboradores en un estudio realizado con vendajes con diferentes preparaciones de plata demostraron que los vendajes que contenían nanopartículas de plata tenían mayor efecto antibacteriano ⁽⁸⁰⁾. En otro estudio Tian y colaboradores evaluaron vendajes con nanopartículas de plata contra vendajes con sulfadiazina argéntica y gazas con dos concentraciones diferentes de amoxicilina y metronidazol en ratones sanos y diabéticos con quemaduras y demostraron que la curación de heridas se acelera con las

nanopartículas de plata, sin crecimiento bacteriano. Además en los ratones diabéticos se aceleró la curación de las heridas.

1.4.4.2 Gel vaginal

Las nanopartículas de plata cubiertas con polivinilpirrolidona son candidatas para ser un medicamento para prevenir la transmisión de la infección por virus HIV-1 ⁽⁷³⁾. Galdiero y colaboradores demostraron que las nanopartículas de plata actúan inhibiendo la transmisión del HIV-1 y ofrecen una protección de la infección al tejido cervicouterino humano ⁽⁷⁵⁾.

1.4.4.3 Preservativo en cosméticos

Los estudios realizado por Kokura y colaboradores demostraron que las nanopartículas de plata no tienen ningún efecto en los queratinocitos y no aumentaron la muerte celular inducida por radiación ultravioleta, no penetraron la piel humana normal y mostraron ser muy estables y tener suficiente eficacia preservativa contra mezclas de bacterias y hongos, en un estudio realizado *in vitro* ⁽⁸¹⁾.

1.4.4.4 Dispositivos médicos

Las nanopartículas de plata son utilizadas en cubiertas antibacterianas de dispositivos médicos con el fin de reducir el porcentaje de infecciones nosocomiales ⁽⁶³⁾, las técnicas de impregnación de plata en polímeros prometen crear biomateriales realmente antimicrobianos ⁽⁸²⁾, en la actualidad los

catéteres venosos centrales impregnados con nanopartículas de plata han demostrado reducir las infecciones nosocomiales, así se han desarrollado los catéteres intraventriculares impregnados para reducir las infecciones de líquido cefalorraquídeo ⁽⁸³⁾.

Roe y colaboradores demostraron que catéteres con una capa de nanopartículas de plata en la superficie, mostraron una actividad antimicrobiana significativa *in vitro* y previnieron la formación de biocapas de diferentes bacterias y *Candida albicans* ⁽²⁰⁾.

Antonelli y colaboradores reportan que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el uso de catéteres impregnados con nanopartículas de plata y sin impregnación en diferentes parámetros evaluados como la colonización del catéter, la incidencia de infecciones relacionadas al torrente sanguíneo, días libres de infección o mortalidad ⁽⁸⁴⁾.

Galiano y colaboradores examinaron la liberación de iones de plata y el crecimiento bacteriano *in vitro*, en catéteres irrigados con líquido cefalorraquídeo, demostrando que no había presencia de plata en las bacterias y que se presentó una ligera disminución en el crecimiento bacteriano en los catéteres impregnados de plata ⁽⁸³⁾.

Secinti y colaboradores realizaron un estudio en el que insertaron tornillos de titanio con o sin cubierta de plata contaminados con bacterias en conejos demostrando que los tornillos con cobertura de nanopartículas de plata son tan seguros como los tornillos de titanio sin cubierta y que pueden ayudar en prevenir la formación de biocapas e infección ⁽⁸⁵⁾.

Chaloupka reporta que existe evidencia de que nanopartículas de plata como aditivo antibacteriano al cemento óseo polimetilmetaacrilato muestran una actividad antibacteriana impresionante con baja toxicidad ⁽⁶³⁾.

1.4.4.5 Terapia contra el cáncer

Se han presentado diversos estudios *in vitro* que sugieren que las nanopartículas de plata poseen actividad antitumoral.

AshaRani y colaboradores sugieren que las células cancerosas tratadas con nanopartículas de plata son más susceptibles al daño, mostrando inestabilidad cromosómica y arresto mitótico en fibroblastos pulmonares humanos y células de glioblastoma humano U251 ⁽⁸⁶⁾.

Satyavani y colaboradores demostraron que las nanopartículas de plata fueron capaces de reducir la viabilidad de las células de carcinoma laríngeo epidermoide humano de una forma dosis-dependiente ⁽⁵³⁾.

Gurunathan y colaboradores encontraron que las nanopartículas de plata inhiben el crecimiento y son citotóxicas en una manera dosis dependiente y eventualmente llevan a las células a la fragmentación nuclear ^(50,77).

Rutberg y colaboradores en un estudio realizado en ratas con linfosarcoma reportaron una reducción significativa del tumor en el grupo tratado con nanopartículas de óxido de plata, postulando la teoría del efecto citostático es resultado de la interacción fisicoquímica de la plata con los grupos funcionales de las proteínas intracelulares, así como con las bases

nitrogenadas de los grupos fosfato del ADN, llevando a la estabilización de la estructura molecular del ADN en las células tumorales ⁽²⁹⁾.

1.4.5 Estudios de toxicidad de las nanopartículas de plata

La exposición crónica a la plata causa efectos adversos conocidos como argiria y argiriosis, además puede producir efectos tóxicos como daño hepático y renal, irritación de los ojos, piel, tracto respiratorio e intestinal y cambios en las células sanguíneas. La plata causa cambios de la permeabilidad de la membrana celular hacia las concentraciones de potasio y sodio independientemente de la actividad de la bomba sodio-potasio adenintrifosfatasa o de la función mitocondrial ⁽⁷⁶⁾.

Se debe considerar la toxicidad potencial de nanopartículas metálicas antes de su uso, es imperativo realizar estudios para conocer su cinética de distribución y su posible acumulación en sistemas vivos ⁽⁷³⁾. Evaluar la biodistribución de nanopartículas metálicas en modelos animales es fundamental para que el desarrollo de las aplicaciones terapéuticas potenciales sea seguro ⁽³⁹⁾.

Las nanopartículas como las de plata pueden causar efectos tóxicos relacionados con la activación celular, la producción de especies reactivas de oxígeno, la cuales son más tóxicas para el tejido, inflamación y finalmente todos estos procesos conducen a la muerte celular. El sistema respiratorio es la

principal puerta de entrada de las nanopartículas, la irritación directa del tracto respiratorio es otro ejemplo de efecto tóxico.

Las nanopartículas ultrafinas de plata elemental inhaladas de manera crónica tienden a distribuirse en pulmón y cerebro, causando efectos tóxicos en el sistema nervioso central y en el sistema reproductor masculino ⁽⁷⁶⁾.

Los estudios en animales expuestos por vía oral a nanopartículas de plata son escasos ^(87,88). Sardari y colaboradores demostraron que la presencia de daños tisulares fue dosis-dependiente con daño severo en diferentes órganos ⁽⁸⁹⁾. Małaczewska y colaboradores demostraron efectos perjudiciales importantes en sistema inmunológico en organismos sanos como en aquéllos con estímulos de procesos infecciosos *in vivo* ^(90,91).

Sung y colaboradores reportaron diferencias en los parámetros de la función pulmonar, independientemente de la dosis administrada en estudios de toxicidad aguda por vía respiratoria ⁽⁹²⁾. Los mismos autores demostraron que las concentraciones de las nanopartículas de plata fueron más elevadas en el bulbo olfatorio que en el cerebro, en pulmón los resultados mostraron datos de inflamación ⁽⁹³⁾.

También se han reportado datos de toxicidad posterior a la administración parenteral de nanopartículas de plata. En un estudio realizado por De Jong y colaboradores con administración intravenosa de nanopartículas de plata se observaron datos indicativos de daño hepático, además de alteraciones en la biometría hemática y en los niveles séricos de inmunoglobulinas M y E ⁽⁹⁴⁾.

Tang y colaboradores encontraron discretas cantidades de las nanopartículas en diferentes órganos así como en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica al ser aplicadas por vía subcutánea ⁽⁹⁵⁾.

En estudios *in vitro* se han estudiado los efectos perjudiciales de las nanopartículas de plata sobre la proliferación celular y la función de las proteínas, a las que se les ha atribuido efecto pro-inflamatorio, esta actividad tóxica es iniciada por la generación de radicales libres de oxígeno culminando en un incremento en la transcripción de citocinas pro-inflamatorias y apoptosis. Además, se sugiere que las nanopartículas de plata poseen actividad anticoagulante, repercutiendo en el tiempo de protrombina y de tromboplastina parcial ⁽⁹⁶⁾. Existen pocos estudios de genotoxicidad de las nanopartículas de plata ⁽⁹⁷⁾.

1.5 Etapas para el desarrollo de medicamentos

En el desarrollo de nuevos fármacos y productos biológicos terapéuticos, se lleva a cabo un proceso de investigación largo y complejo que involucra grandes costos. Una vez identificada una molécula con potencial terapéutico se le realizan los estudios pre-clínicos en animales y modelos fisiológicos en el laboratorio, analizando las propiedades físico-químicas y el comportamiento del compuesto *in vivo* e *in vitro*. Se evalúan una serie de parámetros de la molécula, entre ellos: sus niveles plasmáticos, tisulares y propiedades farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo y eliminación), además

se deben de realizar estudios de toxicidad aguda y crónica estudios sobre el efecto en la reproducción y en su progenie ⁽⁹⁸⁾.

Los estudios preclínicos constituyen una etapa indispensable dentro de las fases de investigación de una nueva molécula con potencial terapéutico, ya que permite el establecimiento de sus parámetros farmacocinéticos.

La biodisponibilidad representa la proporción de una sustancia que se absorbe a la circulación sanguínea sistémica y el tiempo que se requiere para hacerlo. El área bajo la curva (ABC) es el parámetro más importante de la biodisponibilidad, representa la cantidad total de la sustancia absorbida. Otros parámetros que se evalúan durante un estudio farmacocinético son la concentración máxima ($C_{máx}$) obtenida y el tiempo en que se alcanza la concentración máxima ($T_{máx}$), los que están directamente relacionados con la velocidad de absorción. Los parámetros que evalúan la depuración sanguínea son la constante de eliminación (K_e) que representa la fracción de la dosis que se elimina por hora y la vida media ($t_{1/2}$) que es el tiempo que se requiere para que la concentración sanguínea de una sustancia disminuya a la mitad.

En la fase preclínica de la molécula en estudio también se evalúa su distribución en modelos animales y su posible depósito en algún órgano en particular, así como su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

Los estudios preclínicos duran un promedio de 3.5 años para un compuesto, posterior a estos estudios se realizan los estudios clínicos.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Determinar el perfil farmacocinético de plata posterior a la administración de nanopartículas de plata en dos modelos animales.

2.2 Objetivos específicos.

- 1.- Determinar los parámetros farmacocinéticos área bajo la curva (ABC), concentración máxima ($C_{máx}$), tiempo de concentración máxima ($T_{máx}$), vida media sérica ($t_{1/2}$) y constante de eliminación (K_e) de la plata.
- 2.- Determinar la distribución de la plata y la presencia de las nanopartículas de plata en sangre y órganos de ratas Wistar y su posible toxicidad.
- 3.- Determinar la excreción urinaria y fecal de plata en ratas Wistar.

CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animales

Los animales utilizados fueron obtenidos del bioterio del departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para el estudio farmacocinético se utilizaron perros de la raza Beagle machos adultos entre 8.5-13.5Kg de peso, los cuales fueron colocados 5 días antes del inicio del estudio en unidades separadas para su aclimatación, bajo condiciones estándar de laboratorio: ciclo luz-oscuridad de 12h, temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, con alimento y agua *ad libitum*.

Para los estudios de distribución y toxicidad se utilizaron ratas Wistar hembras de 8 - 10 semanas, nulíparas, con un peso promedio de $200\pm 20\text{g}$. Antes de iniciar para los estudios de distribución las ratas fueron colocadas durante 5 días en jaulas de acrílico con tapa-rejilla metálica para su aclimatación, bajo condiciones estándar de laboratorio: ciclo luz-oscuridad de 12 h, temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, alimento y agua *ad libitum*.

Para los estudios de excreción las ratas se colocaron en jaulas metabólicas bajo las mismas condiciones, el alimento fue previamente molido y pesado.

3.1.2 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata de 10-40nm de diámetro fueron proporcionadas por el Departamento de Física de la Universidad de Texas en San Antonio, Estados Unidos. Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas en atmosfera de aire reducida a partir de nitrato de plata (AgNO_3 ; Aldrich) 2M, como agente reductor se utilizó una solución de borohidruro de sodio (NaBH_4 99%; Aldrich) ⁽³⁹⁾.

3.1.3 Material y equipo

Balanza Mettler Toledo PB 3001

Balanza CRT Global modelo CWS-6H

Copa de poliestireno para automuestreador 2mL

Desionizador de agua Millipore

Equipo para disección quirúrgica

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer 5100

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Varian Spectra A 800W

Formaldehído 10% amortiguado (fosfato sódico monobásico 0.4%, fosfato sódico dibásico 0.65%)

Frascos de plástico de 100mL

Frascos estériles de plástico de boca ancha 90mL

Frascos de plástico 20mL

Horno de microondas MDS-2000

Lámpara de Ag de cátodo hueco Photron serie HDJ0075

Matraces volumétricos de 10mL

Microscopio de luz

Microscopio electrónico de barrido

Microscopio electrónico de transmisión

Microtomo

Pentobarbital sódico inyectable Sigma

Pipetas automáticas y puntillas 10-100 y 100-1000µL Eppendorf

Tubos vacutainer 13X100 Becton Dickinson

Tubos de grafito pirolítico

Vasos de plástico para automuestreador

Vasos liner de teflón con camisa

3.1.4 Reactivos

Acetato de uranilo

Acetona

Ácido clorhídrico

Ácido nítrico

Ácido pícrico

Agua bidestilada

Agua ultrapura

Argón

Azul de toluidina

Borato de sodio

Citrato de plomo

Estándar de paladio (Pd 1000ppm)

Estándar de plata (Ag 1000ppm)

Extrán MA-02 neutro concentrado Merck

Hidróxido de sodio

Nitrato de uranilo

Resinas epóxicas

Solución modificadora para plata (Tritón X-100 5%, ácido nítrico 0.2%, ácido ascórbico 1%, paladio 10ppm, fosfato de amonio 0.2%)

Tetraóxido de osmio

3.2 Métodos

3.2.1 Determinación de presencia de plata en muestras de suero de perros

3.2.1.1 Exposición de los perros a nanopartículas de plata

Se seleccionaron 5 perros los cuales fueron pesados, marcados y colocados en las unidades de experimentación 5 días antes del inicio del estudio para su aclimatación, se les realizó examen físico y toma de muestras de sangre para realizar estudios de biometría hemática y perfil bioquímico.

A los perros se les administró una solución de nanopartículas de plata a una dosis única de 5mg/Kg de peso corporal por vía intraperitoneal.

Los perros permanecieron en las unidades de experimentación durante los 35 días que duró el estudio, como parte de las medidas de monitorización se les realizó examen físico y estudios de laboratorio a la semana y al mes de la administración de las nanopartículas. Una vez concluido el estudio los perros se mantuvieron en el bioterio.

3.2.1.2 Obtención de muestras

Para la determinación de las concentraciones de plata se tomaron aproximadamente 3mL de sangre de las venas radiales y safenas en los tiempos programados: tiempo 0 (previo a la administración), 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 h y en los días 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 28 y 35. Las muestras fueron colectadas en tubos de 6mL sin anticoagulante, centrifugadas a 3,000rpm durante 5 minutos, el suero fue colectado en tubos Eppendorf de 2mL y almacenado a 4°C hasta su procesamiento.

3.2.2 Evaluación de la distribución de plata en ratas

3.2.2.1 Exposición de las ratas a nanopartículas de plata

Para evaluar la distribución de plata se utilizaron 10 ratas hembras, las cuales fueron pesadas, marcadas y separadas en dos grupos, el grupo de exposición con 6 ratas a las que se les administró una solución de nanopartículas de plata a una dosis única de 10mg/Kg (ajustada a 1mL), vía intraperitoneal y el grupo control con cuatro ratas a las que se les administró

1mL de agua inyectable. Las ratas permanecieron en las jaulas de acrílico los catorce días.

3.2.2.2 Obtención de muestras

Al finalizar el tiempo del estudio las ratas fueron anestesiadas con una solución de pentobarbital sódico (30mg/Kg de peso corporal) por vía intraperitoneal y se tomaron muestras de sangre mediante punción cardíaca. Las muestras de sangre fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento.

Después de la toma de las muestras de sangre las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical. Se les realizó perfusión con una solución de formaldehído al 10% y fueron extraídos el cerebro, bazo, hígado y riñones. Una parte de los órganos se utilizó para la cuantificación de plata. El resto de los órganos se colocó en frascos con formaldehído amortiguado al 10% para la evaluación de daño por microscopía óptica.

3.2.2.3 Procesamiento de muestras para evaluación del daño a órganos

En los órganos de las ratas del grupo expuesto a nanopartículas y el grupo control se llevaron a cabo los procesos estándar de inclusión (deshidratación en soluciones seriadas de alcohol etílico, después en xilol y parafina), corte con micrótopo, tinción con hematoxilina y eosina y montaje. Los cortes de los órganos fueron evaluados mediante microscopio óptico a 50, 100 y 400x (aumentos) para determinar la presencia de datos de daño.

3.2.3 Evaluación de la presencia de nanopartículas de plata en órganos de ratas

3.2.3.1 Exposición de las ratas a nanopartículas de plata

Para evaluar la distribución de plata se utilizaron 5 ratas hembra, las cuales fueron pesadas, marcadas y separadas en dos grupos, el grupo de exposición con tres ratas, a las que se les administró una solución de nanopartículas de plata a una dosis única de 10mg/Kg (ajustada a 1mL), vía intraperitoneal y el grupo control con dos ratas a las que se les administró 1mL de agua inyectable. Las ratas permanecieron en las jaulas de acrílico por cuatro días.

3.2.3.2 Obtención de muestras

Al finalizar el tiempo del estudio las ratas fueron anestesiadas con una solución de pentobarbital sódico (30mg/Kg de peso corporal) por vía intraperitoneal y sacrificadas mediante dislocación cervical. Se les realizó perfusión con una solución de formaldehído al 10% y fueron extraídos el cerebro, bazo, hígado y riñones. Los órganos se colocaron en frascos con formaldehído amortiguado al 10% para su evaluación por microscopía electrónica.

3.2.3.3 Procesamiento de muestras

Los órganos de las ratas fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfato, cortadas y embebidas con glutaraldehído, y postfijadas con tetraóxido de osmio, contrastadas con nitrato de uranilo, deshidratadas en soluciones de alcohol etílico e incluidas en resina de inclusión para ser seccionadas por medio de un ultramicrotomo.

Para determinar la presencia de nanopartículas de plata se utilizó el microscopio de transmisión electrónica Hitachi S-5500 ultrahigh resolution (0.4nm at 30kV) con BF/DF Duo-STEM detector y posteriormente se realizó un microanálisis con espectrometría de energía dispersiva por rayos X utilizando el espectrómetro Bruker AXS Quantax acoplado al microscopio, para lo cual la muestra se barrió durante varios minutos con rayos X, posteriormente estos fueron captados y la respuesta fue analizada por el espectrómetro.

3.2.4 Determinación de la presencia de plata en muestras de orina y heces en ratas

3.2.4.1 Exposición de las ratas a nanopartículas de plata

Para evaluar la excreción de plata en orina y heces se utilizaron 11 ratas hembras, las cuales fueron pesadas, marcadas y separadas en dos grupos, el grupo de exposición a nanopartículas de plata de ocho ratas y control de tres ratas previamente colocadas en cajas metabólicas.

A las ratas del grupo de exposición se les administró una solución de nanopartículas de plata a una dosis única de 10mg/Kg (ajustada a 1mL), vía intraperitoneal, mientras que al grupo control recibió 1mL de agua inyectable. Ambos grupos permanecieron en las jaulas metabólicas los 53 días del estudio. Se llevó un registro diario de ingresos (agua y alimento) y egresos (orina y heces) y el peso fue registrado dos veces por semana.

3.2.4.2 Obtención de muestras

Las muestras de orina fueron recolectadas los días 0, 1, 2, 4 y 7. La orina fue colocada en frascos plásticos de 20mL, los cuales fueron almacenados a 4°C hasta su procesamiento.

Las muestras de heces fueron recolectadas los días 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 49 y 52. Las muestras fueron colocadas en frascos de plástico de boca ancha, los cuales fueron almacenados a 4°C hasta su procesamiento.

3.2.5 Determinación de la concentración de plata por Espectrometría de Absorción Atómica

La concentración de plata en sangre, orina, heces y tejidos fue determinada por medio de un espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito con 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 a la cantidad de átomos presentes.

3.2.5.1 Preparación de la curva de calibración

A partir de una solución estándar de Ag (1000µg/mL), se preparó una solución stock de 1µg/mL. En un matraz volumétrico de 100mL se colocaron: 3mL de ácido nítrico concentrado, 0.1mL del estándar de plata y se aforó con agua tipo 1 (desionizada).

La curva de calibración se utilizó para optimizar la precisión del equipo, se realizó antes de iniciar el análisis de las muestras, para lo cual se utilizaron 100µL de cada una de las soluciones de concentración conocida (Blanco, 5, 10, 25, 50 y 75µg/L) más 900µL de solución modificadora (triton X-100 0.5%, paladio 10ppm, ácido nítrico 1%, fosfato de amonio 0.2%, ácido ascórbico 1%), se colocaron en orden en el automuestreador del espectrómetro para medir su absorbancia, el criterio de aceptación para determinar la linealidad de la curva fue un coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.995 . Las soluciones utilizadas para la curva de calibración fueron preparadas a partir de la solución stock como se indica en la Tabla 1.

Concentración de la solución (µg/L)	Volumen de solución stock (µL)	Volumen de ácido nítrico (mL)	Volumen final de aforación (mL)
Blanco	0	0.5	10
5	50	0.5	10
10	100	0.5	10
25	250	0.5	10
50	500	0.5	10
75	750	0.5	10

Tabla 1. Características de las soluciones utilizadas en la curva de calibración.

3.2.5.2 Procesamiento de muestras para la determinación de plata

Las muestras de suero y orina no requirieron ser procesadas para el análisis de su contenido de plata.

Las muestras de heces fueron deshidratadas durante 6 horas a una temperatura de 70°C, se pulverizaron y se depositaron 0.5g de la muestra en un vaso de teflón para microondas y se les agregaron 3mL de agua tipo I + 1mL de ácido nítrico concentrado.

Las muestras de órganos fueron tratadas colocando 0.2-0.5g en un vaso de teflón que contenía 1mL de ácido nítrico concentrado, se dejaron reposar por 3 horas, se agregaron 3mL de agua tipo I y se colocaron en el horno de microondas para completar el proceso de digestión.

3.2.5.3 Lectura de muestras

Para su lectura se colocaron 100µL de cada muestra más 900µL de solución modificadora. Las muestras fueron homogenizadas agitándolas de manera suave y repetida con la puntilla de la pipeta Eppendorf y se colocaron en el automuestreador del espectrómetro. Se aceptaron las lecturas que se encontraron dentro de los límites de cuantificación (5-75µg/dL), aquellas muestras cuya concentración fue menor se reportaron como <5µg/dL, en el caso de las muestras donde se encontraron concentraciones mayores al límite superior se les realizaron diluciones y se analizaron nuevamente.

3.2.5.4 Cálculo para determinar la concentración de plata

En el casos de las muestras de orina y suero, la lectura de las muestras fue tomada directamente como el resultado expresado en $\mu\text{g/dL}$.

Las concentraciones de plata de las muestras de heces y órganos fueron calculadas a partir de la concentración del material digerido usando un factor de transformación como se muestra en la Tabla 2.

Cantidad de muestra (g)	Factor	Límite de cuantificación ($\mu\text{g/g}$)
0.5	0.08	0.4

Tabla 2. Factor de transformación y límite inferior de cuantificación en la lectura de las muestras de heces y órganos.

3.2.6 Procesamiento de los datos

Las comparación de los resultados de las concentraciones de plata de las muestras de suero, órganos, heces y orina, se realizó mediante un análisis de varianza (ANADEVA) y la prueba t de Student), se consideró un valor de $p > 0.05$ para establecer una diferencia significativa entre grupos.

3.2.6.1 Descripción de la metodología para el cálculo de parámetros farmacocinéticos

El análisis farmacocinético y estadístico para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se desarrolló haciendo uso del paquete computacional WinNonlin versión 6.3 y SPSS versión 13, con lo que se determinaron los siguientes parámetros:

$C_{\text{máx}}$: La concentración sérica máxima se obtuvo de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

T_{máx}: El tiempo transcurrido en que se produce la concentración sérica máxima se obtuvo de manera gráfica a partir del perfil de concentración sérica con respecto al tiempo.

ABC_{0-t}: El área bajo la curva de la concentración sérica desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) se calculó por el método trapezoidal. El procedimiento para el cálculo de este parámetro se realizó con la siguiente fórmula:

$$\mathbf{ABC}_{0-t} = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i+1})(t_i - t_{i-1})}{2}$$

Dónde:

n = número de tiempos de muestreo utilizados en el perfil sérico.

t_i = tiempo en que se realiza la i -ésima toma de muestra.

C_i = Concentración obtenida en el i -ésimo tiempo de muestreo.

K_e: la constante de eliminación se estimó a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración sérica con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica) multiplicado por la integral de 2 (2.303).

$$K_e = b \times \ln(2)$$

Dónde:

b = pendiente de la recta.

t_{1/2}: la vida media de eliminación se estimó mediante el cociente de integral de 2 sobre constante de eliminación.

$$t_{1/2} = \ln(2)/K_e.$$

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Evaluación de la cinética de plata en perros

4.1.1 Determinación de plata en suero

Para la obtener el perfil farmacocinético de la plata se determinaron las concentraciones de plata en muestras de suero tomadas en los siguientes tiempos: tiempo 0 (previo a la administración intraperitoneal de las nanopartículas de plata) hasta el día 35.

La Tabla 3 muestra las concentraciones séricas de plata obtenidas en los diferentes tiempos de muestreo para cada uno de los perros. Las determinaciones de plata del día 35 mostraron que la plata prácticamente ha sido eliminada de la sangre.

Los resultados de las concentraciones de plata obtenidos de uno de los perros (perro 3) fueron excluidos, ya que fueron considerados datos extremos en comparación con los resultados de las concentraciones de plata obtenidas de los otros cuatro perros del estudio.

La Figura 1 muestra la concentración promedio de plata sérica de los perros. En la Figura 1(a) se puede apreciar una elevación en la concentración de plata alrededor de las 6 horas, seguida de una segunda elevación alrededor de los tres días, apreciable en la Figura 1(b).

# muestra	Horas	Concentración sérica de plata ($\mu\text{g/dL}$)				
		1	2	3*	4	5
1	0	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
2	0.25	35.6	9.7	2210.0	17.8	6.5
3	0.5	60.9	32.5	1470.0	40.2	17.8
4	1	148.0	67.5	890.0	67.4	45.8
5	2	224.0	127.0	800.0	133.0	108.0
6	4	302.0	146.0	464.0	205.0	141.0
7	6	339.0	187.0	346.0	252.0	308.0
8	8	328.0	265.0	281.0	201.0	263.0
9	12	225.0	250.0	237.0	183.0	223.0
10	24	75.0	59.0	88.0	64.0	59.0
11	36	91.2	58.6	42.7	90.4	93.4
12	48	125.6	99.6	26.3	108.2	108.0
13	72	102.2	100.6	22.0	159.0	121.8
14	96	106.4	104.8	15.6	116.2	120.6
15	168	43.2	42.5	14.7	60.0	53.5
16	240	42.8	25.5	12.9	35.0	27.2
17	336	17.2	15.2	9.9	24.1	14.3
18	504	7.8	7.0	7.0	13.7	5.6
19	672	< 5	< 5	< 5	7.9	< 5
20	840	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

Tabla 3. Concentración sérica de plata en perros Beagle expuestos a nanopartículas de plata 5 mg/Kg vía IP. *Las concentraciones de plata del perro 3 muestran datos extremos.

4.1.2 Parámetros farmacocinéticos

A partir de las concentraciones séricas de plata, obtenidas en los diferentes tiempos, se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos:

$T_{\text{máx}}=6.5\text{h}$, $C_{\text{máx}}=291\mu\text{g/dL}$, $ABC_{0-t}=22931\mu\text{g/dL/h}$, $t_{1/2}=98.52\text{h}$ y $K_e=0.0072/\text{h}$,

los valores obtenidos para cada perro se muestran en la Tabla 4.

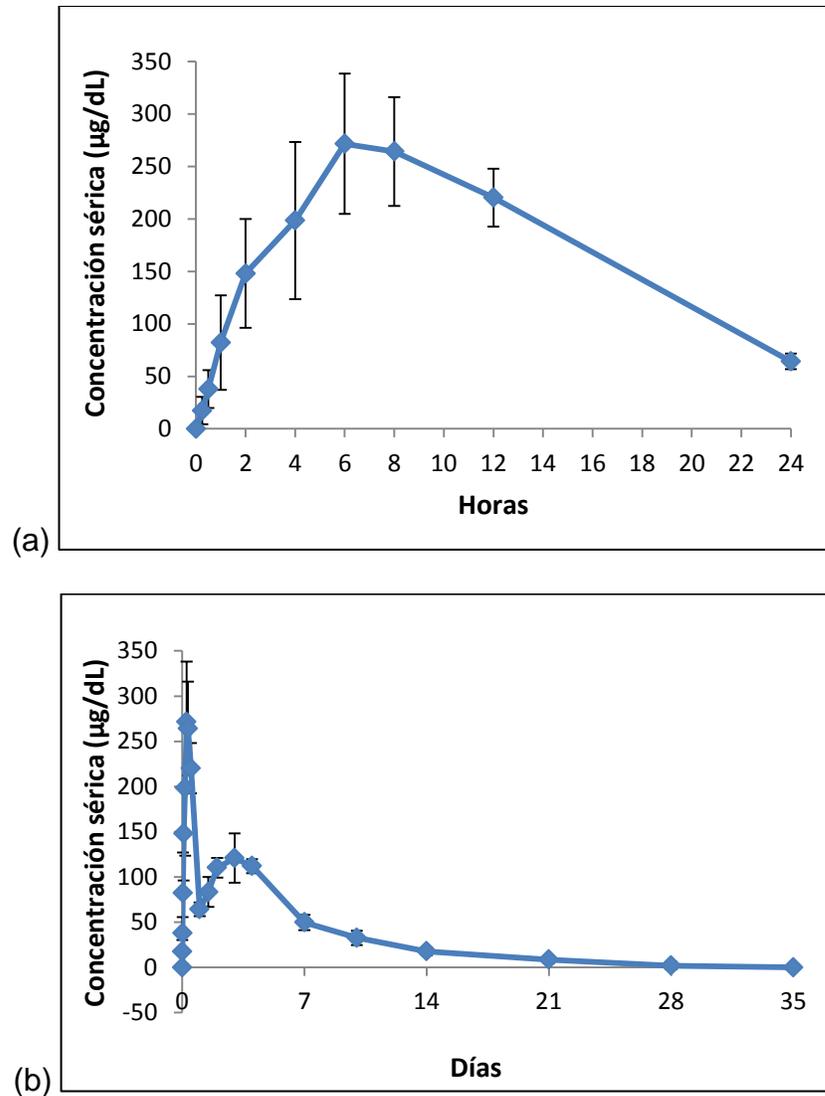


Figura 1. Concentración sérica promedio de la plata de perros Beagle en las primeras 24h (a) y los 35 días (b) posteriores a la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 5mg/Kg vía IP. Los datos representan la media \pm DE, n=4.

Perro	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$C_{m\acute{a}x}$ (µg/dL)	ABC_{0-t} (µg/dL/h)	$t_{1/2}$ (h)	K_e (h ⁻¹)
1	6	339	23789.9	103.06	0.0067
2	8	265	20214.4	113.99	0.0061
4	6	252	24815.0	96.53	0.0072
5	6	308	22906.2	80.51	0.0086
Media \pm DE	6.5 \pm 1	291 \pm 39.9	22931.4 \pm 1972	98.52 \pm 14	0.0072 \pm 0.0011

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos de plata obtenidos después de la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 5mg/Kg vía IP a perros Beagle.

4.1.3 Evaluación de los perros

Para la evaluación física los perros fueron observados diariamente en las unidades experimentales, en las cuales permanecieron durante todo el estudio, además se les realizó examen físico general y exámenes de laboratorio (biometría hemática y perfil bioquímico) previo a la administración de las nanopartículas (basales), a la semana y al mes posterior a la administración de las nanopartículas de plata.

Los resultados de los exámenes basales fueron normales en todos los perros.

Los resultados de la primera semana mostraron una disminución de la hemoglobina y del hematocrito en todos los perros y un aumento de los leucocitos.

Los resultados de los exámenes de laboratorio realizados un mes después del inicio del estudio mostraron elevación del nitrógeno de la urea, fosfatasa alcalina y transaminasa glutámico oxalacética en algunos de los perros.

De acuerdo a la evaluación física realizada al concluir el estudio ninguno de los perros presentó ningún signo o síntoma de daño o enfermedad.

La Tabla 5 muestra los resultados de los exámenes de laboratorio obtenidos durante el estudio, los resultados señalados con un asterisco son aquellos que están fuera del rango.

	Peso	Biometría Hemática					Perfil Bioquímico									
		Hb	Hto	Leuc	Neut	Linf	Glu	BUN	Creat	PT	Alb	BT	FA	TGO	TGP	DHL
Perro 1																
Basal	8.5	15.6	48	6.3	65	30	75	13.7	1.0	5.6	3.1	0.26	55.1	22.8	32.1	38.2
1 semana	8	14.2	43	15.7*	75	24	76	16.9	0.8	6.0	3.3	0.27	76.6	23.0	154*	50.1
1 mes	8.4	15.6	47	10.3	57	33	50	21.3	1.35	6.0	2.9	0.25	68.7	32.6	18.9	190.6
Perro 2																
Basal	12	15.3	46	7.6	66	31	86	12.1	1.0	5.6	3	0.24	50.7	17.9	31.6	48.4
1 semana	12	13.5*	42	12.9	65	28	81	11.4	0.7	5.8	3.4	0.25	84.1	25.4	82.8	142.6
1 mes	12.4	15.1	45	7.4	56	36	77	16.7	1.52	6.2	3.1	0.26	90.4	61.0	34.6	291.0
Perro 3																
Basal	12.5	15.7	47	7.8	77	17	79	13.1	0.9	5.7	2.9	0.27	62	22.8	20.4	96.1
1 semana	12.2	14.2	44	15.5*	76	20	82	18.7	0.8	5.7	2.9	0.31	304*	48.0	1633*	109.8
1 mes	13	15.3	44	9.9	73	24	71	17.7	1.23	6.0	3.0	0.21	141	26.7	27.6	183.0
Perro 4																
Basal	12	17.5	51	5.4	63	36	71	11.2	0.9	5.9	3.3	0.25	57	24.8	62.2	121.2
1 semana	11.9	15.5	46	18.6*	77	17	56	16.0	0.8	5.8	3.1	0.3	127	34.4	214*	263
1 mes	12.3	15.4	46	8.7	68	26	60	16.9	1.34	5.5	3.0	0.23	44.5	24.7	36.4	432.4
Perro 5																
Basal	13.5	16.1	47	6.1	66	30	76	10.9	1.0	6.8	2.8	0.22	49.8	30.8	46.3	128.3
1 semana	13	14.7	45	15.1*	73	25	67	14.9	0.7	7.4	2.8	0.35	149*	26.0	66	147.3
1 mes	14.1	14.3	43	7.7	62	32	65	18.7	1.13	5.8	2.8	0.27	96.7	41.7	60.7	394.3

Tabla 5. Resultados de laboratorio obtenidos antes de la administración de nanopartículas de plata y después de una semana y un mes de iniciado el estudio. Hb: hemoglobina, Hto: hematocrito, Leuc: leucocitos, Neut: neutrófilos, Linf: linfocitos, Glu: glucosa, BUN: nitrógeno de la urea, Creat: creatinina, PT: proteínas totales, Alb: albúmina, BT: bilirrubinas totales, FA: fosfatasa alcalina, TGO: transaminasa glutámico oxalacética, TGP: transaminasa glutámico pirúvica, DHL: deshidrogenasa láctica.

4.2 Evaluación de la cinética de plata en ratas

4.2.1 Evaluación de la distribución de plata y nanopartículas de plata

La distribución de la plata fue evaluada en las muestras de sangre y órganos del grupo de ratas expuestas y el grupo control 14 días después de la administración de nanopartículas de plata 10mg/Kg vía intraperitoneal.

4.2.1.1 Concentración de plata en suero y órganos

Las muestras de sangre fueron tomadas en tubos vacutainer sin anticoagulante y posteriormente centrifugadas a 3,000rpm, para la obtención del suero que se utilizó para la determinación de la plata.

Posteriormente se extrajeron los órganos, de los cuales se tomó una muestra para su digestión y determinación de plata.

Las concentraciones de plata en suero ($\mu\text{g}/\text{dL}$) obtenidas del grupo de ratas expuestas a nanopartículas de plata y el grupo control se muestran en la Figura 2.

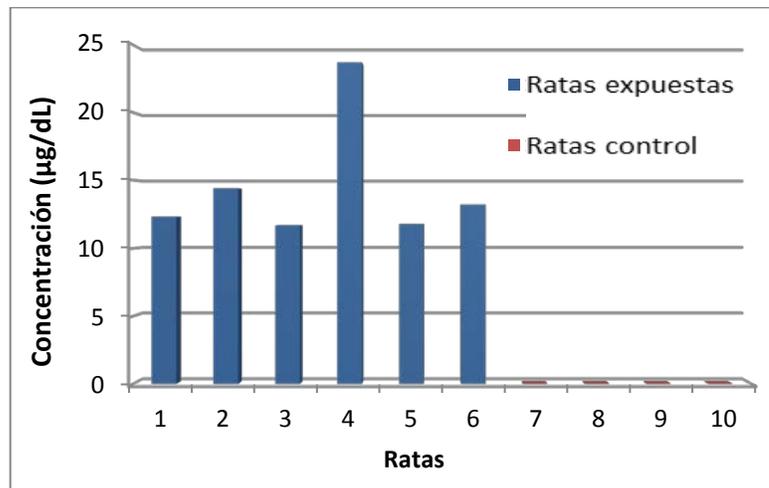


Figura 2. Concentración sérica de plata en ratas. Muestras obtenidas el día 14 después de la administración de nanopartículas de plata.

En la Figura 3 muestran las concentraciones séricas promedio de plata en las ratas expuestas, que fue de $14.5\mu\text{g}/\text{dL}$, que en el grupo control no se detectaron concentraciones de plata.

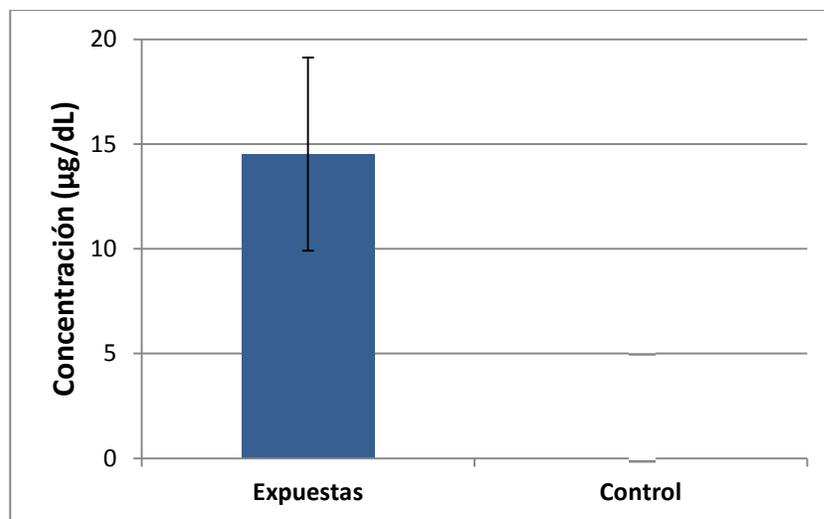


Figura 3. Concentración sérica promedio de plata en ratas expuestas y ratas control. Muestras obtenidas el día 14 después de la administración de las nanopartículas de plata. Los datos representan la media \pm DE, n=6.

En cuanto a la distribución de plata en órganos se observó que el bazo fue el órgano con mayor concentración de plata.

En el hígado y el riñón no se detectaron concentraciones de plata, excepto en una de las ratas expuestas que presentó 1.1µg/g de tejido en hígado y 2.5µg/g de tejido en riñón. No se detectó plata en el cerebro de las ratas expuestas. En el grupo control no se detectaron concentraciones de plata en los órganos (Figura 4).

La concentración promedio de plata en el bazo del grupo de ratas expuestas a nanopartículas fue de 2.6µg/g de tejido mientras que en el grupo control no se detectó plata (Figura 5).

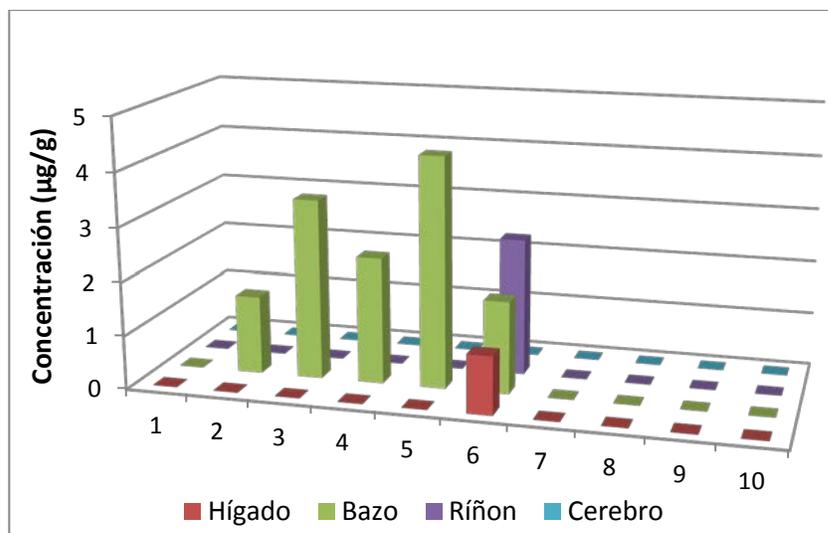


Figura 4. Concentración de plata en diferentes órganos en ratas expuestas y ratas control. Muestras obtenidas el día 14 después de la administración de las nanopartículas de plata.

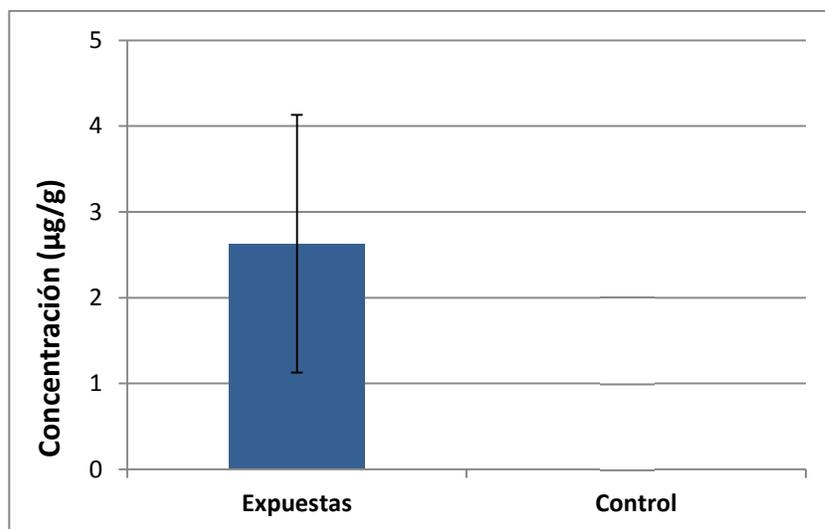


Figura 5. Concentración promedio de plata en el bazo de ratas expuestas y ratas control. Muestras obtenidas el día 14 después de la administración de las nanopartículas de plata. Los datos representan la media \pm DE, n=5.

4.2.1.2 Evaluación de daño a órganos en ratas

Para la evaluación de daño de los órganos en las ratas expuestas a nanopartículas y su comparación con el grupo de ratas control fueron extraídos riñón, hígado, bazo y cerebro, de los cuales se realizaron cortes histológicos

los cuales se fueron teñidos con hematoxilina y eosina para ser evaluados por microscopía óptica.

No se observó daño en los cortes histopatológicos de riñón en el grupo de ratas expuestas a nanopartículas de plata ni en el grupo control (Figura 6).

En los cortes histopatológicos de hígado del grupo de ratas expuestas se observó engrosamiento de la cápsula hepática con infiltrado inflamatorio crónico, en los cortes del grupo control no se observó daño (Figura 7).

En los cortes histopatológicos de bazo del grupo de ratas expuestas se observó infiltrado inflamatorio crónico de la grasa periesplénica, en los cortes del grupo control no se observó daño (Figura 8).

En los cortes histopatológicos de cerebro del grupo de ratas expuestas se observó daño acidofílico neuronal en corteza cerebral y cerebelosa compatible con daño hipóxico, en los cortes del grupo control no se observó daño (Figura 9).

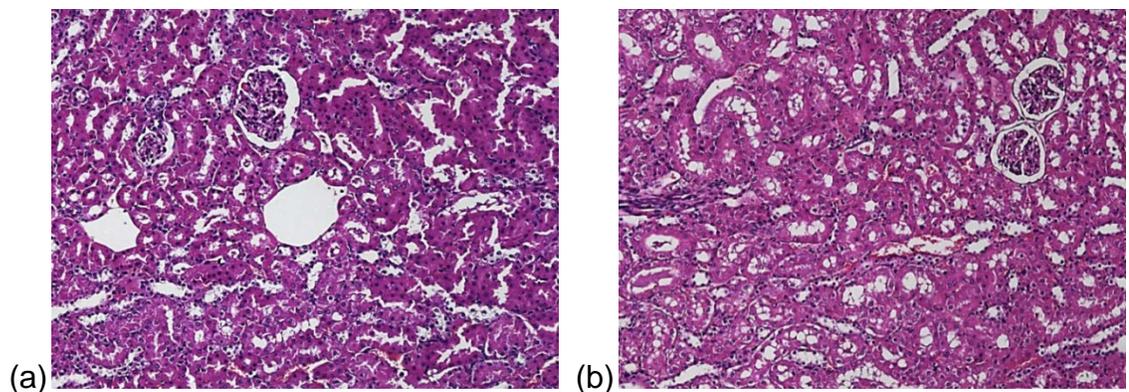


Figura 6. Microfotografía óptica de riñón de ratas expuestas a nanopartículas de plata (a).
(b) control.

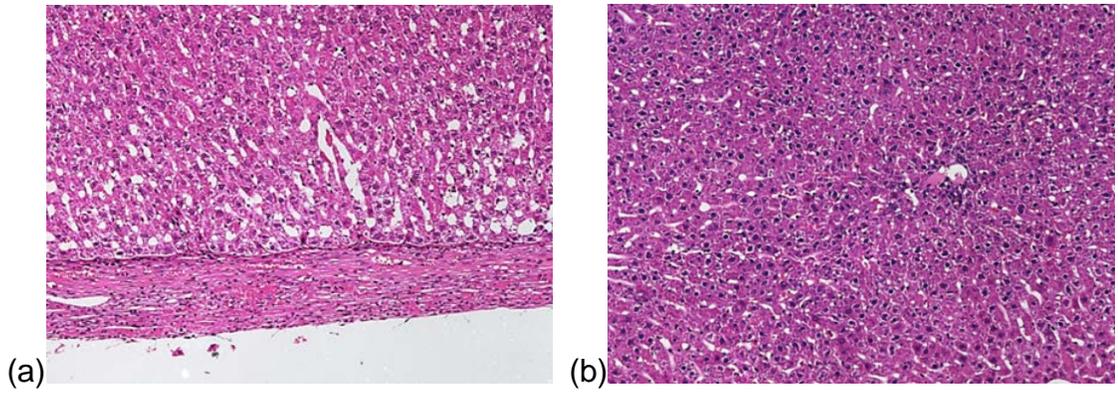


Figura 7. Microfotografía óptica de hígado de rata expuesta a nanopartículas de plata

(a). (b) control.

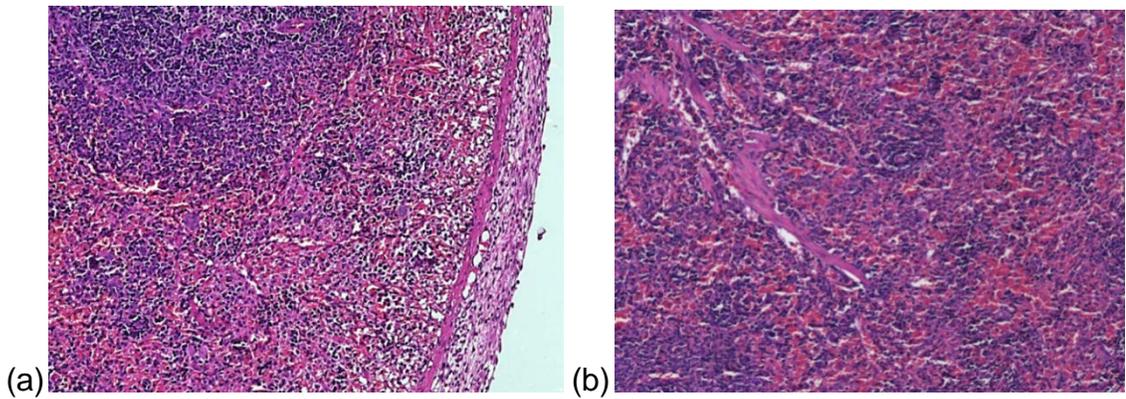


Figura 8. Microfotografía óptica de bazo de rata expuesta a nanopartículas de plata (a).

(b) control.

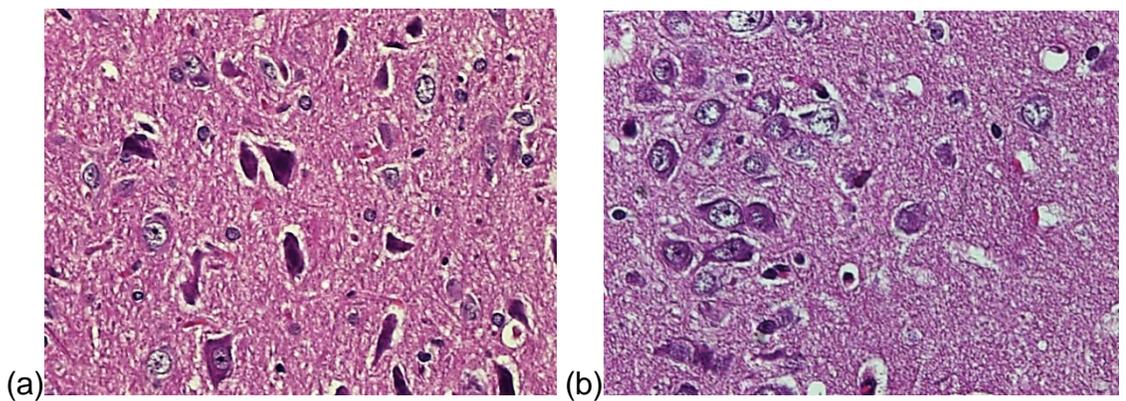


Figura 9. Microfotografía óptica de cerebro de rata expuesta a nanopartículas de plata (a). (b) control

4.2.1.3 Determinación de la presencia de nanopartículas de plata en órganos

La presencia de las nanopartículas de plata en los órganos de las ratas expuestas fue evaluada por medio de microscopía electrónica en riñón, hígado, bazo y cerebro. Se encontraron nanopartículas en el riñón (Figura 10), hígado (Figura 11) y cerebro (Figura 12) de las ratas expuestas, confirmando que las nanopartículas de plata atravesaron la barrera hematoencefálica. No se encontraron nanopartículas en bazo de las ratas del grupo expuesto ni en los órganos de las ratas del grupo control.

La confirmación de la presencia de las nanopartículas de plata se llevó a cabo por medio de la espectrometría de energía dispersiva de rayos X (Figura 13).

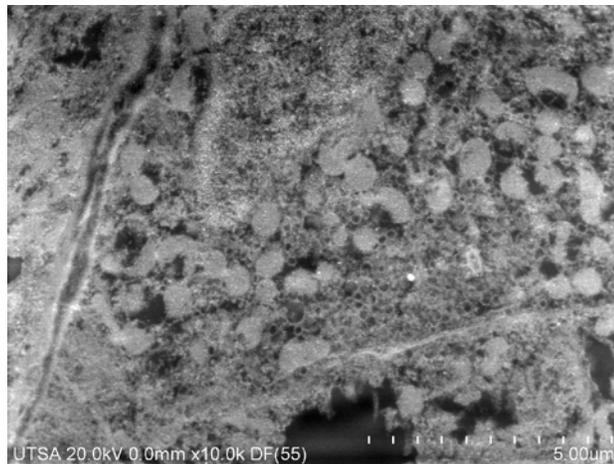


Figura 10. Microfotografía electrónica del riñón.

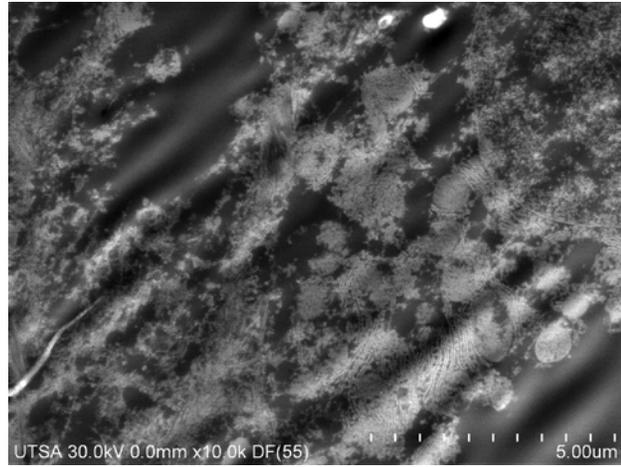


Figura 11. Microfotografía electrónica del hígado.

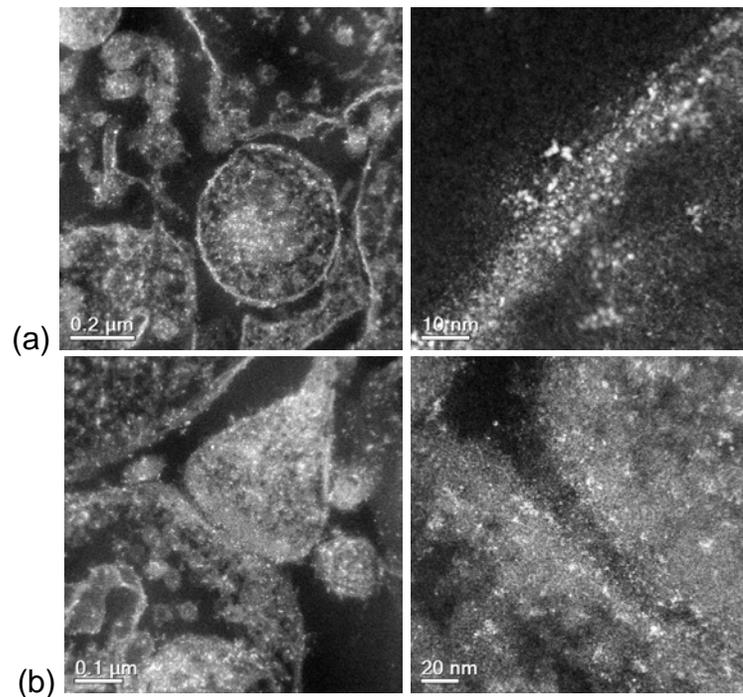


Figura 12. Microfotografías electrónicas de cerebro. Nanopartículas en el núcleo de las neuronas (a) y en la unión neuronal (b).

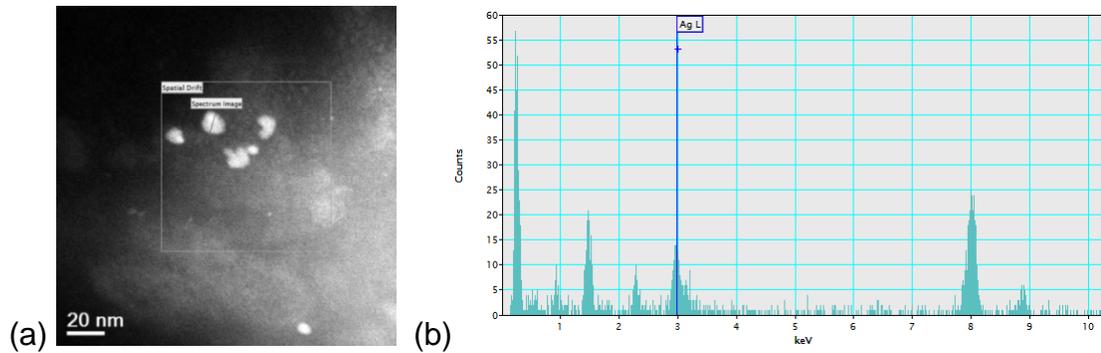


Figura 13. Microfotografía electrónica (a) y gráfica de la espectrometría de energía dispersiva de rayos X (b). La gráfica confirma la presencia de nanopartículas de plata.

4.2.2 Evaluación de la eliminación de plata y nanopartículas de plata

4.2.2.1 Determinación de plata en muestras de orina y heces

Para la determinación de plata en orina y heces, las muestras fueron obtenidas después de la medición de su volumen y peso. En el caso de las muestras de orina éstas se colectaron hasta que la detección de la plata estuvo por debajo del límite de cuantificación, lo que ocurrió el día 7 del estudio (Tabla 6). La Figura 14 presenta la excreción urinaria promedio de la plata durante la primera semana del estudio.

Concentración urinaria de plata											
Día	Ratas expuestas								Ratas control		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
1	6.7	161	55.2	190	< 5	< 5	57	14.6	< 5	< 5	< 5
2	8.9	5.8	10.2	< 5	12.8	< 5	13.4	< 5	< 5	< 5	< 5
4	< 5	< 5	< 5	11.5	17.6	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
7	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

Tabla 6. Concentraciones de plata ($\mu\text{g/dL}$) en muestras de orina de ratas expuestas a nanopartículas de plata a una dosis de 10mg/Kg y el grupo control (no expuestas).

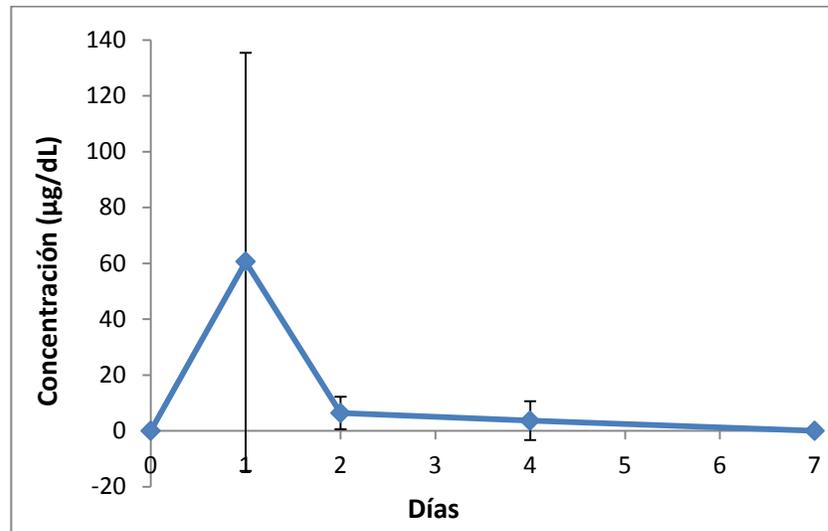


Figura 14. Excreción urinaria de plata ($\mu\text{g/dL}$) en ratas posterior a la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 10mg/Kg. Los datos representan la media \pm DE, n=8.

La recolección de muestras de heces para la determinación de plata se realizó los días 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 49 y 53 del estudio (Tabla 7). El promedio de la excreción fecal de plata de las ratas se muestra en la Figura 15.

Días	Ratas expuestas								Ratas control		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
1	1.0	2.2	1.4	3.2	1.5	4.0	4.5	12.7	<0.4	<0.4	<0.4
2	22.8	8.7	6.8	3.2	28.2	2.0	5.1	14.3	<0.4	<0.4	<0.4
4	2.7	2.1	2.5	2.8	1.8	1.1	3.7	3.9	<0.4	<0.4	<0.4
7	13.0	9.4	9.0	7.0	7.0	4.1	7.0	11.1	<0.4	<0.4	<0.4
10	3.3	4.3	2.5	2.4	2.9	0.8	5.3	0.6	<0.4	<0.4	<0.4
14	1.9	2.7	7.8	4.9	37.3	9.9	5.9	1.9	<0.4	<0.4	<0.4
17	9.8	3.0	12.4	3.4	3.2	12.2	2.7	2.0	<0.4	<0.4	<0.4
21	1.8	2.0	1.4	3.4	2.8	1.8	1.9	2.5	<0.4	<0.4	<0.4
24	3.0	2.1	1.8	1.7	1.5	1.9	1.9	0.5	<0.4	<0.4	<0.4
28	3.3	1.6	1.9	1.6	2.6	<0.4	2.5	2.6	<0.4	<0.4	<0.4
31	1.0	3.4	3.4	3.9	1.3	<0.4	0.8	1.0	<0.4	<0.4	<0.4
35	4.5	1.3	0.8	1.5	1.2	<0.4	2.2	3.0	<0.4	<0.4	<0.4
38	1.2	0.5	1.2	3.2	3.2	<0.4	2.1	1.4	<0.4	<0.4	<0.4
42	1.3	1.0	3.1	4.7	4.5	<0.4	7.2	2.5	<0.4	<0.4	<0.4
45	1.4	0.8	1.9	0.7	0.9	<0.4	1.1	1.8	<0.4	<0.4	<0.4
49	1.8	3.1	1.2	1.2	1.3	<0.4	1.4	1.5	<0.4	<0.4	<0.4
53	0.8	0.9	0.6	1.4	0.7	<0.4	1.6	0.8	<0.4	<0.4	<0.4

Tabla 7. Excreción de plata ($\mu\text{g/g}$) en las heces de las ratas, posterior a la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 10mg/Kg.

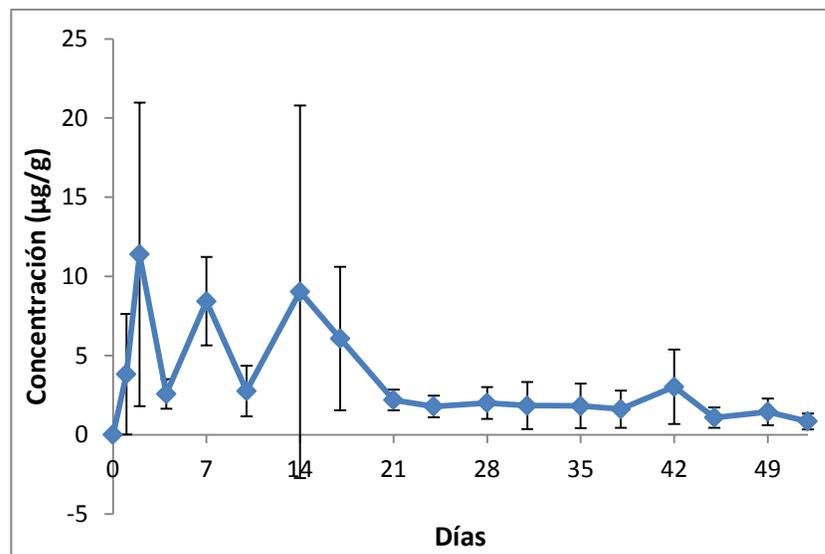


Figura 15. Excreción promedio de plata en las heces de las ratas posterior a la administración de nanopartículas de plata a una dosis de 10mg/Kg. Los datos representan la media \pm DE, n=8.

4.2.2.2 Evaluación de las ratas

La evaluación de las ratas se llevó a cabo dentro de las jaulas metabólicas, se registraron diariamente los ingresos (agua y alimento) y los egresos (orina y heces), además del peso corporal dos veces por semana. En todas las ratas expuestas a nanopartículas se observó disminución en la ingesta de alimento los primeros tres días. Al comparar el grupo de ratas expuesto con el grupo control, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias diarias en la ingesta de agua (19.84mL/día, control 20.64mL/día), ingesta de alimentos (14.24g/día, control 14.29g/día), excreción de heces (8.46g/día, control 8.26g/día), excreción de orina (7.03mL/día, control 7.59mL/día), ni en el aumento de peso (1.02g/día, control 0.74g/día).

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los parámetros farmacocinéticos de la plata después de la administración de las nanopartículas de plata, además de evaluar su posible toxicidad.

Para el estudio farmacocinéticos se utilizaron perros Beagle y la distribución en órganos y la eliminación de la plata se utilizaron ratas Wistar. En el libro “Perfil Toxicológico de la Plata” publicado por Roper para el Centro de Control de Enfermedades (CDC, Estados Unidos), reportan que la depuración de plata posterior a la administración intravenosa de nitrato de plata es menor en perros que en ratones, ratas y monos ⁽⁹⁹⁾, por esta razón se decidió utilizar una dosis de 5mg/Kg en los perros, la cual es menor que la dosis administrada a las ratas (10mg/Kg), en las que se realizaron los estudios de distribución y eliminación de la plata.

Determinación de plata en el suero de los perros

En el perfil farmacocinético obtenido de las concentraciones de plata en el suero de los perros durante las primeras 24h se observó la presencia de las tres fases representativas de una administración en sitio de depósito, donde se presentó una primera fase caracterizada por un aumento en las concentraciones séricas de plata la cual corresponde a la etapa de absorción de la plata desde el sitio de administración hacia la sangre, una segunda fase donde se alcanza la concentración máxima seguida de una fase de eliminación

representada por la caída franca de la curva de concentraciones séricas de plata.

En el perfil farmacocinético considerando las concentraciones hasta el día 35 se observó una segunda elevación en las concentraciones séricas de plata la cual ocurrió alrededor del tercer día, lo que indica que existe una fase de redistribución entre los días 3 y 5, este fenómeno pudiera explicarse por una distribución rápida de las nanopartículas de plata (primeras 24h), para posteriormente tener una fase de redistribución. Por último sigue la fase de eliminación que se prolonga hasta el día 35 del estudio, cuando las concentraciones de plata en suero estuvieron por debajo del límite de cuantificación.

Parámetros farmacocinéticos

En este estudio se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos: $T_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$, ABC, $t_{1/2}$ y K_e . A la fecha no existe evidencia en la literatura de estudios donde se haya evaluado la farmacocinética de la plata después de la administración de nanopartículas de plata en perros Beagle. En un estudio realizado por Lee y colaboradores en ratas Sprague-Dawley expuestas durante 28 días por vía oral a nanopartículas de plata estabilizadas con citrato, se mostró que las concentraciones sanguíneas de plata disminuyeron rápidamente durante el primer mes y se mantuvieron bajas durante los siguientes 4 meses⁽¹⁰⁰⁾. Sin embargo, las diferencias tanto en la vía de administración, las dosis repetidas durante 28 días y el hecho de que las

nanopartículas utilizadas poseían cubierta no permiten una comparación con los resultados de este estudio, además que los autores solo determinaron la vida media de eliminación.

Evaluación de los perros

En los resultados de los estudios de laboratorio realizados a los perros una semana después de la administración de las nanopartículas, se observó una disminución en los parámetros de la línea roja y un aumento de los leucocitos en todos los perros, además en algunos de ellos se observó elevación de las enzimas hepáticas, sin embargo los perros presentaron un buen aspecto general. En los exámenes de laboratorio realizados al mes del estudio los resultados de la biometría hemática y del perfil bioquímico se encontraron en niveles normales.

Los hallazgos de daño por medio de estudios de laboratorio han sido reportados por diferentes autores, De Jong y colaboradores reportaron cambios importantes en los parámetros del perfil bioquímico y en la biometría hemática en un estudio en el que se administraron nanopartículas de plata por vía intravenosa de manera repetida en ratas ⁽⁹⁴⁾. Kim y colaboradores encontraron cambios estadísticamente significativos en los niveles de fosfatasa alcalina y colesterol, dependientes de la dosis de nanopartículas de plata administradas durante 90 días por vía oral a ratas ⁽⁸⁸⁾. El mismo autor encontró, además de los datos descritos anteriormente, una disminución en las proteínas totales y en el tiempo de tromboplastina parcial y un incremento en el volumen corpuscular

medio, los eritrocitos, la hemoglobina y en el hematocrito en ratas expuestas a nanopartículas de plata por un periodo de 28 días ⁽¹⁰¹⁾. Lee y colaboradores reportaron en un estudio realizado en ratas, una disminución de la concentración media de hemoglobina corpuscular y de las plaquetas, después de la administración oral de nanopartículas de plata con cubierta de citrato durante 28 días. Los parámetros que se elevaron significativamente fueron el tiempo de protrombina, el colesterol, los niveles de la fosfatasa alcalina y la aspartato amino transferasa. Todos los parámetros se recuperaron a niveles normales después de uno a dos meses ⁽¹⁰⁰⁾.

Distribución de plata en órganos de ratas

La distribución de la plata fue evaluada en sangre, riñón, hígado, bazo y cerebro a los 14 días posteriores a la administración de las nanopartículas de plata.

La concentración de plata en suero en este tiempo, en el grupo de ratas expuestas fue de 14.5µg/dL.

En bazo, 5 de las 6 ratas presentaron concentraciones detectables de plata con un promedio de 2.6µg/g, mientras que en hígado y riñón solo una rata presentó concentraciones detectables. En este tiempo no se detectó plata en cerebro.

El haber encontrado concentraciones de plata en bazo de 5 de las 6 ratas de estudio concuerda con lo reportado en la literatura en cuanto a que las nanopartículas son captadas por el sistema retículo endotelial. Sadauskas y

colaboradores demostraron en un estudio con nanopartículas de oro inyectadas por vía intravenosa e intraperitoneal, que la captación de las nanopartículas se llevó a cabo por el sistema retículo endotelial, principalmente por las células de Kupffer hepáticas ⁽¹⁰²⁾.

En un estudio de distribución posterior a la exposición a nanopartículas de plata vía inhalatoria durante 4 semanas, Ji y colaboradores reportaron un aumento en las concentraciones de plata dependiente de la dosis en hígado, cerebro y bulbo olfatorio (más altas que el cerebro) ⁽¹⁰³⁾. Sung y colaboradores reportaron un incremento dependiente de la dosis en las concentraciones de plata en tejido pulmonar, sangre, hígado, cerebro y bulbo olfatorio (mayores que en cerebro) en ratas expuestas durante 90 días ⁽⁹³⁾. En un estudio realizado por Loeschner y colaboradores en ratas expuestas por vía oral a nanopartículas de plata estabilizadas con polivinilpirrolidona durante 28 días se reportó que las concentraciones de plata fueron mayores en el intestino delgado, estómago, riñón e hígado ⁽⁸⁷⁾. Kim y colaboradores reportaron resultados similares ⁽¹⁰¹⁾. En nuestro estudio la plata pudo ser cuantificada en bazo, hígado y riñón, pero no en el cerebro.

Daño a órganos en ratas Wistar

La ausencia de daño histológico en riñón, aunado a la baja eliminación de la plata por orina y a que no se detectó plata en los riñones (excepto en una rata que presentó 2.5µg/g) sugiere que la dosis de nanopartículas de plata administradas no producen toxicidad en riñón.

La presencia de engrosamiento de la cápsula hepática y la presencia de infiltrado inflamatorio crónico en la grasa periesplénica puede deberse a un efecto irritativo directo de la administración intraperitoneal de las nanopartículas de plata, más que a un efecto tóxico sistémico.

En contraste con lo encontrado en el presente trabajo, Kim y colaboradores encontraron una alta incidencia de hiperplasia en la vía biliar con o sin necrosis, fibrosis y/o pigmentación en ratas expuestas a nanopartículas de plata por vía oral durante 90 días ⁽⁸⁸⁾. Sardari y colaboradores observaron en ratas expuestas por vía oral a nanopartículas de plata por 30 días, daños en bazo, riñón e hígado ⁽⁸⁹⁾. Cha y colaboradores encontraron datos sugestivos de daño en hígado, corazón, intestino y bazo en ratones balb/c tres días después de la exposición a nanopartículas de plata ⁽¹⁰⁷⁾. Kim y colaboradores reportan datos sugestivos de daño hepático en ratas expuestas a nanopartículas de plata por 28 días, además comprobaron que las nanopartículas de plata no inducen toxicidad genética en la médula ósea ⁽¹⁰¹⁾.

En este trabajo, los cortes histológicos de cerebro mostraron daño de las neuronas de la sustancia gris de cerebro y cerebelo, que puede corresponder a la alta sensibilidad a la hipoxia de estas células. Tang y colaboradores encontraron datos de destrucción de la barrera hematoencefálica, un aumento en el tamaño de los astrocitos y degeneración neuronal posterior a la exposición subcutánea de nanopartículas de plata en ratas ⁽⁹⁵⁾.

Kedziora ha descrito que las nanopartículas de plata producen una obstrucción en el reclutamiento de energía, afectando el movimiento de

electrones en la cadena respiratoria e inhibiendo a los citocromos ⁽⁶⁰⁾, éste podría ser el mecanismo del daño en las neuronas. Uno de los mecanismos de daño de las nanopartículas de plata establecido, es la afección de la función de las mitocondrias. Costa y colaboradores demostraron que las nanopartículas de plata disminuyen la actividad de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial de células extraídas del cerebro, músculo esquelético, corazón e hígado en ratas, los cuales son altamente susceptibles a la inhibición del metabolismo aeróbico de producción de energía ⁽¹⁰⁸⁾. Aun se discute si la toxicidad causada por nanopartículas de plata es por sí mismas, por la liberación de iones de plata de las nanopartículas o por ambas ⁽¹⁰⁹⁾.

Presencia de nanopartículas de plata en órganos de rata

En cuanto a la detección de la presencia de las nanopartículas de plata en los órganos, es importante señalar que uno de los objetivos principales del estudio en ratas fue la evaluación del paso de las nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica. En este estudio se detectó la presencia de las nanopartículas en las neuronas del encéfalo, lo que demuestra que las nanopartículas sin cubierta utilizadas atravesaron la barrera hematoencefálica. Las nanopartículas también se detectaron en hígado y riñón, lo cual fue un resultado esperado por ser órganos que participan en la depuración de sustancias por la orina o las heces.

Garza-Ocañas y colaboradores reportaron la presencia de nanopartículas de plata en el hígado, riñón y corazón posterior a la

administración intraperitoneal de nanopartículas de plata cubiertas con albúmina bovina a ratas, sin embargo en este estudio no se encontraron nanopartículas en el cerebro ⁽³⁹⁾. Tang y colaboradores reportaron cantidades discretas de nanopartículas en riñón, hígado, bazo y tejido pulmonar así como en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, en ratas expuestas por vía subcutánea a nanopartículas de plata ⁽⁹⁵⁾. Lankveld y colaboradores demostraron que después de la administración de nanopartículas de plata de diferentes tamaños vía intravenosa a ratas, las nanopartículas desaparecieron rápidamente de la sangre y se distribuyeron a hígado, pulmón, bazo, cerebro, corazón, riñones y testículos, las nanopartículas más pequeñas se distribuyeron principalmente en el hígado, seguido de los riñones y el bazo, mientras las partículas más grandes se distribuyeron principalmente en bazo seguido del hígado y pulmón ⁽¹⁰⁴⁾.

Park y colaboradores utilizaron en su estudio diferentes tamaños de nanopartículas de plata administradas a ratones ICR por vía oral por 14 días, reportaron que las nanopartículas de menor tamaño fueron distribuidas a cerebro, pulmón, hígado, riñón y testículos, mientras las nanopartículas más grandes no fueron detectadas en estos tejidos ⁽¹⁰⁵⁾. Loeschner y colaboradores reportaron que posterior a la administración oral de nanopartículas de plata, al observar los cortes de hígado, las venas centrales, las vías portales y las lagunas de células de Kupffer se tiñeron intensamente, en el riñón reportaron la presencia de plata en el glomérulo y por todo el borde del ribete en cepillo del epitelio de los túbulos proximales ⁽⁸⁷⁾. Haase y colaboradores analizaron la

distribución intracelular de las nanopartículas de plata en macrófagos humanos THP-1 *in vitro*, la mayoría de las nanopartículas aparecieron libremente distribuidas por el citoplasma, el núcleo e incluso en el nucléolo y dentro de los lisosomas, no se detectaron nanopartículas en mitocondrias ni en retículo endoplásmico ⁽¹⁰⁶⁾.

Lee y colaboradores describen que el contenido de plata disminuyó gradualmente durante los 4 meses de recuperación en la mayoría de los tejidos, excepto cerebro y testículos, de ratas Sprague-Dawley expuestas 28 días a nanopartículas de plata estabilizadas con citrato, mostrando que las barreras biológicas, como la hematoencefálica y la hematotesticular, parecen jugar un papel importante en el aclaramiento de la plata de estos tejidos ⁽¹⁰⁰⁾.

Es difícil hacer una comparación de nuestro trabajo con los reportados en la literatura, ya que estos han demostrado una gran variabilidad de resultados en la determinación de la presencia de las nanopartículas de plata de acuerdo a la vía de administración, concentración, presencia de cubierta, frecuencia de administración y el tiempo entre la administración y la extracción de los órganos.

Eliminación de plata en ratas Wistar

La eliminación de la plata en las ratas Wistar fue evaluada en orina y heces.

La eliminación de plata por orina fue medida hasta el día 7 del estudio, tiempo en el cual los niveles disminuyeron hasta ser inferiores al límite de

cuantificación. La mayor cantidad de plata eliminada por orina se presentó en el día 1, los siguientes días fue menor.

La eliminación de plata por heces fue medida hasta el día 53 del estudio, en el cual aún se lograron detectar pequeñas cantidades de plata. La eliminación de plata fue variable, siendo mayor en los días 2, 7 y 14. Posteriormente las concentraciones de plata eliminadas fueron constantemente bajas se hasta el día 42, donde se presentó una ligera elevación. La plata fue eliminada primordialmente por esta vía.

Loeschner y colaboradores reportaron que la vía principal de excreción de plata posterior a la administración oral de nanopartículas de plata estabilizadas con polivinilpirrolidona fue por heces, por orina se excretó menos del 1% ⁽⁸⁷⁾.

Evaluación de las ratas

Con respecto a los ingresos de agua y alimentos y los egresos de heces y orina, la ingesta de alimento se redujo los primeros 3 días del estudio en el grupo de ratas expuestas a nanopartículas de plata, sin embargo se recuperó desde el cuarto día del estudio. Al final del estudio no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la ingesta de agua y alimento ni en las cantidades de excreción de heces y orina cuando se comparó con el grupo control.

En los estudios de toxicidad de nanopartículas de plata por vía inhalatoria de las nanopartículas de plata realizados por Sung y colaboradores

^(92,93) y por Ji y colaboradores ⁽¹⁰³⁾, no se observaron efectos importantes ni diferencias estadísticamente significativas en el consumo de alimentos de las ratas expuestas contra el grupo de ratas control. Así mismo en los estudios de exposición oral realizados por Kim y colaboradores ^(88,101) y Lee y colaboradores ⁽¹⁰⁰⁾ no se encontraron diferencias significativas en el consumo de comida y agua o en el peso entre los grupos tratados y el grupo control.

El presente trabajo representa el primer estudio de determinación de los parámetros farmacocinéticos de plata posterior a la administración de nanopartículas de plata por vía intraperitoneal en perros.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

Modelo farmacocinético en perros:

- 1.- La vida media de la plata ($t_{1/2}$) después de la administración de nanopartículas de plata a perros fue 98.5 horas.
- 2.- La $C_{máx}$ fue 291 μ g/dL y se alcanzó a las 6.5 horas ($T_{máx}$), con una ABC_{0-t} de 22931.4 μ g/dL.
- 3.- La plata presentó un fenómeno de redistribución a los 3 días posteriores a la administración de las nanopartículas.

Modelo de distribución y eliminación de plata en ratas:

- 1.- El órgano con mayor concentración de plata fue el bazo.
- 2.- Las nanopartículas de plata atravesaron la barrera hematoencefálica.
- 3.- Se observó daño morfológico inespecífico en hígado, bazo y cerebro.
- 4.- La principal vía de eliminación de la plata principal fue la fecal.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom. *Caltech Engineering and Science*. 23(5):22-36. (1960).
- 2.- Taniguchi N. On the Basic Concept of 'Nano-Technology.' *Proceedings of International Conference on Precision Engineering, Tokyo*. Part II. Society of Precision Engineering. 18-23. Japan. (1974).
- 3.- Drexler KE. *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*. Anchor Books, New York. (1986).
- 4.- Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, et al. C60-The Third Man. *Nature*. (318):162-3. (1985).
- 5.- *Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties*. Final report. Chapter 2. Royal Society and Royal Academy of Engineering. UK. (2004).
- 6.- *Definition of Nanotechnology*. US Environmental Protection Agency. Chapter 1. USA.

- 7.- Alagarasi A. *Introduction to Nanomaterials*. Department of Science and Technology. National Center for Catalysis Research. Government of India. <http://www.nccr.iitm.ac.in/2011.pdf> (2011).
- 8.- Freitas RA. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. *International Journal of Surgery*. 3(4):243-246. (2005).
- 9.- Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Current Opinion in Biotechnology*. (18):26-30. (2007).
- 10.- Halberstandt C, Emerich DF, Gonsalves K. Nano to the Meso Scale Influence on Cell Transplantation. *Discov Med*. 6(36):234-238. (2006).
- 11.- Horikoshi S, Serpone N. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*. First Edition. Chapter 1. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. (2013).
- 12.- Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*. 3(6). <http://www.jnanobiotechnology.com/content/3/1/6> (2005).

- 13.- Gaucher G, Asahina K, Wang J, et al. Effect of Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as Coating Agent on the Opsonization, Phagocytosis, and Pharmacokinetics of Biodegradable Nanoparticles. *Biomacromolecules*. (10):408-416. (2009).
- 14.- Oberdörster G. Biokinetics and Effects of Nanoparticles. *Environ Health Perspect*. (113):823-839. (2005).
- 15.- Slevin M. *Current Advances in the Medical Application of Nanotechnology*. Bentham e Books. UK. (2012).
- 16.- Barani H, Montazer M, Toliyat T, et al. Synthesis of Ag-liposome nano composites. *Journal of Liposome Research*. 20(4):323–329. (2010).
- 17.- Tacelosky DM, Creecy AE, Shanmugavelandy SS, et al. Calcium Phosphosilicate Nanoparticles for Imaging and Photodynamic Therapy of Cancer. *Discov Med*. 13(71):275-85. (2012).
- 18.- Schainer D, Martinez LR, Blecher K, et al. Nitric oxide nanoparticles. *Virulence*. 3(1):62-67. (2012).

- 19.- Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*. (33):139-148. (2007).
- 20.- Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, et al. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (61):869-876. (2008).
- 21.- Potera C. Nanomaterials: Transformation of Silver Nanoparticles in Sewage Sludge. *Environ Health Perspect*. 118(12): A526-A527. (2010).
- 22.- Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*. (6):681-688. (2010).
- 23.- Karmakar S, Kundu S, Kundu K. Bioconversion of Silver Salt into Silver Nanoparticles Using Different Microorganisms. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. (38):259-266. (2010).
- 24.- Birla SS, Tiwari VV, Gade AK. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*. (48):173-179. (2009).

- 25.- Henglein A. Colloidal Silver Nanoparticles: Photochemical Preparation and Interaction with O₂, CCl₄, and Some Metal Ions. *Chem Mater.* (10):444-450. (1998).
- 26.- Heckel JC, Farhan FF, Chumanov G. The effect of fructose derived carbon shells on the plasmon resonance and stability of silver nanoparticles. *Colloid Polym Sci.* (286):1545-1552. (2008).
- 27.- Lesnichaya MV, Aleksandrova GP, Feoktistova LP, et al. Silver-containing nanocomposites based on galactomannan and carrageenan: synthesis, structure, and antimicrobial properties. *Russ Chem Bull, Int Ed.* 59(12):2323-2328. (2010).
- 28.- Sreeram KJ, Nidhin M, Nair BU. Microwave assisted template synthesis of silver nanoparticles. *Bull Mater. Sci.* 31(7):937-942. (2008).
- 29.- Rutberg FG, Dubina MV, Kolikov VA, et al. Effect of Silver Oxide Nanoparticles on Tumor Growth in Vivo. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* (421):191-193. (2008).
- 30.- Aguilar-Méndez MA, San Martín-Martínez E, Ortega-Arroyo L, et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles: effect on phytopathogen *Colletotrichum gloesporioides*. *Nanopart Res.* (13):2525-2532. (2011).

- 31.- Mastro MA, Hardy AW, Boasso A, et al. Non-toxic inhibition of HIV-1 replication with silver-copper nanoparticles. *Med Chem Res.* (19):1074-1081. (2010).
- 32.- Ghosh SK, Kundu S, Mandal M, et al. Studies on the evolution of silver nanoparticles in micelle by UV-photoactivation. *Journal of Nanoparticle Research.* (5):577-587. (2003).
- 33.- Tong MC, Chen W, Sun J, et al. Dithiocarbamate-Capped Silver Nanoparticles. *J Phys Chem B.* (110):19238-19242. (2006).
- 34.- Vysotsky VV, Uryupina OY, Roldughin VI, et al. Formation of Silver Nanoparticles in Aqueous Carboxymethyl Cellulose Solutions and the Evolution of their Sizes. *Colloid Journal.* 71(2):156-162. (2009).
- 35.- Wu JT, Hsu SLC. Preparation of triethylamine stabilized silver nanoparticles for low-temperature sintering. *J Nanopart Res.* (13):3877-3883. (2011).
- 36.- Kheybari S, Samadi N, Hosseini SV, et al. Synthesis and antimicrobial effects of silver nanoparticles produced by chemical reduction method. *DARU.* 18(3):168-172. (2010).

- 37.- Cao XL, Cheng C, Ma YL, et al. Preparation of silver nanoparticles with antimicrobial activities and the researches of their biocompatibilities. *J Mater Sci: Mater Med.* (21):2861-2868. (2010).
- 38.- Huang L, Zhai ML, Long DW, et al. UV-induced synthesis, characterization and formation mechanism of silver nanoparticles in alkali carboxymethylated chitosan solution. *J Nanopart Res.* (10):1193-202. (2008).
- 39.- Garza-Ocañas L, Ferrer DA, Burt J, et al. Biodistribution and long-term fate of silver nanoparticles functionalized with bovine serum albumin in rats. *Metallomics.* (2):204-210. (2010).
- 40.- Cruz-Montufar MG, Flores-Estrada J, López Tellez G. Nanopartículas de plata soportadas en una matriz biopolimérica. *X Congreso Nacional de Microscopía.* Morelia. (2010).
- 41.- Shirokova LN, Alexandrova VA, Egorova EM, et al. Macromolecular Systems and Bactericidal Films Based on Chitin Derivatives and Silver Nanoparticles. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 45(4):380-383. (2009).
- 42.- Thomas V, Yallapu MM, Sreedhar B, et al. Fabrication, Characterization of Chitosan/Nanosilver Film and Its Potential Antibacterial Application. *Journal of Biomaterials Science.* (20):2129-2144. (2009).

- 43.- Kumar SA, Abyaneh MK, Gosavi SW, et al. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. *Biotechnol Lett.* (29):439-445. (2007).
- 44.- Saifuddin N, Wong CW, Nur Yasumira AA. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation. *E-Journal of Chemistry.* (6): 61-70. (2009).
- 45.- Pugazhenthiran N, Anandan S, Kathiravan G, et al. Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus sp.* *J Nanopart Res.* 11(7):1811-1815. (2009).
- 46.- Sintubin L, De Windt W, Dick J, et al. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol.* (84):741-749. (2009).
- 47.- Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: NBM.* (5):452-456. (2009).
- 48.- Kathiresan K, Alikunhi NM, Pathmanaban SM, et al. Analysis of antimicrobial silver nanoparticles synthesized by coastal strains of *Escherichia coli* and *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol.* (56):1050-1059. (2010).

49.- Verma VC, Kharwar RN, Gange AC. Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus *Aspergillus clavatus*. *Nanomedicine*. 5(1):33-40 (2010).

50.- Gurunathan S, Raman J, Abd Malek SN, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*. (8):4399-4413. (2013).

51.- Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: NBM*. (5):382-386. (2009).

52.- Chen JC, Lin ZH, Ma XX. Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of *Phoma* sp.3.2883 with silver nitrate. *Letters in Applied Microbiology*. (37):105-108 (2003).

53.- Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T, et al. Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Journal of Nanobiotechnology*. (9):43. <http://www.jnanobiotechnology.com/content/pdf/1477-3155-9-43.pdf>. (2011).

- 54.- Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst Eng.* (32):79-84. (2009).
- 55.- Velmurugan P. Pine cone-mediated green synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against agricultural pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(1):361-8 (2013).
- 56.- Elumalai EK, Lee SM, lydroose M, et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities. *J Pharm Sci & Res.* 2(9):549-554. (2010).
- 57.- Linga Rao M, Savithramma N. Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using *Svensonia Hyderabadensis* Leaf Extract and Evaluation of their Antimicrobial Efficacy. *J Pharm Sci & Res.* 3(3):1117-1121. (2011).
- 58.- López Iturbe J, Vilchis Nestor AR, Sánchez Mendieta V, et al. Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón. *Superficies y Vacío.* 26(3):73-78. (2013).
- 59.- Harris AT, Bali R. On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *J Nanopart Res.* (10):691-695. (2008).

- 60.- Kędziora A, K. Gorzelańczyk, G. Bugla-Płoskońska. Positive and Negative Aspects of Silver Nanoparticles Usage. *Biology International*. (53):67-76. (2013).
- 61.- Pal S, Tak YK, Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*. 73(6):1712-1720. (2007).
- 62.- Bae E, Park HJ, Yoon J. Bacterial uptake of silver nanoparticles in the presence of humic acid and AgNO₃. *Korean J Chem Eng*. 28(1):267-271. (2011).
- 63.- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 28(11):580-588. (2010).
- 64.- Kwan KHL, Liu X, To MKT, et al. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine: NBM*. (7):497-504. (2011).
- 65.- Tian J, Wong KKY, Ho CM, et al. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *Chem Med Chem*. (2):129-136. (2007).

66.- Li WR, Xie XB, Shi QS, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (85):1115-1122. (2010).

67.- Bae E, Park HJ, Lee J, et al. Bacterial cytotoxicity of the silver nanoparticle related to physicochemical metrics and agglomeration properties. *Environ Toxicol Chem.* 29(10):2154-2160. (2010).

68.- Marius S, Lucian H, Marius M, et al. Enhanced antibacterial effect of silver nanoparticles obtained by electrochemical synthesis in poly(amide-hydroxyurethane) media. *J Mater Sci: Mater Med.* (22):789-796. (2011).

69.- Jung R, Kim Y, Kim HS, et al. Antimicrobial Properties of Hydrated Cellulose Membranes with Silver Nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science.* (20):311-324. (2009).

70.- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver Nanoparticles. *Nanotechnology.* (16):2346-2353. (2005).

71.- Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology.* 30(10):499-511. (2012).

- 72.- Kim KJ, Sung WS, Moon SK. Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol.* 18(8):1482-1484. (2008).
- 73.- Galdiero S, Falanga A, Vitiello M. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Molecules.* (16):8894-8918. (2011).
- 74.- Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Garza Treviño EN, et al. Use of silver nanoparticles increased inhibition of cell-associated HIV-1 infection by neutralizing antibodies developed against HIV-1 envelope proteins. *Journal of Nanobiotechnology.* 9(38). <http://www.jnanobiotechnology.com/content/9/1/38> (2011).
- 75.- Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Garza Treviño EN, et al. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *Journal of Nanobiotechnology.* (8)15. <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/15> (2010).
- 76.- Panyala NR, Peña-Méndez EM, Havel J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health. *J Appl Biomed.* (6):117-129. (2008).

77.- Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, et al. Cytotoxicity of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *BioMed Research International*. Vol 2013. Article ID 535796. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/535796> (2013).

78.- Gunasekaran T, Nigusse T, Dhanaraju MD. Silver Nanoparticles as Real Topical Bullets for Wound Healing. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*. 3(4):82-96. (2012).

79.- Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, et al. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*. (255):33-37. (2009).

80.- Aramwit P, Muangman P, Namviriyachote N, et al. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Effectiveness and Moisture Binding Properties of Wound Dressings. *Int J Mol Sci*. (11):2864-2874. (2010).

81.- Kokura S, Handa O, Takagi T, et al. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: NBM*. (6):570-574. (2010).

82.- Furno F, Morley KS, Wong B, et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (54):1019-1024. (2004).

- 83.- Galiano K, Pleifer C, Engelhardt K, et al. Silver segregation and bacterial growth of intraventricular catheters impregnated with silver nanoparticles in cerebrospinal fluid drainages. *Neurological Research*. (30):285-287. (2008).
- 84.- Antonelli M, De Pascale G, Ranieri VM, et al. Comparison of triple-lumen central venous catheters impregnated with silver nanoparticles (AgTive®) vs conventional catheters in intensive care unit patients. *Journal of Hospital Infection*. 82(2):101-107. (2012).
- 85.- Secinti KD, Özalp H, Attar A, et al. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *Journal of Clinical Neuroscience*. (18):391-395. (2011).
- 86.- AshaRani PV, Prakash Hande M, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*. 10(65). <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/10/65> (2009).
- 87.- Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol*. (8)18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3123173/pdf/1743-8977-8-18.pdf> (2011).

- 88.- Kim YS, Song MY, Park JD, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* (7)20. <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/pdf/1743-8977-7-20.pdf> (2010).
- 89.- Sardari RRR, Zarchi SR, Talebi A, et al. Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. *African Journal of Microbiology Research.* 6(27):5587-5593. (2012).
- 90.- Małaczewska J. Effect of silver nanoparticles on splenocyte activity and selected cytokine levels in the mouse serum. *Bull Vet Inst Pulawy.* (55):317-322. (2011).
- 91.- Małaczewska J. The effect of silver nanoparticles on splenocyte activity and selected cytokine levels in the mouse serum at early stage of experimental endotoxemia. *Polish Journal of Veterinary Science.* 14(4):597-604. (2011).
- 92.- Sung JH, Ji JH, Song KS, et al. Acute inhalation toxicity of silver. *Toxicology and Industrial Health.* 27(2):149-154. (2011).
- 93.- Sung JH, Ji JH, Park JD, et al. Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. *Toxicological Sciences.* 108(2):452-461. (2009).

- 94.- De Jong WH, Van Der Ven LTM, Sleijffers A, et al. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials*. (34):8333-8343. (2013).
- 95.- Tang J, Xiong L, Wang S, et al. Distribution, Translocation and Accumulation of Silver Nanoparticles in Rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 9(8):4924-4932. (2009).
- 96.- Martinez-Gutierrez F, Thi EP, Silverman JM, et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*. (8):328-336. (2012).
- 97.- Kim YJ, Yang SI, Ryu JC. Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian. *Mol Cell Toxicol*. 6(2):119-125. (2010).
- 98.- Marovac J. Investigation and development of new medications: from the molecule to drug. *Rev Med Chil*. 129(1):99-106. (2001).
- 99.- Roper WL. Toxicological profile for silver. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*. Chapter 2. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp146.pdf>. USA. (1990).

100.- Lee JH, Kim YS, Song KS, et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague–Dawley rats. *Part Fibre Toxicol.* (10)36. <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/10/1/36>. (2013).

101.- Kim YS, Kim JS, Cho HS, et al. Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhalation Toxicology.* 20(6):575-583. (2008).

102.- Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, et al. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol.* 4(10). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2146996/pdf/1743-8977-4-10.pdf>. (2007).

103.- Ji JH, Jung JH, Kim SS, et al. Twenty-Eight-Day Inhalation Toxicity Study of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhalation Toxicology.* 19(10):857-871. (2007).

104.- Lankveld DPK, Oomen AG, Krystek P, et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials.* 31(32):8350-8361. (2010).

- 105.- Park EJ, Bae E, Yi J, et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 30(2):162-168. (2010).
- 106.- Haase A, Tentschert J, Jungnickel H, et al. Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: uptake, intracellular distribution and cellular responses. *Journal of Physics: Conference Series*. 304(1). http://iopscience.iop.org/1742-6596/304/1/012030/pdf/1742-6596_304_1_012030.pdf. (2011).
- 107.- Cha K, Hong HW, Choi YG, et al. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol Lett*. 30(11):1893-1899. (2008).
- 108.- Costa CS, Vieira Ronconi JV, Felipe Daufenbach J, et al. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol Cell Biochem*. (342):51-56. (2010).
- 109.- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*. (19):975-983. (2005).