



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: Aplicaciones biomédicas de las  
nanopartículas de plata**

Autor: Ortego Casado, David

Fecha: Febrero de 2020

Tutor: Maria Victoria Cabañas Criado

## ÍNDICE

1.Resumen.....	2
2. Introducción y antecedentes.....	2
3.Objetivos.....	3
4. Materiales y métodos.....	4
5.Resultados y discusión.....	4
5.1. Síntesis de nanopartículas de plata.....	4
5.2 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata.....	5
5.3 Farmacocinética de las nanopartículas de plata.....	12
5.4 Toxicidad de las nanopartículas de plata.....	14
6.Conclusiones.....	15
7.Bibliografía.....	15

## 1.RESUMEN

La nanotecnología está cobrando poco a poco más importancia en el campo de la investigación. Dentro de este amplio tema se encuentran las nanopartículas de plata (AgNPs), las cuales destacan por sus múltiples aplicaciones, tener una síntesis bien establecida y su elevada disponibilidad en la corteza terrestre. En cuanto a las aplicaciones biomédicas, este trabajo se centra en su uso como antimicrobianos, antitumorales y en el campo de la terapéutica. Las AgNPs pueden usarse como antimicrobianos, tanto para virus como para hongos y bacterias. Además, presentan actividad antitumoral, siendo el principal mecanismo de destrucción de células tumorales la formación de especies reactivas de oxígeno y la inducción de la apoptosis. Por último, han demostrado ser eficaces para su uso en terapéutica, mediante la funcionalización de la nanopartícula. Se han llevado a cabo estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo* en ratones y peces, entre otros, y se han visto efectos nocivos en diversos órganos tales como hígado, riñón o cerebro al administrarlas por vía intracraneal, intravenosa e intraperitoneal. Sin embargo, algunos investigadores han obtenido resultados en los cuales no se observaban reacciones adversas sobre las células/sujetos control. A pesar de ser necesarios más estudios, es posible visualizar el enorme potencial que tendrán en el futuro las AgNPs en el mundo de la biomedicina.

## 2.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Recientemente, con la búsqueda de nuevas sustancias para la mejora de los tratamientos, las nanopartículas (NPs) han ido ganando importancia en el campo de la investigación. Como NPs se entiende aquellas partículas cuyo tamaño está entre 1-100nm. Algunos ejemplos con aplicaciones biomédicas son los liposomas, nanotubos de carbono, fullerenos, NPs metálicas de plata o de oro, etc <sup>(1)</sup>.

Las NPs presentan propiedades únicas que derivan de su pequeño tamaño. Son, su facilidad para controlar el tamaño y la forma de la partícula, propiedades ópticas y fototérmicas y la capacidad para funcionalizar su superficie <sup>(2)</sup>. También tienen la capacidad de actuar tanto en el exterior como en el interior celular, interactuando con estructuras como el ADN, proteínas intracelulares y virus <sup>(2)</sup>, siendo así una herramienta potencial para el tratamiento de patologías como el cáncer o infecciones resistentes a antimicrobianos <sup>(3)</sup>.

La funcionalización de una NP (Figura 1) puede ser por uniones del metal con grupos tiol, uniones covalentes entre el metal y átomos de carbono, usando sales de diazonio como precursores, mediante enlaces con átomos de carbono o nitrógeno y también por uniones amina o carboxilo, entre otros <sup>(4)</sup>. Ello permite, por un lado, hacer que vaya preferentemente a determinadas zonas del organismo y por otro, la unión de agentes espaciadores, como el polietilenglicol (PEG), a los cuales se pueden unir fármacos que luego se liberan de la NP debido a distintos estímulos <sup>(5)</sup>. Por último, también se pueden unir agentes que permiten la detección de las nanopartículas <sup>(1)(6)</sup>.

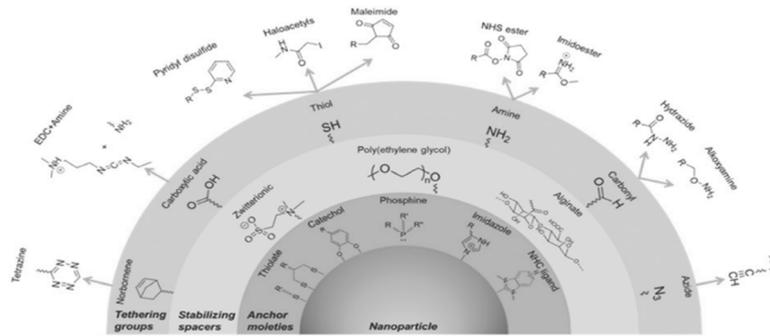


Figura 1. Funcionalización de las nanopartículas (4)

Las propiedades ópticas de las NPs metálicas permiten utilizarlas como sensores de alta especificidad y/o sensibilidad con aplicaciones a nivel de diagnóstico de enfermedades, monitorización del fármaco una vez en el organismo o en terapéutica en un futuro (3)(7).

Las propiedades fototérmicas de las NPs metálicas permiten transformar la luz en calor, siendo útil en terapias de ablación de tejidos asistidas por láser (2). Dentro de las propiedades fototérmicas, se encuentra la actividad/terapia fotodinámica (PDT) (Figura 2). Dicha terapia consiste en incidir luz de una determinada longitud de onda en un agente fotosensitivo (AF) el cual pasa de un estado no excitado o fundamental a uno excitado y al volver al estado fundamental, liberar energía que se transfiere al oxígeno generando en última instancia especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales producen daño celular (8)(9).

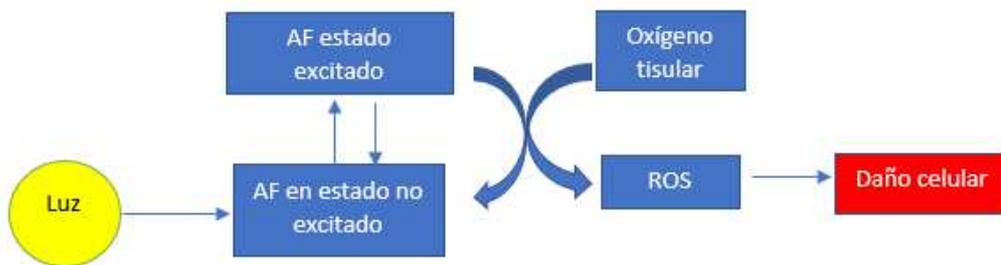


Figura 2. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica (PDT).

Dentro del mundo de las NPs, la plata es conocida a nivel mundial por su efecto antimicrobiano. Este se ha aprovechado durante mucho tiempo en el ámbito sanitario, industria cosmética, textil, empaquetamiento de alimentos, etc (10). De este efecto pueden derivar múltiples aplicaciones en el campo de la biomedicina, como son el tratamiento de infecciones o recubrimiento de materiales para así evitar la formación de biofilms. También se ha propuesto su uso como alternativa en terapias para el cáncer por sus efectos tóxicos sobre las células (4)(11). En comparación con otros metales nobles, sus rutas de síntesis son bien conocidas y establecidas, existe en grandes cantidades en la corteza terrestre y presenta un mejor perfil de seguridad (4).

### 3.OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión de la información más actual acerca de algunas aplicaciones biomédicas de las AgNPs, como son sus propiedades antimicrobianas y antitumorales. Se realizará una revisión acerca de cómo se sintetizan y qué toxicidad pueden

presentar en el ser humano, animales y medio ambiente. Se estudiará la información más actual sobre su farmacocinética en el ser humano.

#### 4. METODOLOGÍA:

A la hora de elaborar el trabajo se procedió a realizar una búsqueda en bases de datos como pubmed, en la cual se escribieron las palabras clave nanopartículas, plata, aplicaciones biomédicas, antimicrobianos, biofilms, antitumorales, toxicidad y farmacocinética. Una vez tenidos los resultados, se acotó la búsqueda al seleccionar el apartado de sólo *reviews* y se puso como fecha límite de antigüedad 10 años.

Al escribir en pubmed aplicaciones biomédicas de nanopartículas de plata se tuvo como resultado de búsqueda un total de 742 artículos, al seleccionar el formato *review* y de los últimos 10 años, el número de artículos se redujo a 91, de entre ellos se fue eligiendo aquellos que tenían más interés para la elaboración de este trabajo con formato *review*.

Para algunos apartados, también se utilizó la base de datos de la Universidad Complutense, así como páginas web tales como AS/DS (American Society for Dermatologic Surgery), NIH (National Human Genome Research Institute) o ResearchGate.

#### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 5.1 Síntesis de nanopartículas de plata

Existen principalmente dos formas de síntesis AgNPs denominadas Top-Down y Bottom-Up <sup>(12)</sup>(Figura 3). La forma Top-Down consiste en partir de plata en *bulk* e ir reduciendo su tamaño de partícula hasta la escala nanométrica. Para ello se usan métodos físicos, que consisten en técnicas cuyo objetivo es cortar, moler y moldear hasta obtener el tamaño y la forma deseada, para luego estabilizar dichas partículas mediante la adición de agentes coloidales <sup>(8)(13)</sup>. Como resultado se obtiene NPs con una forma irregular y no uniforme <sup>(12)</sup>. Es un proceso de síntesis lento, complejo y su coste de fabricación es elevado, necesita una gran cantidad de energía y presenta un bajo rendimiento <sup>(12)(14)</sup>.

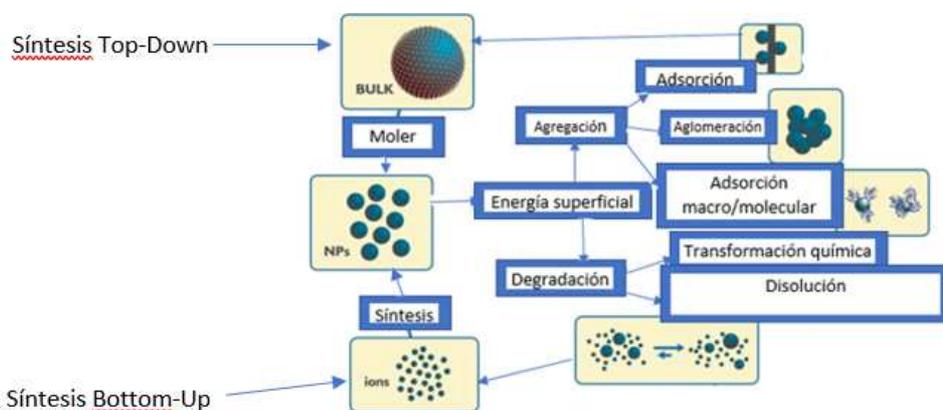


Figura 3. Mecanismo de síntesis de nanopartículas de plata e inestabilidad de las mismas <sup>(15)</sup>.

La síntesis Bottom-Up consiste en el ensamblaje de pequeñas estructuras para dar una de mayor tamaño, ya sea átomo con átomo, molécula con molécula o núcleos con núcleos. Para ello se utilizan métodos químicos <sup>(12)(14)</sup>. Es un método simple, barato y presenta una alta velocidad de producción, pudiendo obtener una gran cantidad de NPs en un corto periodo de tiempo. Para ello se parte de tres componentes, un precursor de plata, por ejemplo, nitrato de plata, que aporte iones plata, un agente reductor para pasar de  $Ag^+$  a  $Ag^0$  y un estabilizante <sup>(12)</sup>.

Por último, está la síntesis verde, es una alternativa a los métodos tradicionales de síntesis. Consiste en la formación de NPs utilizando agentes biológicos como microorganismos o extractos de plantas. Es un método más barato, respetuoso con el medio ambiente, de fácil escalado y que no requiere de elevadas temperaturas, energía o uso de agentes químicos tóxicos en comparación con los métodos anteriores <sup>(7)(13)</sup>.

Dado que existen muchos procesos en general que no son respetuosos con el medio ambiente y dado que esta forma de síntesis sí lo es, se debería, en lo posible, disminuir el uso de técnicas de síntesis contaminantes y empezar a utilizar métodos de síntesis menos dañinos para el ecosistema, como es el caso de la síntesis verde.

## 5.2 Aplicaciones biomédicas de nanopartículas de plata

### Efecto antimicrobiano

Una aplicación de gran interés para la biomedicina es el uso de AgNPs como antimicrobianos <sup>(2)(14)</sup>. Las AgNPs presentan actividad frente a bacterias, algunos virus, como el de la hepatitis B, el virus respiratorio sincitial y el virus del herpes simple tipo 1 entre otros, y frente a hongos <sup>(16)</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo, el foco de atención estará en el efecto antibacteriano. Existen distintos mecanismos posibles por los cuales las AgNPs ejercen su actividad (Figura 4), pero el mecanismo exacto es todavía desconocido <sup>(3)(14)(17)(18)</sup>. Los más aceptados son:

- 1) Anclaje a la pared bacteriana y entrada al interior produciendo alteraciones estructurales, por ejemplo, alteración de la permeabilidad, causando la muerte de la bacteria <sup>(14)</sup>.
- 2) Interacción de la AgNP (y del ion  $Ag^+$ ) con proteínas o estructuras que contienen sulfuro, como las de la membrana o del ADN <sup>(3)</sup> produciendo muerte celular <sup>(17)</sup>.
- 3) Formación de ROS al liberar en el interior celular iones  $Ag^+$  que dañan la membrana celular, generando poros y causando la muerte celular <sup>(14)</sup>.

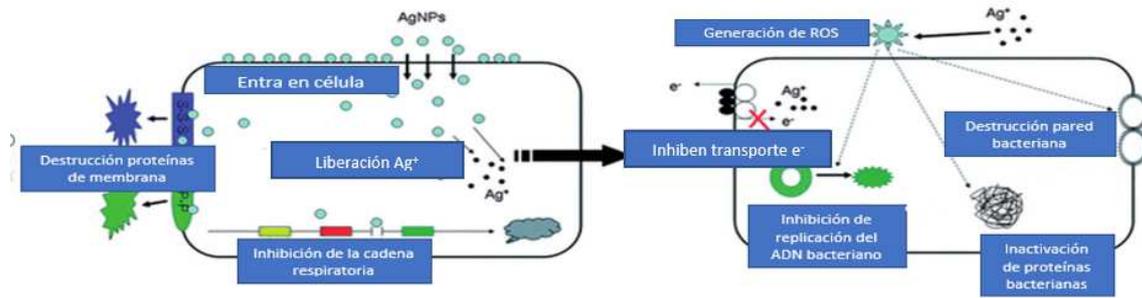


Figura 4. Mecanismos de acción de las nanopartículas de plata <sup>(3)</sup>.

La acción bactericida de las NPs depende, entre otros factores de la superficie específica, y por tanto del tamaño y de la forma de la NP <sup>(17)</sup>. Cuanto menor es el tamaño de la NP mayor es su superficie y, por tanto, mayor es la interacción con el microorganismo. En cuanto a la forma, las triangulares han demostrado una mayor actividad bactericida que las de forma esférica o alargadas. Pal y colaboradores <sup>(19)</sup> observaron una completa inhibición del crecimiento bacteriano con AgNPs de forma triangular con dosis de 1  $\mu\text{g}$ , mientras que las AgNPs esféricas necesitaron estar en una dosis de 100  $\mu\text{g}$  para obtener los mismos resultados y las alargadas aun en una dosis de 100  $\mu\text{g}$  no consiguieron evitar el total crecimiento bacteriano en las placas <sup>(19)</sup>.

Dentro del ámbito biomédico, la plata ha destacado en el tratamiento de infecciones asociadas a quemaduras o heridas. Hoy en día se está investigando su uso como una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos <sup>(14)</sup> o para evitar la formación de biofilms <sup>(17)</sup>. Un biofilm está formado por una agrupación bacteriana localizada en el interior de una matriz polimérica, producida por las propias bacterias, que permite adherirse a una superficie <sup>(17)</sup>. Los biofilms presentan una elevada resistencia a la acción de los antibióticos y al sistema inmune humano <sup>(20)</sup>. Por tanto, las bacterias que forman parte del biofilm son muy difíciles de eliminar. Debido a esto, suponen un gran problema en el ámbito de la medicina y la búsqueda de nuevas terapias es de vital importancia <sup>(21)(22)</sup>. Como ejemplos de bacterias formadoras de biofilms destacan algunas capaces de producir diversas patologías de mayor o menor gravedad o que se encuentran frecuentemente en el ambiente como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros <sup>(21)</sup>.

La formación de biofilms en materiales sanitarios tales como catéteres, implantes dentales, válvulas cardíacas, lentes de contacto, implantes mamarios, etc es frecuente <sup>(20)</sup>. Una vez formado el biofilm tanto en el dispositivo médico como en el organismo, las bacterias pueden desprenderse del mismo para generar infecciones en el individuo o diseminarse a otros órganos <sup>(20)</sup>. La resistencia que presentan los biofilms a ser eliminados puede deberse a una mala penetración del antibacteriano en la matriz polimérica, a una alteración en el microambiente del biofilm, impidiendo la actuación del antibiótico, o por determinadas respuestas por parte de las bacterias que lo componen. Debido a ello, el antibiótico es hasta mil veces menos eficaz en comparación con aquellas bacterias que no forman estas estructuras <sup>(17)</sup>.

Existen dos tipos de terapias para prevenir o eliminar este tipo de infecciones asociadas al uso de dispositivos médicos. Por un lado, la utilización de agentes que tienen acción bactericida o bacteriostática y por otro, el uso de biomateriales capaces de impedir la adhesión bacteriana en el dispositivo (primera fase en la formación del biofilm) <sup>(22)</sup>. Las AgNps se encuentran dentro del primer grupo, actúan como antimicrobianos. Para conseguir evitar la formación de biofilms, se recubre el dispositivo médico. Se puede recubrir con antibióticos, sin embargo se ha visto que pueden aparecer resistencias, incluso, Hoffman y colaboradores <sup>(23)</sup> vieron una inducción de la formación de biofilms con el uso de determinados antibióticos a concentraciones menores a la inhibitoria <sup>(23)</sup>. Sin embargo, al usar como recubrimiento las AgNPs se ha conseguido prevenir la formación de biofilms por patógenos como *E. coli*, *Enterococcus*, *S. aureus* y *estafilococos coagulasa negativos* <sup>(22)</sup>.

Los avances en el recubrimiento y la investigación de las AgNPs han permitido poder empezar a realizar ensayos clínicos. Destacan como ejemplo los catéteres y apósitos que contienen AgNPs, así como mascarillas para las cirugías <sup>(17)</sup>.

Para lograr una mayor acción bactericida, las AgNPs se pueden combinar con otros agentes antimicrobianos (demostrándose un efecto sinérgico), como antibióticos, donde se ha visto una gran eficacia al combinarlas con vancomicina, amoxicilina y penicilina G frente a *S.aureus* <sup>(24)</sup> y estreptomicina <sup>(17)</sup>. El efecto sinérgico también se ha podido comprobar con agentes distintos a antibióticos, tales como lactoferrina o xilitol, lipopéptidos y quitosano <sup>(24)</sup>.

Con la posibilidad del uso de AgNPs como antimicrobianos, surge la gran duda: ¿pueden las bacterias desarrollar resistencia frente a este agente? Según afirma Markowska y colaboradores <sup>(17)</sup>, se ha observado una transmisión horizontal de genes a través de plásmidos, que contienen información para la síntesis de proteínas capaces de expulsar al medio extracelular los iones de plata. Sin embargo, Pal y colaboradores <sup>(19)</sup> defienden que es poco probable que los microorganismos desarrollen resistencias frente a las AgNPs, ya que, puesto que tienen una gran variedad de mecanismos bactericidas, es muy difícil que sean resistentes frente a todos ellos. A pesar de todo, parece existir un consenso en que, las bacterias, en caso de desarrollar resistencia, esta ocurre de forma lenta y hasta la fecha no supone una gran preocupación <sup>(17)(19)</sup>.

### Efecto antitumoral

Un tumor se define como un crecimiento, diferenciación y migración de células a otras zonas del cuerpo de forma descontrolada generando en última instancia una masa maligna <sup>(25)</sup>. Es considerado la segunda causa de muerte a nivel mundial, siendo cada vez mayor el número de personas diagnosticadas con cáncer cada año <sup>(26)(27)</sup>. Uno de los grandes retos en las terapias para el cáncer es conseguir que el anticancerígeno llegue de forma selectiva a la zona tumoral y únicamente ejerza su efecto en células tumorales.

Los tratamientos actuales para el cáncer se basan en el uso de radiación, quimioterapia y cirugía <sup>(27)</sup>. Estos, a pesar de haber mejorado en los últimos años, presentan una serie de problemas, tales como la dificultad o imposibilidad para acceder al lugar de acción, la elevada toxicidad para el paciente, ya que se destruyen tanto las células tumorales como las células sanas, y la

aparición de resistencias <sup>(25)</sup>. Un ejemplo dentro de la quimioterapia es el uso del paclitaxel y la doxorubicina. Son dos fármacos cuyo mecanismo de acción consiste en la inducción de la apoptosis de aquellas células cuya división es demasiado rápida. Sin embargo, también destruyen aquellas células que, en condiciones fisiológicas se dividen rápidamente <sup>(28)</sup>. Dado que la quimioterapia es un tratamiento a nivel sistémico, la aparición de reacciones adversas es inevitable <sup>(28)</sup>. Dichas desventajas promueven la búsqueda por parte de la comunidad científica de alternativas terapéuticas más eficaces y menos lesivas para los pacientes <sup>(27)</sup>.

Ante esta situación, la nanotecnología entra en juego, siendo potencialmente capaz de solventar los problemas de las terapias convencionales, disminuyendo los efectos secundarios y siendo más eficiente. En comparación con la quimioterapia, la nanotecnología soluciona el problema de la solubilidad de los fármacos. Por ejemplo, el paclitaxel presenta una baja solubilidad en medio acuoso, lo cual hace que la formulación resultante sea muy inestable. Una posible solución es encapsular el fármaco en una NP, mejorando así, no sólo su solubilidad en agua sino también su biodisponibilidad. También disminuye su metabolización y controla la toxicidad que puede producir el fármaco en tejidos sanos adyacentes <sup>(27)</sup>. Otras ventajas de la nanotecnología frente a algunas terapias convencionales, como la inmunoterapia, es la ausencia de resistencias <sup>(29)</sup>. Mientras que en la inmunoterapia, al usar fármacos de origen biológico pueden aparecer anticuerpos frente a ellos, las NPs no inducen su formación <sup>(29)</sup>. Además, al presentar un tamaño pequeño, permite una mejor entrada en las células tumorales, siendo buenas candidatas para su utilización como agentes transportadores de fármacos antitumorales <sup>(27)</sup>. También son capaces de atravesar barreras biológicas <sup>(27)</sup>, característica que puede aprovecharse para que, a través del sistema circulatorio, puedan llegar a zonas concretas del organismo y liberar el agente antitumoral, de forma que el efecto es localizado, en vez de ser a nivel sistémico.

La nanotecnología se ha planteado una serie de objetivos para la mejora de las terapias antitumorales, como por ejemplo aumentar la eficiencia con la que el principio activo accede a la zona tumoral, disminuyendo así la toxicidad. Por otro lado, busca que haya una mayor especificidad, es decir, que únicamente actúe en las células tumorales y no en las células sanas, así como mejorar la estabilidad, solubilidad y vida media de los fármacos <sup>(27)</sup>. Además busca promover la liberación del agente antitumoral mediante la acción de un estímulo, ya sea interno o externo y por último mejorar el diagnóstico de tumores, punto de vital importancia para aumentar la esperanza de vida del paciente <sup>(29)</sup>.

Es importante destacar algunas características que presentan los tumores, pero no las células ni los tejidos sanos como son un flujo sanguíneo anómalo, la falta de oxígeno, la distinta actividad redox y las enzimas presentes en el tejido tumoral. Tales características se pueden aprovechar para aumentar la selectividad de los tratamientos <sup>(26)</sup>. En cuanto al flujo sanguíneo, mientras que la angiogénesis es un proceso que ocurre de forma fisiológica en procesos inflamatorios, regeneración tisular y cicatrización <sup>(28)</sup>, en los tumores y otras patologías como la artritis, obesidad o arterioesclerosis ocurre de forma descontrolada. Este recubrimiento vascular, el cual se caracteriza por ser muy caótico, es fundamental para el desarrollo de los tumores sólidos y es tal su importancia que de no generarse nuevos vasos, no puede seguir creciendo más allá de un determinado tamaño <sup>(28)</sup>.

Por otro lado, dado su rápido crecimiento, los tejidos tumorales entran en una situación de hipoxia y falta de nutrientes. Esto desencadena la formación de factores pro angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual produce un aumento de la permeabilidad vascular en la región tumoral y en última instancia el desarrollo de la nueva red de capilares alrededor del tumor <sup>(28)</sup>. Dicho aumento de la permeabilidad vascular ha sido asociado a un aumento del tamaño de las células del endotelio vascular tumoral y un mayor espacio intercelular. En los tejidos sanos sin embargo, el espacio intercelular es menor, por lo tanto se puede aprovechar para diseñar estructuras de un tamaño determinado, de forma que sean capaces de pasar a través de dichos espacios aumentados en los tumores pero incapaces de pasar a través de los espacios intercelulares de las regiones sanas, disminuyendo así la toxicidad <sup>(28)</sup>. Además, las zonas tumorales carecen de un sistema linfático, de forma que no se produce un aclaramiento de sustancias y las NPs, con el fármaco, permanecen más tiempo en el tumor, lo cual se traduce en una mayor semivida y duración de efecto <sup>(28)</sup>. Este fenómeno se denomina efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR).

Las AgNPs son un ejemplo de NPs que se están investigando para utilizarlas tanto de forma aislada como en combinación con la quimioterapia para la mejora de los tratamientos frente al cáncer <sup>(30)</sup>. El principal mecanismo, por el cual se sospecha que se debe la acción antitumoral de las AgNPs, es la inducción de la apoptosis, bien por la producción de ROS, por la inhibición de genes anti apoptóticos o por la inducción de la expresión de genes que en última instancia producen la apoptosis celular <sup>(26)(31)(32)</sup>. También son capaces de modular la actividad de la glicoproteína-P al inhibir la expresión de genes encargados de su síntesis <sup>(31)(32)</sup>. La glicoproteína-P es una proteína que actúa como mecanismo de defensa frente a agentes extraños. Su acción consiste en expulsar al exterior compuestos que entran en las células, entre los que se encuentran los fármacos <sup>(33)</sup>. Dicha proteína se encuentra de forma fisiológica en muchos tejidos, pero se sobre expresa en tumores, generando así resistencia frente a distintos agentes quimioterápicos. Yuan y colaboradores <sup>(31)</sup> realizaron ensayos en células HeLa para analizar la capacidad anticancerígena de las AgNPs de forma aislada y en combinación con el agente antitumoral camptotecina (CPT). Los ensayos mostraron una mayor actividad antitumoral en combinación que al usarlo sin las AgNPs, pues se combinaba el efecto de la CPT (inhibición de la topoisomerasa 1) y la enorme producción de ROS por parte de las AgNPs <sup>(34)</sup>. También se ha visto una mayor apoptosis en células de cáncer de ovario al combinarlas con agentes como salinomycin y gentamicin, pues producían un aumento del estrés oxidativo, daño a nivel mitocondrial y la inducción de genes pro apoptóticos e inhibición de genes antiapoptóticos <sup>(31)</sup>.

En otros ensayos *in vitro* realizados por Nuairi y colaboradores <sup>(35)</sup>, se analizó el efecto citotóxico de las AgNPs, sintetizadas a partir del extracto etanólico de la planta *Cyperus conglomeratus*. En dicho ensayo se enfrentó a las NPs por un lado a células provenientes de un cáncer de pecho (MCF-7) y por otro a fibroblastos humanos. Como resultado, se pudo observar una disminución en el número de células MCF-7, mientras que en los fibroblastos no se observó ninguna toxicidad, lo cual es fundamental en los tratamientos anticancerígenos, es decir, que no haya toxicidad en tejidos sanos <sup>(35)</sup>. Shaniba y colaboradores <sup>(36)</sup>, usando la síntesis verde para la obtención de AgNPs, hicieron ensayos *in vitro* en los que se analizaba su potencial anticancerígeno frente a células HeLa, A549 (células procedentes de un carcinoma pulmonar) y HTC116 (células procedentes de un cáncer colorrectal), por un lado enfrentándolas únicamente a AgNPs y por otro combinándolas con cisplatino. Se vio una

inhibición de su proliferación, siendo mayor en las células HTC116, proporcionando evidencia suficiente sobre su efectividad y se propuso su uso en combinación con el cisplatino frente al cáncer colorrectal. Es importante destacar que, en las células control, linfocitos y eritrocitos humanos sanos, no hubo alteraciones de la proliferación ni toxicidad. Ello indica que son menos tóxicas que los tratamientos en los que únicamente se administra un agente quimioterápico.

Otro tipo de tratamiento anticancerígeno es el uso de la radioterapia, sin embargo, esta técnica genera un gran daño a los tejidos sanos circundantes. Para disminuir los efectos adversos, la terapia se fracciona, es decir, en vez de someter al paciente a una sola dosis elevada de radiación, se somete al paciente a dosis más pequeñas y varias veces en el tiempo. El problema de su fraccionamiento es que, en estadios avanzados del carcinoma, la velocidad con la que las células cancerosas se multiplican es mayor a la muerte producida por la radiación administrada. Por lo tanto, se están buscando métodos para que, a dosis bajas de radiación, el tratamiento sea efectivo. Yu y colaboradores<sup>(37)</sup> investigaron el uso de las NPs en combinación con la radioterapia fraccionada. Esta terapia combinada consiste en el aumento de la sensibilidad a la radiación de las células cancerosas, de forma que su velocidad de destrucción sea mayor a su velocidad de multiplicación al aplicar la radiación de forma fraccionada<sup>(37)</sup>. Esta técnica se aplicó en el tratamiento de un carcinoma nasofaríngeo. Para ello sintetizaron AgNPs unidas a un anticuerpo anti receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) denominado C225. EGFR es un receptor cuya sobre expresión es muy frecuente en cánceres tales como el colorrectal o el pulmonar y su presencia está asociado a proliferación y alteración en el metabolismo de células tumorales<sup>(37)</sup>. Al unir las NPs al anticuerpo se consiguen varios efectos. Por un lado, se logra una mayor selectividad, de forma que el compuesto actúa más en zonas tumorales, donde el EGFR se encuentra sobre expresado y menos en tejidos sanos. Por otro lado, al inhibir dicho factor se inhibe el crecimiento tumoral y también se aumenta la sensibilidad a la radiación debido a las AgNPs<sup>(37)</sup>. Como conclusión de la investigación vieron que, en efecto, el compuesto Ag/C225 es un buen radiosensibilizador. El mecanismo exacto por el cual actúa todavía es desconocido. Sin embargo, durante el estudio se vio una inhibición de genes que intervienen en la reparación del ADN, por lo que se puede suponer que el daño causado por la radiación no se corrige y las células tumorales terminan por morir<sup>(37)</sup>.

No sólo se han realizado estudios *in vitro*, sino también se han llevado a cabo ensayos *in vivo*, como el realizado por Sriram y colaboradores<sup>(16)</sup>. El ensayo consistió en la inoculación de células DLA, procedentes de una línea celular del linfoma de Dalton, en ratones para más tarde administrar AgNPs y observar su efecto. En cuanto al diseño del experimento, se dividieron los ratones en 4 grupos con 6 animales en cada grupo. En el primer grupo los ratones no presentaban el tumor y tampoco fueron tratados. El segundo grupo desarrollaron un tumor, pero no fueron tratados. El tercer grupo desarrollaron el tumor y fueron tratados con una solución de AgNPs en una concentración de 500 nM, administradas vía intraperitoneal durante 15 días. El cuarto y último grupo fue un grupo control en el que únicamente se administró una dosis de 500 nM de AgNPs. Como resultado se pudo comprobar una disminución de la viabilidad de las células DLA dependiente de la dosis tras seis horas de tratamiento, ya se pudieron observar sus efectos citotóxicos sobre las células tumorales, disminuyendo su viabilidad al 50%<sup>(6)(16)</sup>. El tratamiento con AgNPs disminuyó el tamaño del

tumor y aumentó la esperanza de vida de los ratones, suponiendo un gran avance en el desarrollo de terapias alternativas en el campo de la oncología <sup>(16)</sup>.

### Teranóstica:

La teranóstica es un término nuevo que se define como la capacidad de diagnosticar y tratar una patología simultáneamente. En el campo de la nanomedicina se utilizan NPs con estos objetivos, de forma que se busca diagnosticar una patología, llevar el fármaco al lugar de acción y monitorizar su efecto a la vez. Ello permite detectar y tratar la enfermedad en menos tiempo <sup>(27)</sup>. Es una técnica aplicable a todo tipo de enfermedades, ya que en la terapéutica siempre se busca la resolución del problema lo más rápido posible, siempre que sea posible resolverlo. Sin embargo, debido a la elevada morbilidad y mortalidad que producen los cánceres, se está investigando su uso principalmente en oncología <sup>(27)</sup>.

Existen una serie de factores fundamentales a la hora de considerar esta aplicación, tales como las propiedades del material a utilizar, la biocompatibilidad, si es biodegradable o no, la posible toxicidad que pueda presentar el producto final, que la NP sea capaz de transportar una elevada cantidad de fármaco y que sea capaz de liberar el fármaco de forma controlada una vez llegue al lugar de acción. También hay que tener en cuenta las posibles barreras que se pueda encontrar el producto una vez administrado en el ser humano, así como su eliminación y biodisponibilidad <sup>(27)</sup>.

Para la elaboración de un sistema eficaz se han planteado una serie de retos todavía por resolver: 1) El biomarcador utilizado para el diagnóstico y el tratamiento debe sobre expresarse en el tumor y no estar presente en los tejidos sanos, 2) el ligando a utilizar debe ser posible de reproducir, para así poder llevar a cabo múltiples ensayos *in vivo* y 3) la NP debe ser capaz de producir una señal clara y lo suficientemente fuerte como para poder llevar a cabo una correcta monitorización del agente, para ver si puede o no acceder a la zona tumoral, cuál es la respuesta del tumor frente al tratamiento, etc <sup>(27)</sup>.

Algunas características que hacen destacar a las AgNPs son, su facilidad para ser detectadas así como la capacidad de producir una señal de detección mucho más fuerte que otros fluoróforos y de no necesitar fuentes excitadoras excesivamente caras <sup>(6)</sup>.

Se han desarrollado ensayos *in vitro* que demuestran el elevado potencial que tienen las AgNPs. Srinivasan y colaboradores <sup>(9)</sup> propusieron el uso de AgNPs para la teranóstica. Para ello utilizaron AgNPs, ácido fólico y doxorubicina (DOX) (Figura 5). En primer lugar, unieron el ácido fólico a una cadena espaciadora de polietilenglicol (PEG) mediante un enlace amida; en segundo lugar, unieron la doxorubicina a otra cadena espaciadora de PEG por enlace hidrazona y, por último, unieron estas dos sustancias a las AgNPs a través de un grupo sulfidriilo que contiene el PEG. Como resultado obtuvieron un sistema que, gracias al ácido fólico, se internaliza preferentemente en las células tumorales, debido a que estas sobre expresan el receptor del ácido fólico, presenta una liberación de la doxorubicina pH dependiente, puesto que el medio ácido característico de las regiones tumorales rompe el enlace hidrazona que une al fármaco con el PEG, y por último se aprovecha el efecto fotodinámico de las AgNPs para aumentar, todavía más, la eficacia terapéutica del sistema. Las AgNPs fueron detectadas a nivel intracelular por Espectroscopia de Emisión Plasma-Óptica

de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), Espectroscopía Raman intensificada por efecto de superficie (SERS) y por espectroscopia de fluorescencia <sup>(6)(9)</sup>.

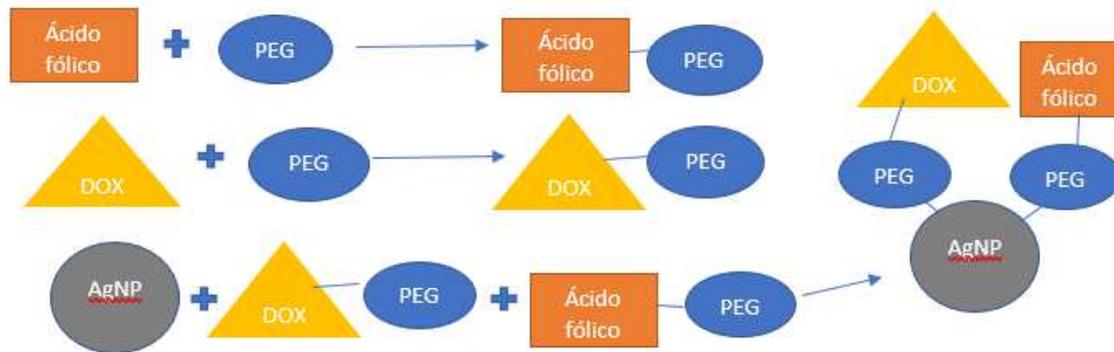


Figura 5. Formación del sistema terapéutico elaborado por Srinivasan y colaboradores <sup>(9)</sup>.

Mukherjee y colaboradores <sup>(38)</sup> realizaron un estudio de AgNPs obtenidas a partir del extracto de la hoja *Olaz scandens*. Uno de sus objetivos fue demostrar la mayor eficacia que presentan las AgNPs obtenidas a través de la síntesis verde en comparación con aquellas obtenidas por otros métodos químicos. También probaron, con éxito, su eficacia frente a diversos tipos de células cancerosas, tales como A549 (procedentes de líneas celulares de cáncer de pulmón), B16 (procedentes de líneas celulares de melanoma en ratones) y MCF7 (procedentes de células de cáncer de pecho humanas). Además, también vieron una ausencia de toxicidad en células sanas de ratones (H9C2), humanas (HUVEC) y en células de ovario de hámster chino (CHO). Es importante destacar que, las AgNPs sintetizadas a partir de dicho extracto presentaron una fuerte señal roja por microscopía de fluorescencia. Este fenómeno es debido a la unión a la superficie de las AgNPs de agentes con propiedades fluorescentes provenientes la planta *Olaz Scandens* que son capaces de generar una señal por microscopía de fluorescencia. Por lo que concluyeron que pueden ser útiles como transportadores de agentes quimioterápicos, presentar actividad antitumoral y ser detectadas mediante fluorescencia. Ello hace que las AgNPs, sintetizadas por este método, sean unas perfectas candidatas para su uso en terapéutica <sup>(30)(38)</sup>.

### 5.3 Farmacocinética de las nanopartículas de plata

Tras haber visto el gran potencial de las AgNPs a nivel terapéutico, es importante plantearse si se pueden administrar en el ser humano. Una vez administradas debemos conocer cómo es su comportamiento, si se degradan con el pH del estómago, si pasan a circulación sistémica, qué cantidad se elimina y por qué vías, si se bioacumula, etc. En este apartado se analizará dicho comportamiento.

En cuanto a la absorción, las AgNPs administradas por vía oral se absorben a través de distintos mecanismos, como el transporte paracelular, la transcitosis o por captación por células M en el tracto gastrointestinal <sup>(12)(39)</sup>. Por vía intramuscular, inhalada y subcutánea, estas NPs son captadas por macrófagos o a través del sistema linfático <sup>(14)</sup>. En cuanto a la biodisponibilidad, diversos experimentos han demostrado que es baja. Sin embargo, todavía es necesario llevar a cabo más estudios farmacocinéticos desde un punto de vista cuantitativo, ya que la mayoría

se centran en el aspecto cualitativo, es decir, se centran más en ver si está presente o no la plata que en ver qué cantidad de plata hay en los tejidos y/o órganos <sup>(14)</sup>.

En la distribución, el hígado es el órgano diana principal, ya se hayan administrado vía oral, intravenosa, subcutánea o inhaladas. También se ha podido encontrar plata en otros órganos como el riñón y se han visto diferencias en función del género, siendo mayor la cantidad encontrada en ratas hembra que en macho tras repetidas administraciones orales <sup>(14)</sup>. En estudios realizados por Zande y colaboradores <sup>(40)</sup>, se ha podido observar también que, los órganos con mayores concentraciones de plata fueron, en orden de mayor a menor concentración, el hígado, el bazo, los testículos, los riñones, el cerebro y por último, los pulmones <sup>(40)</sup>.

En cuanto al metabolismo, una vez llegan las AgNPs al estómago, debido al pH ácido del mismo (1,5), parte de las AgNPs se oxidan y forman  $\text{Ag}^+$  <sup>(41)</sup>. Estos  $\text{Ag}^+$  pueden o bien quedarse como  $\text{Ag}^+$ , o bien reaccionar con  $\text{Cl}^-$  en el estómago, formándose un precipitado o formarse  $\text{AgCl}$  (ac),  $[\text{AgCl}_2]^-$  o  $[\text{AgCl}_3]^{2-}$ . Una vez  $\text{Ag}^+$  y sus otras formas alcanzan el tracto gastrointestinal, estas llegan a circulación sistémica a través de los sistemas de transporte de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cu}^+$ . En circulación sistémica,  $\text{Ag}^+$  se une a proteínas a través de sus grupos tiol (-SH), principalmente se une a albúmina sérica, o puede también reaccionar con el glutatión reducido (GSH) y formarse GS-Ag y liberarse  $\text{H}^+$ . Posteriormente GS-Ag se transforma en Ag-GSH, que se distribuye a otros tejidos. Además de interactuar con grupos tiol, las AgNPs pueden también reaccionar con sulfuro para formar  $\text{Ag}_2\text{S}$  NPs y más tarde formar, por intercambio de selenio con sulfuro  $\text{Ag}_2\text{Se}$  NPs y  $\text{Ag/S/Se}$  NPs <sup>(12)(41)</sup>.

Por último, la eliminación de esas NPs es mayor en heces que en orina <sup>(14)</sup>. Curiosamente, en un estudio realizado por Zande y colaboradores <sup>(40)</sup> en el que analizaron la distribución, eliminación y toxicidad de AgNPs, AgNPs recubiertas con polivinilpirrolidona y  $\text{AgNO}_3$  administradas a una dosis determinada durante 28 días por vía oral, se pudo observar un aclaramiento sanguíneo prácticamente total en los tres grupos tras los 28 días y una eliminación casi total en heces <sup>(40)</sup>. Zande y colaboradores observaron que, en los 28 días que duró la administración de plata en distintas formas, tanto en las AgNPs sin recubrir como en las recubiertas, de un tamaño de menos de 20 nm y menos de 15 nm respectivamente, los niveles de plata en sangre eran mucho menores que los alcanzados en el grupo de ratas en las que se administró  $\text{AgNO}_3$  <sup>(40)</sup>. Ante este fenómeno, se planteó la posibilidad de que eran los  $\text{Ag}^+$ , liberados por las NPs, los que se encontraban disponibles en sangre. Para comprobar esta teoría se normalizó la cantidad de  $\text{Ag}^+$  liberados por las AgNPs sin recubrir en comparación con el  $\text{AgNO}_3$ , siendo el 7% de la dosis administrada  $\text{Ag}^+$  en las NPs y el 100% en el  $\text{AgNO}_3$ . Como conclusión vieron que, en efecto, la plata presente en plasma, tras administrar AgNPs estaba en forma de ion y no en forma elemental <sup>(40)</sup>. Sin embargo, estos resultados se obtuvieron en modelos *in vitro* en los que el pH era de 7,2. Se podría argumentar que a pH 4,2, el pH del estómago, en modelos *in vivo*, la disolución de las AgNPs sería mayor, por tanto, la cantidad de  $\text{Ag}^+$  en sangre procedentes de las NPs sería mayor, lo cual podría indicar una mayor probabilidad de sufrir reacciones adversas. Tras un experimento, cuyos datos no fueron publicados, en el que utilizaron un modelo de digestión, no pudieron observar ninguna diferencia en el número, tamaño y composición de las NPs al modificar el pH, por lo que dedujeron que las AgNPs no son susceptibles de sufrir modificaciones con el pH <sup>(40)</sup>. A pesar de todo, para poder afirmarlo con completa seguridad, es necesario realizar más estudios.

#### 5.4 Toxicidad de las nanopartículas de plata

Con el rápido desarrollo de la nanotecnología y el aumento en el uso de AgNPs, debido a su fácil adquisición y enorme potencial, cabe preguntarse cómo de tóxicas son, cuál es el impacto que su uso puede ocasionar en humanos y en el ecosistema <sup>(12)</sup>. Como ya se ha explicado con anterioridad, las AgNPs son capaces de penetrar en las células y causar daños en distintos niveles. Debido a ello, es importante analizar si existe toxicidad en humanos o no.

Experimentos en ratones han demostrado la capacidad de las AgNPs de acumularse en órganos como hígado, riñón (causando daño renal) y cerebro tras una administración intravenosa, intracraneal e intraperitoneal <sup>(12)</sup>. También se ha visto daño en el ADN, inflamación hepática y alteraciones en la función pulmonar, cardíaca, intestinal y en el bazo. La inflamación hepática se ha podido observar debido al aumento de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), ambos mediadores de la inflamación. También se ha observado un aumento de hormonas tiroideas, siendo indicativo de hipertiroidismo y una disminución de la testosterona y posible infertilidad en machos. En el mismo estudio, se han propuesto como mecanismos causantes de la toxicidad el daño celular y la consecuente lisis (apoptosis) y el estrés oxidativo. En otros estudios realizados en ratones en unas condiciones de exposición muy similares a las humanas (presencia en el agua de bebida) vieron daños en células del pulmón, colon y vejiga <sup>(12)</sup>.

Cuando se analizó la toxicidad a nivel reproductivo, utilizando a las moscas de la fruta como modelo genéticamente similar al ser humano, se pudo observar que a dosis menores de 50 mg/L tres veces al día durante 10 días no hubo toxicidad. Por otro lado, a dosis mayores, el crecimiento ovárico y la capacidad para poner huevos estaba afectada. Por tanto, la toxicidad depende de la dosis. Además, una exposición en estadios tempranos del desarrollo, independientemente de la dosis y el tiempo de administración, afecta a la capacidad reproductiva <sup>(12)</sup>, lo cual podría sugerir, extrapolándolo a humanos, una posible contraindicación durante el embarazo o en la niñez en humanos. Tal toxicidad se pudo ver incluso en generaciones posteriores que no se habían visto expuestas a las AgNPs <sup>(12)</sup>. También se ha visto alteraciones en el control hormonal en ratones, que incluye alteraciones tanto en su balance como en el metabolismo de esteroides en las gónadas masculinas, independientemente de la dosis y del tamaño de las NPs <sup>(42)</sup>.

Por otro lado, dada la capacidad de las AgNPs de atravesar la barrera hematoencefálica, cabe preguntarse qué efectos tienen en el cerebro. Wesierska y colaboradores <sup>(43)</sup> realizaron un estudio para analizarlo. Usando a ratas como sujetos de prueba, vieron, tras la administración oral, efectos negativos a nivel cognitivo, en la plasticidad cerebral y en la memoria a largo plazo. Las dosis administradas fueron de 30 y de 1 mg/kg <sup>(43)</sup>.

También hay estudios que defienden una baja toxicidad de las AgNPs, tanto en células de mamífero como en humanos. En estudios en los cuales se utilizaron dosis terapéuticas, únicamente se pudieron detectar cantidades menores a 0,5 g/Kg peso en órganos de ratones, sugiriendo que, a estas concentraciones, el daño es nulo <sup>(17)</sup>. Otros investigadores defienden

que la toxicidad depende tanto del tamaño como de la dosis administrada <sup>(17)</sup>. En un estudio se analizó la toxicidad asociada del tamaño. Para ello se utilizaron carpas doradas como modelo animal y tres tamaños de AgNPs de 15, 50 y 100 nm. Las de menor tamaño fueron las más tóxicas, produciendo una mayor hemólisis, daño en las membranas celulares y estrés oxidativo en comparación con las de 50 y 100 nm. Sin embargo, las de 50 nm son las que mejores resultados presentaron en cuanto a absorción sugiriendo que el tamaño óptimo a utilizar en terapia es el de 50 nm <sup>(12)</sup>.

Actualmente, existen en el mercado aproximadamente 450 productos que contienen AgNPs, como algunas pinturas, algunos cosméticos y tejidos de ropa entre otros <sup>(12)</sup>. Es importante plantearse qué impacto pueden tener en el ecosistema. Una vez liberados al medio, sufren transformaciones físicas como agregación, aglomeración y otras de carácter químico, como la formación de cloruros y sulfuros (Ag<sub>2</sub>S). Por un lado, se ha analizado el efecto que tiene en las formas de vida acuática, sin embargo, se han llevado a cabo pocos estudios, los cuales se han centrado únicamente en los peces, concretamente en el pez cebrá, aunque también existen estudios con otras especies <sup>(12)</sup>. Los ensayos realizados en plantas son todavía menores que los realizados en formas de vida acuática. Algunos sugieren que el agente causante no son solo los iones de plata liberados por la partícula sino también su interacción con grupos tioles de la tubulina <sup>(12)</sup>. En un estudio se propuso analizar el efecto de las AgNPs en la calidad del trigo. Para ello, se utilizó para cultivarlo tierra en la que se adicionó una cantidad de 20, 200 y 2000 mg de AgNPs/kg de tierra durante 4 meses. Este incremento progresivo de dosis produjo un menor nivel de biomasa, un menor tamaño del cultivo y una disminución del peso de las semillas, disminuyendo así la calidad del trigo <sup>(12)</sup>.

## 6. CONCLUSIONES:

Con la búsqueda de la mejora de los tratamientos, la nanotecnología está cobrando cada vez más importancia. Las AgNPs han demostrado ser una alternativa potencial para tratar muchas patologías, tales como infecciones causadas por distintos microorganismos o cánceres. Su actividad depende de factores como la dosis, el tamaño y la forma. Se han llevado a cabo muchos estudios con éxito tanto en cultivos celulares *in vitro* como en modelos animales *in vivo*, lo cual es un buen indicativo para pasar a ensayos clínicos en el futuro. Sin embargo, también existe evidencia de su toxicidad para el ser humano. Una estrategia para evitarla es la funcionalización de su superficie, para que vayan de forma más específica al lugar en el que se busca que ejerza su efecto y menos a las células sanas. Es fundamental realizar más estudios de toxicidad y de posible impacto tanto en los seres humanos como en el ecosistema. Por ejemplo, a nivel ambiental, existen indicios de que los microorganismos del medio presentan una gran sensibilidad, ya que las NPs no diferencian entre microorganismos patógenos y no patógenos. De encontrar una forma de disminuir sus efectos tóxicos, las AgNPs podrían, en un futuro, sustituir a muchos tratamientos actuales y mejorar la calidad y esperanza de vida de las personas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. Chem Rev. 2016;116(5):2826–85.
2. A. A. Lauren, A. M. Megan, C. D. Erik, A. E. Mostafa. The optical, photothermal, and

- facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. *Arch Toxicol* 2014; 88(7): 1391–1417
3. Abbasi E, Milani M, Aval SF, Kouhi M, Akbarzadeh A, Nasrabadi HT, et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(2):173–80.
  4. Azharuddin M, Zhu GH, Das D, Ozgur E, Uzun L, Turner APF, et al. A repertoire of biomedical applications of noble metal nanoparticles. *Chem Commun.* 2019;55(49):6964–96.
  5. Fang Y, Xue J, Gao S, Lu A, Yang D, Jiang H, et al. Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery. *Drug Deliv.* 2017;24(0):22–32.
  6. Li Y, Chang Y, Lian X, Zhou L, Yu Z, Wang H, et al. Silver nanoparticles for enhanced cancer theranostics: In vitro and in vivo perspectives. *J Biomed Nanotechnol.* 2018;14(9):1515–42.
  7. Bensebaa F. *Optoelectronics. Vol. 19, Interface Science and Technology.* 2013. P. 429–479
  8. Felsher DW. Cancer revoked: Oncogenes as therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):375–80.
  9. Srinivasan S, Bhardwaj V, Nagasetti A, Fernandez-Fernandez A, McGoron AJ. Multifunctional surface-enhanced raman spectroscopy-detectable silver nanoparticles for combined photodynamic therapy and pH-triggered chemotherapy. *J Biomed Nanotechnol.* 2016;12(12):2202–19.
  10. Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Ficiu A, Andronescu E. Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. *Nanomaterials.* 2018;8(9):1–25.
  11. Mikhailov, Mikhailova. *Elemental Silver Nanoparticles: Biosynthesis and Bio Applications.* *Materials (Basel).* 2019;12(19):3177.
  12. Rezvani E, Rafferty A, McGuinness C, Kennedy J. Adverse effects of nanosilver on human health and the environment. *Acta Biomater.* 2019;94:145–59.
  13. Khanna P, Kaur A, Goyal D. Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *J Microbiol Methods.* 2019;163(June):105656.
  14. Mathur P, Jha S, Ramteke S, Jain NK. Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2018;46(sup1):115–26.
  15. Bogart LK, Pourroy G, Murphy CJ, Puentes V, Pellegrino T, Rosenblum D, et al. Nanoparticles for imaging, sensing, and therapeutic intervention. *ACS Nano.* 2014;8(4):3107–22.
  16. Sriram MI, Kanth SBM, Kalishwaralal K, Gurunathan S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton’s lymphoma ascites tumor model. *Int J Nanomedicine.* 2010;5(1):753–62.
  17. Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(4):523–30.
  18. Kędziora A, Speruda M, Krzyżewska E, Rybka J, Łukowiak A, Bugła-Płoskońska G. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
  19. 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*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(6):1712–20.

20. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2017;307(8):481–9.
21. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):277–81.
22. Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):18488–501.
23. Hoffman LR, D’Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 2005;436(7054):1171–5.
24. Wolska KI, Grześ K, Kurek A. Synergism between plant n bacteriocin. 2012;61(2):95–104.
25. Narayana A. Applications of Nanotechnology in Cancer: A Literature Review of Imaging and Treatment. *J Nucl Med Radiat Ther.* 2014;05(04).
26. Raju GSR, Dariya B, Mungamuri SK, Chalikonda G, Kang S-M, Khan IN, et al. Nanomaterials multifunctional behavior for enlightened cancer therapeutics. *Semin Cancer Biol.* 2019;(June):1–12.
27. Lungu II, Grumezescu AM, Volceanov A, Andronescu E. Nanobiomaterials used in cancer therapy: An up-to-date overview. *Molecules.* 2019;24(19):1–21.
28. Bae KH, Chung HJ, Park TG. Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Mol Cells.* 2011;31(4):295–302.
29. Stewart B, Wild International Agency for Research on Cancer, WHO CP (eds. . World Cancer Report 2014 . *Nat Rev Cancer.* 2014;17(1):20–37.
30. De Matteis V, Cascione M, Toma CC, Leporatti S. Silver nanoparticles: Synthetic routes, in vitro toxicity and theranostic applications for cancer disease. *Nanomaterials.* 2018;8(5).
31. Yuan YG, Zhang S, Hwang JY, Kong IK. Silver nanoparticles potentiates cytotoxicity and apoptotic potential of camptothecin in human cervical cancer cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018.
32. Kovács D, Szoke K, Igaz N, Spengler G, Molnár J, Tóth T, et al. Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2016;12(3):601–10.
33. Fellner M, Dillenburg W, Buchholz HG, Bausbacher N, Schreckenberger M, Renz F, et al. Assessing p-glycoprotein (Pgp) activity in vivo utilizing 68Ga-schiff base complexes. *Mol Imaging Biol.* 2011;13(5):985–94.
34. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(12):2977–92.
35. Al-Nuairi AG, Mosa KA, Mohammad MG, El-Keblawy A, Soliman S, Alawadhi H. Biosynthesis, Characterization, and Evaluation of the Cytotoxic Effects of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles from *Cyperus conglomeratus* Root Extracts on Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Biol Trace Elem Res.* 2019.
36. Shaniba VS, Aziz AA, Jayasree PR, Kumar PRM. Manilkara zapota (L.) P. Royen Leaf Extract Derived Silver Nanoparticles Induce Apoptosis in Human Colorectal Carcinoma Cells Without Affecting Human Lymphocytes or Erythrocytes. *Biol Trace Elem Res.* 2019;192(2):160–74.
37. Yu D, Zhang Y, Lu H, Zhao D. Silver nanoparticles coupled to anti-EGFR antibodies sensitize nasopharyngeal carcinoma cells to irradiation. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):9005–10.
38. Mukherjee S, Chowdhury D, Kotcherlakota R, Patra S, Vinothkumar B, Bhadra MP, et al.

- Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system). *Theranostics*. 2014;4(3):316–35.
39. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. El intestino: Pieza clave del sistema inmunitario. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2008;100(1):29–34.
  40. Van Der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano*. 2012;6(8):7427–42.
  41. Lin Z, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2015;7(2):189–217.
  42. Dziendzikowska K, Krawczyńska A, Oczkowski M, Królikowski T, Brzóška K, Lankoff A, et al. Progressive effects of silver nanoparticles on hormonal regulation of reproduction in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;313:35–46.
  43. Węsierska M, Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Dudek J, Polkowska-Motrenko H, Audinot JN, et al. Silver ions are responsible for memory impairment induced by oral administration of silver nanoparticles. *Toxicol Lett*. 2018;290:133–44.