



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
NUEVAS ESTRATEGIAS PARA APLICACIONES  
BIOMÉDICAS DE NANOPARTÍCULAS DE  
PLATA**

Autor: Mercedes Ortega Pérez

Fecha: Julio 2020

Tutor: Ana García Fontecha

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. RESUMEN.....   | 3  |
| 1. ABSTRACT .....                                       | 3  |
| 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....                    | 4  |
| 2.1 Plata y medicina.....                               | 4  |
| 2.2 Nanotecnología: plata y medicina .....              | 5  |
| 2.2.1 Uso de las AgNPs como agente antimicrobiano ..... | 6  |
| 2.3 Nuevas aplicaciones de las AgNPs.....               | 7  |
| 3. OBJETIVOS.....                                       | 8  |
| 4. METODOLOGÍA .....                                    | 8  |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                          | 9  |
| 5.1 Síntesis de nanopartículas de plata .....           | 9  |
| 5.2 Propiedades fisicoquímicas .....                    | 9  |
| 5.3 Empleo de AgNPs en el tratamiento del VIH.....      | 10 |
| 5.1 Empleo de AgNPs como agentes antitumorales.....     | 14 |
| 5.2 Riesgos toxicológicos de AgNPs.....                 | 17 |
| 6. CONCLUSIÓN .....                                     | 18 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA.....                                    | 19 |

## **1. RESUMEN**

Los nanomateriales son aquellos materiales que, en alguna de sus dimensiones, presentan un tamaño dentro del rango de 1 a 100 nm, tamaño que les permite tener una serie de propiedades idóneas para su aplicación en diferentes ámbitos.

La plata, también en forma de nanopartículas (AgNPs), se ha empleado a lo largo de la historia gracias a sus propiedades antisépticas y antibacterianas utilizándose como antibiótico antes de la aparición de este grupo de fármacos. Actualmente el uso de las AgNPs se ha ampliado a otros campos de actuación médica como es el caso de la enfermedad del cáncer y el SIDA.

Cáncer y SIDA son enfermedades con una alta prevalencia, siendo el cáncer la mayor causa de muerte en países desarrollados. Es cierto que el SIDA es una enfermedad con tratamiento que permite tener a las personas que la sufren una vida normal reduciendo su carga viral. En el caso del cáncer también existen diferentes tratamientos, en algunos tipos de cáncer, que son capaces de reducir o eliminar las células cancerígenas, pero no existe un tratamiento ideal.

Es por ello por lo que la búsqueda de una cura es uno de los principales objetivos frente a la lucha de ambas enfermedades.

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión bibliográfica de la aplicación de las AgNPs como agente antitumoral y frente al VIH. Para ello haremos un recorrido en las propiedades y usos de la plata y de las nanopartículas y nos centraremos en el mecanismo de acción de las AgNPs frente a ambas enfermedades y sus posibles riesgos tóxicos en nuestro organismo.

## **1. ABSTRACT**

Nanomaterials are those materials that, in some of their dimensions, have a size within the range of 1 to 100 nm, which allows them to have a series of properties that make them suitable in different fields.

Silver, also in the shape of nanoparticles (AgNPs), has been used throughout history thanks to its antiseptic and antibacterial properties as antibiotic before the introduction of this group of drugs. Currently, the use of AgNPs has been expanded to other medical fields, such as cancer and AIDS.

Cancer and AIDS are diseases with a high prevalence, being cancer the leading cause of death in developed countries. AIDS is a disease that currently has a treatment that reduces the viral load allowing people to have a normal life reduce the viral load. Whereas in cancer, even though there are different treatments for some types of cancer, that reduce or eliminate cancer cells, there is no ideal treatment.

Therefore, one of the main objectives in the fight against cancer and AIDs is actively looking for a cure is one of the main objectives in the fight against both diseases.

The objective of this project is to carry out a bibliographic review of the AgNPs application as an antitumor agent and against HIV. In order to do so, the properties and uses of silver and nanoparticles will be analyzed and so will the mechanism of action of AgNPs against both diseases and the possible toxic risks to human health.

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 2.1 Plata y medicina

La plata (Ag) es un elemento químico cuyo número atómico es el 47 y que puede presentar los estados de oxidación +1, +2 y +3, siendo más habitual encontrarlo en el estado +1. (1)

Se trata de un metal de transición que se encuentra en la naturaleza en estado sólido y que destaca por sus propiedades de maleabilidad, ductilidad y conductividad tanto eléctrica como térmica, siendo el metal que presenta mayor conductividad. (2)

La plata ha estado presente a lo largo de la historia dándole su uso en monedas, joyas, purificación de aguas y, desde un punto de vista más médico, sus propiedades le han permitido ser utilizada en el tratamiento o prevención de enfermedades, tratamiento de úlceras y heridas infectadas, así como quemaduras cuando no existían los antibióticos. (3)

Respecto a su aplicación médica, la plata se ha empleado en forma de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y sulfadiazina de plata, aunque bien es cierto que, recientemente, la plata se está empleando en forma de nanopartículas debido a las características y ventajas que presentan y que más adelante comentaremos.

1. El  $\text{AgNO}_3$  presenta acción antiséptica y antiinfecciosa. Se trata de un antibacteriano excelente en el tratamiento de heridas debido a su acción frente a microorganismos como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
2. La sulfadiazina, por su parte, es un compuesto químico que combina tanto las propiedades antibacterianas que presenta *per se* la plata con una sulfonamida (antibiótico) que ya se empleaba durante la Segunda Guerra Mundial para la cicatrización de las heridas más superficiales. (1) Actualmente la sulfadiazina de plata constituye la primera línea de elección en tratamientos tópicos en pacientes con quemaduras por sus propiedades antisépticas. Esta tiene un amplio espectro de actividad frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Al ponerlo en contacto con fluidos corporales a través de esas quemaduras, la sulfadiazina se convierte en grupos sulfhidrilo y proteínas libres lo que permite su mayor absorción sistémica. (4)

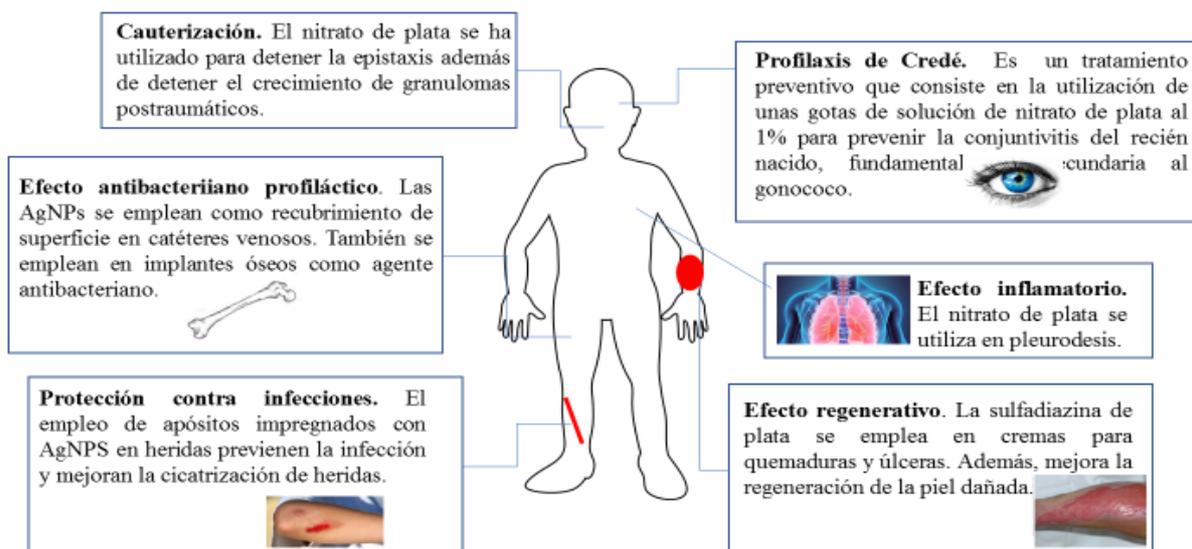


Figura 1. Diferentes aplicaciones de la plata en forma de  $\text{AgNO}_3$ , sulfadiazina de plata y AgNPs. Figura adaptada de referencia 5.

## 2.2 Nanotecnología: plata y medicina

La nanotecnología es una parte de la ciencia en auge desde hace unos años. Supone el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicaciones de materiales y sistemas a nano escala. A medida que conocemos y comprendemos estructuras biomoleculares que se encuentran a nanoescala tenemos la necesidad de crear sistemas también a esta escala que puedan interactuar con esas biomoléculas. Estas partículas que se crean a escala nano presentan propiedades físicas y químicas diferentes a los mismos materiales de los que proceden en escala “normal” o, mejor dicho, visible. Propiedades como el punto de fusión, fluorescencia, conductividad o reactividad química cambian. Es por ello por lo que su estudio es de gran importancia para poder aplicarlas en diferentes medios aprovechando su tamaño y evitando riesgos que puedan presentar. (6)

Los nanomateriales no tienen una definición común. Múltiples organizaciones han tratado de definirlos (7) y, aunque no han encontrado una única definición, en lo que sí se está de acuerdo es en que estos nanomateriales son materiales que pueden proceder de origen natural o sintético con partículas sueltas o formando aglomerados y que presentan un intervalo de tamaño entre 1 y 100 nm en alguna de sus dimensiones. Pueden proceder de diferente naturaleza (cerámicos, metálicos, semiconductores o polímeros) (8). Una de las características principales de los nanomateriales y que hacen que sus propiedades difieran del material de partida es que su tamaño reducido permite la fácil modificación de sus propiedades.

Las nanopartículas (NPs) forman parte de estos nanomateriales. Se trata de estructuras con un tamaño muy pequeño en comparación con el tamaño de una célula, lo que supone el fácil acceso a las células y la llegada a sitios que compuestos o sistemas con un tamaño mayor no pueden acceder. De esta manera, las nanopartículas presentan un tamaño ideal para su interacción tanto con biomoléculas que se encuentran en la superficie de la célula, que son más grandes, como con aquellas estructuras más pequeñas que se encuentran dentro siendo capaces de liberar fármacos de pequeño tamaño dentro de la célula al penetrar en ella. (9)

Incluso podemos aumentar la especificidad de las nanopartículas por el tejido diana. Este término diana hace referencia a que el medicamento, sistema o en este caso nanopartícula está diseñado para actuar en esa molécula, órgano o tejido en concreto. De esta manera hacemos que sea específico al modificar su superficie con estructuras afines a la superficie de la diana como polímeros o anticuerpos que sirvan de moléculas de reconocimiento. (10)

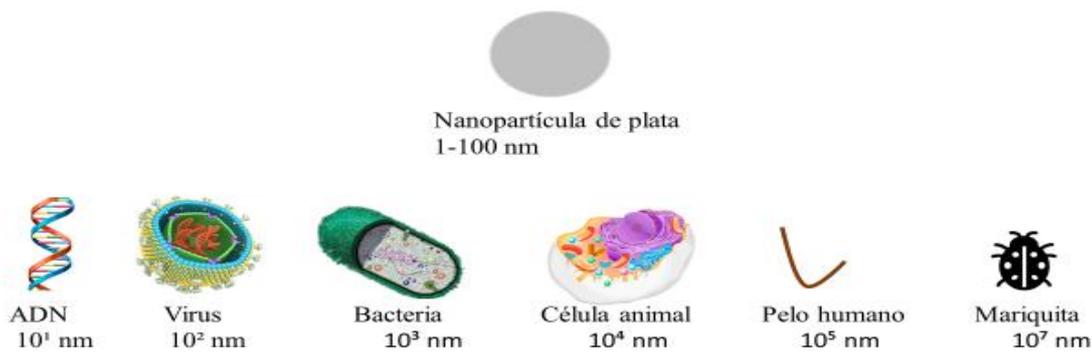


Figura 2. Diferentes imágenes comparativas a escala nanométrica.

Las NPs presentan una serie de características (9) esenciales que nos permiten entender el porqué de su aplicación en el ámbito de la medicina, así como distinguir las de otro tipo de material:

- Su pequeño tamaño hace que puedan llegar de manera más rápida y efectiva al punto diana además de ser menos invasivo en el cuerpo. Este pequeño tamaño implica también que se requiera menor muestra biológica para ver su efecto.
- La relación área/volumen es mayor, lo que supone un área superficial más grande permitiendo así mayor cantidad de nanomaterial en contacto con el punto diana debido a que establecen más interacciones químicas. Además, al tener tanta superficie se puede recubrir con más moléculas, aumentando su selectividad.

Gracias a estas características, las nanopartículas se han empleado tanto en aplicaciones *in vivo* como *in vitro*. (9)

- *In vivo*. Muchos nanomateriales se han diseñado para atacar ciertos tumores. La alta relación área superficie/volumen le permite que estén altamente cargados de agentes terapéuticos para ese tumor en la superficie. Además, como podemos diseñar su superficie para que sean más específicos podemos evitar que vaya a tejidos sanos.
- *In vitro*. También se emplean en los dispositivos de diagnóstico para medir moléculas en muestras biológicas, como en pruebas de embarazo o como sustituto de PCR.

Podemos hablar de nanopartículas orgánicas e inorgánicas, siendo estas últimas las de nuestro interés pues es aquí donde se incluyen las AgNPs.

Las AgNPs presentan un uso extendido dentro de la biomedicina gracias a su pequeño tamaño y la mayor superficie activa que presenta frente al resto de compuestos de plata.

Las ventajas del uso de AgNPs frente a la plata son: alcanza concentraciones mayores por dosis, se puede modificar su toxicidad intrínseca en función de sus propiedades como tamaño, forma, solubilidad, superficie específica, carga superficial y aglomeración. (1)

Gracias a su estabilidad y a sus propiedades tanto por ser una nanopartícula como las que presenta la plata por sí misma le han permitido su uso en diferentes aplicaciones biomédicas, biosensores, apósitos para heridas y agente antimicrobiano; así como posible agente antitumoral y antiviral siendo estos dos últimos los usos más novedosos y en los que se va a centrar esta revisión bibliográfica.

### **2.2.1 Uso de las AgNPs como agente antimicrobiano**

Entre sus aplicaciones más conocidas encontramos la actividad antimicrobiana que presentan estas nanopartículas. Antes de que los antibióticos llegasen a nuestras vidas, la plata se utilizaba para tratar heridas, quemaduras e infecciones oculares. Con la llegada de ese grupo de fármacos la plata quedó en un segundo plano y su uso disminuyó de manera drástica. Sin embargo, con la llegada de la nanotecnología el uso de la plata en forma de nanopartículas volvió a crecer.

El efecto antimicrobiano se debe a la actividad que presentan las nanopartículas frente a ciertos agentes patógenos.

Como hemos comentado anteriormente, las propiedades antimicrobianas de la plata eran ya conocidas. Realmente no se conoce con exactitud el mecanismo de acción por el cual la plata actúa frente a las bacterias, pero si se han propuesto varios puntos de actuación (11,12,13):

- a) interrumpe la cadena de transporte de electrones,
- b) forma complejos con las bases del ADN inhibiendo su replicación lo que causa apoptosis celular,
- c) interacciona con grupos funcionales en los residuos de aminoácidos como el grupo tiol inactivando a las enzimas,

- d) hace que el citoplasma se separe de la pared celular, haciendo que esta se degrade y que los contenidos celulares sean liberados lo que supone la inhibición del crecimiento bacteriano,
- e) mantiene a las bacterias en un estado de metabolismo muy bajo al reducir la formación de ATP, haciendo que no se pueda dividir y finalmente mueran,
- f) generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que inhiben procesos como la peroxidación lipídica, alteración de proteínas y daño en el ADN.

Tanto en forma ionizada ( $\text{Ag}^+$ ) como en forma de nanopartícula la acción antimicrobiana de la plata ionizada es similar.

Al igual que la plata, el mecanismo de acción bactericida que ejercen las AgNPs no se conoce realmente pues no solo se debe a la liberación de iones  $\text{Ag}^+$ . Se han estudiado tres posibles mecanismos que derivan en la alteración que ejerce en la membrana celular, su pequeño tamaño que le permite interactuar con el ADN y la liberación de iones plata, generando ROS. (14)

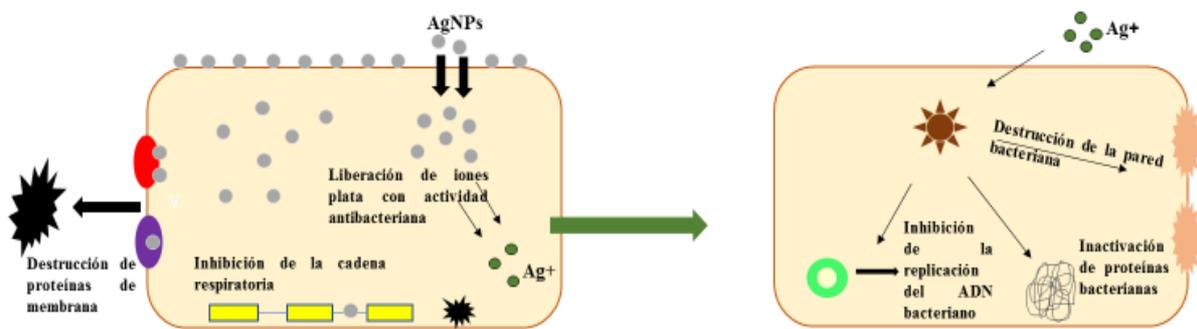


Figura 3. Mecanismos de acción bactericida de las AgNPs y  $\text{Ag}^+$ . Figura adaptada de referencia 18.

Se entiende que realmente la acción principal que ejercen las AgNPs es debida a la liberación de iones plata en el interior celular. Aunque todavía no se sabe de manera exacta si la acción tóxica se debe a la plata en sí o a las nanopartículas.

Sin embargo, el hecho de poder modificar estos sistemas y el pequeño tamaño hace que sea más eficiente el uso de AgNPs como sistema de liberación de iones plata que estos por sí mismos. (13)

Los estudios más actuales y relevantes (14) concluyen que un tamaño de nanopartícula por debajo de 10 nm hace que la actividad antimicrobiana se deba a la propia nanopartícula mientras que tamaños más grandes sugieren esa misma actividad a la liberación de iones plata. Aunque es cierto que la penetración a la célula se hace de manera más eficaz en forma de nanopartícula que ionizada.

### 2.3 Nuevas aplicaciones de las AgNPs

Las AgNPs presentan multitud de aplicaciones (15) como antiséptico en apósitos, agentes antimicrobianos en el tratamiento de infecciones, biosensores y, de manera más novedosa, agente anticancerígeno y virucida.

Probablemente la aplicación más estudiada y explotada de estas nanopartículas sea la de agente antimicrobiano. Como se ha mencionado antes, la plata se ha utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de enfermedades gracias a su actividad antiséptica y antimicrobiana.

Esas propiedades junto a los beneficios que presenta en forma de nanopartículas hacen que las AgNPs sean una alternativa al problema que actualmente presenta la resistencia a antibióticos.

Por ello, supone una gran novedad poder aplicar las AgNPs en otros aspectos en los que se ha visto su potencial acción. Aquí encontramos su acción citotóxica que puede ser útil para

combatir células cancerígenas y la interacción que presenta con virus para los que aún no existe tratamiento eficaz como se ha visto que sucede con el VIH.

El cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades que tienen como factor común la proliferación de las células de un tejido de manera descontrolada. El cáncer supone una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo. Por ello, la búsqueda de tratamientos eficaces frente a esta patología supone uno de los objetivos de muchos investigadores. Estudios demostraron que las AgNPs presentan una alta actividad citotóxica. (16) De manera controlada, esta toxicidad supone una línea futura de la aplicación de las AgNPs en la terapia tumoral. (17)

Además de seguir esta línea de investigación, los nanomateriales han sido evaluados en ensayos clínicos como agentes que inhiban la propagación de enfermedades de origen viral como es la enfermedad del SIDA. Esta enfermedad está causada por el virus VIH que con el tiempo ataca y destruye el sistema inmune. El tratamiento actual de esta enfermedad se basa en la combinación de tres o más antirretrovirales, pero es importante saber que no es un tratamiento que cure, si no que hace que el virus no crezca tan rápido y nuestro sistema inmune no se encuentre tan debilitado, evitando así posibles infecciones y complicaciones. Debido a la búsqueda constante para un tratamiento eficaz frente al VIH, se observó que las AgNPs presentan una alta eficacia para inhibir la replicación del virus. (18)

### 3. OBJETIVOS

Los avances en la nanotecnología han supuesto una amplia aplicación de las nanopartículas de plata y debido al aumento de la incidencia de cáncer en la sociedad y los estudios que se siguen realizando en encontrar una cura frente al VIH este trabajo tiene como objetivos:

1. Conocer las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs que hacen posible su aplicación en el campo médico.
2. Describir el mecanismo de acción de las AgNPs frente al VIH.
3. Describir el mecanismo de acción de las AgNPs como agentes antitumorales.
4. Estudiar la toxicidad de las AgNPs en el ser humano.

### 4. METODOLOGÍA

Este trabajo ha sido realizado mediante una revisión bibliográfica sobre nanopartículas de plata centrándonos en sus aplicaciones más innovadoras y novedosas en el ámbito de la nanomedicina.

La información recogida en este trabajo se obtuvo a través de artículos científicos, libros y tesis doctorales cuyo acceso se consiguió a través de las siguientes bases de datos: PubMed, Science Direct, ResearchGate, Google Scholar y BibliotecaUCM.

Las palabras claves utilizadas principalmente fueron: *silver nanoparticles, applications, cancertherapy, treatment VIH, genotoxicity*.

El objetivo es aunar y sintetizar la información obtenida sobre los usos actuales de las AgNPs en el tratamiento del cáncer y el VIH debido a su mecanismo de acción.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Síntesis de nanopartículas de plata

Las AgNPs pueden sintetizarse de diversas formas. El objetivo es encontrar un método de síntesis ideal que garantice la estabilidad de las AgNPs pues esa estabilidad influirá en los efectos biológicos que ejerzan en las dianas en las que actúen. (18,19)

De una manera muy general, los métodos de síntesis de las nanopartículas se pueden resumir en (20):

- **Síntesis física o método *Top-down*** → Aquellos métodos que van a reducir el tamaño del material de partida hasta llegar al tamaño nanométrico que deseamos. Su principal inconveniente es el alto consumo de energía y, por ende, el coste que requiere. (21)
- **Síntesis química o *Bottom-up*** → Método contrario al anterior. En este se parte de una dispersión molecular para llegar al estado de agregación nanométrico. Es un método químico en el que tenemos la plata en solución coloidal y formamos partículas a partir de esta. Este es el método más habitual debido a la gran estabilidad que poseen las nanopartículas obtenidas. En este método partimos de un precursor de la sal de la plata (normalmente  $\text{AgNO}_3$ ) que es reducido a través de una reacción química normalmente por el borohidruro de sodio,  $\text{NaBH}_4$ . (22) El inconveniente que supone esta manera de síntesis es que, a pesar de conseguir compuestos más estables que por el método de síntesis física, supone la formación de compuestos tóxicos por lo que se han investigado otras alternativas. (17)
- **Síntesis biológica (o síntesis verde)** → Supone una alternativa a los dos anteriores métodos, ya que es menos costosa y no implica la formación de sustancias tóxicas y por lo tanto es la que actualmente utilizamos. En este método de síntesis se utilizan como agentes reductores y estabilizadores moléculas no tóxicas (como proteínas o polisacáridos) producidas por organismos vivos, sobre todo plantas, algas, hongos y bacterias (21,22). La ventaja que encontramos de esta síntesis es la estabilidad que presentan las AgNPs y que evita los reactivos tóxicos que dañan al medio ambiente. El inconveniente es que los propios microorganismos utilizados como bacterias patogénicas puedan contaminar el producto. (24)

### 5.2 Propiedades fisicoquímicas

Conocer las diferentes propiedades (17,22) de las AgNPs constituye un paso esencial para poder entender su mecanismo de acción y aplicación en diferentes áreas. De manera muy resumida, se enuncian a continuación las principales propiedades fisicoquímicas que presentan las AgNPs.

- **Tamaño:** Al disminuir el tamaño aumenta el área superficial. Es por ello por lo que partículas más pequeñas, con área superficial más grande, presentan un efecto tóxico mayor. Se ha visto que el tamaño ideal para que tenga buena actividad frente a virus VIH es entre 1 y 10 nm (25). Además, ese pequeño tamaño también le permite interactuar con el genoma de bacterias.
- **Forma:** Las nanopartículas se emplean principalmente en forma esférica porque presentan mayor área superficial. Aun así, formas cúbicas y triangulares también presentan elevada área superficial, por lo que también son interesantes.
- **Carga superficial:** Las diferentes cargas superficiales de los recubrimientos de las AgNPs hacen que estas presenten distintos efectos biológicos por la diferente interacción con los sistemas biológicos.
- **Propiedades ópticas:** Gracias a un fenómeno conocido como excitación de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) las AgNPs son capaces de absorber radiación

electromagnética en la región visible (380-450 nm). Esta capacidad permite el desarrollo de terapias fototérmicas y termolíticas. Además, podrían formar parte del tratamiento con radiación de distintos cánceres.

- **Velocidad de disolución** (26): Esta propiedad es determinante en la seguridad de las nanopartículas. Influye en su modo de acción como agentes antimicrobianos, toxicidad o aplicaciones medicinales. La disolución es un proceso en el que las moléculas que forman parte de un sólido viajan desde la superficie a la solución por medio de una capa de difusión. Esta disolución media procesos como la liberación de iones, en este caso iones  $\text{Ag}^+$  que, además de tener propiedades medicinales *per se* puede ser un potencial tóxico.

Las propiedades fisicoquímicas que presentan las AgNPs hacen que tengan mecanismos diferentes a los iones plata. Sin embargo, debido a que las AgNPs liberan iones  $\text{Ag}^+$ , distinguir el efecto tóxico de uno u otro se ha visto dificultado (27). Lo que está claro es que sus propiedades hacen de este sistema una posible alternativa a tratamientos en diferentes enfermedades

### 5.3 Empleo de AgNPs en el tratamiento del VIH

Para poder entender el mecanismo de acción de las AgNPs frente al VIH es importante conocer ciertas características de este virus.

Como se ha dicho anteriormente, el VIH (virus de la inmunodeficiencia adquirida) es el agente patógeno que causa la enfermedad del SIDA. Este virus pertenece a la familia conocida como *Retroviridae* que presenta en su interior una enzima llamada retrotranscriptasa que les permite sintetizar ADN a partir de ARN, mecanismo conocido como retrotranscripción.

Su mecanismo de transmisión (28) es a través del contacto con fluidos corporales como son la sangre, semen, líquido preseminal, secreciones vaginales y leche materna. Para que ocurra la transmisión estos fluidos deben entrar en contacto con tejidos dañados de la otra persona o ser inyectado directamente al torrente sanguíneo. Es por eso por lo que las relaciones sexuales y el uso de las drogas inyectables constituyen el principal foco de transmisión.

La característica principal del VIH es la infección y destrucción de células vitales para el sistema inmune como son los linfocitos T  $\text{CD4}^+$  (29) de manera que al disminuir el número de estos linfocitos el organismo pierde la inmunidad celular lo que hace que sea más susceptible a otras infecciones.

Son partículas esféricas de un tamaño de 80-110 nm, por lo que las AgNPs pueden atacarles. Es un virus envuelto de una bicapa lipídica en la que se encuentran una serie de proteínas como son las glicoproteínas gp120 y gp41 que van a ser clave en la interacción con receptores celulares. Dentro se encuentra su genoma, constituido por dos moléculas de ARN, y tres enzimas que el virus necesita para su multiplicación que son: transcriptasa inversa (TI) que sintetiza ADN de doble cadena a partir de una hebra del ARN que luego se integrará en la célula hospedadora; proteasa e integrasa, cuya función es insertar el ADN viral en el genoma de la célula huésped para infectarla.

El ciclo replicativo (30) del virus es importante conocerlo pues será aquí donde podremos atacar. Se podría resumir en:

- **Enlace y fusión:** A través de gp120 y gp41 el virus interacciona con la célula. (31) Gp120 se une a un receptor celular denominado CD4 y posteriormente interacciona con los correceptores CCR5 o CXCR4; mientras, gp41 facilita la fusión a la membrana gracias a un cambio conformacional. Una vez que se ha unido y fusionado con la célula del huésped el virus libera su material genético dentro de la célula.
- **Transcripción inversa:** La enzima TI convierte una de las cadenas de ARN del virus en una doble cadena de ADN vírico. Esto supone un paso limitante en la replicación del VIH.

- **Integración:** Una vez que el nuevo ADN está dentro del núcleo la integrasa “envuelve” el nuevo ADN vírico con el ADN de la célula hospedadora. Una vez integrado el virus puede permanecer latente durante varios años o replicarse.
- **Transcripción:** Esta etapa supone la replicación del VIH a partir del nuevo ADN vírico donde se crean copias del material genéticos del VIH gracias a la polimerasa del ARN que utiliza de la propia célula hospedadora.
- **Ensamblaje:** La proteasa del VIH corta las largas cadenas proteicas del virus en cadenas cortas que se van uniendo a las copias de ARN del virus de manera que se ensambla una nueva partícula del virus.
- **Salida de la célula:** Una vez que se han ensamblado correctamente las proteínas virales, durante el proceso de gemación los virus salen a través de la membrana celular y van construyendo nuevas partículas víricas con capacidad de infectar otras células.

Desde que el virus del SIDA irrumpió en nuestras vidas, el descubrimiento de una vacuna eficaz ha sido y es uno de los objetivos de científicos del mundo. Actualmente no existe esa vacuna y no se puede garantizar la inmunidad por lo que el tratamiento actual se basa en una combinación de medicamentos antirretrovirales. Se trata de inhibidores de la TI, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la fusión, antagonistas del correceptor CCR5 en la membrana celular e inhibidores de la integrasa. Estos medicamentos evitan la replicación del virus por lo que reducimos su carga viral y así el sistema inmunitario puede recuperarse y combatir infecciones relacionadas con el VIH. Aunque los pacientes en tratamiento pueden llevar una vida normal y conseguir niveles en sangre casi indetectables del virus, no existe un tratamiento totalmente eficaz que elimine el VIH del organismo de aquellas personas que sufren la enfermedad. Este tratamiento actúa en su mayoría a nivel celular (33), por lo que el desarrollo de nuevas líneas de investigación, como es el uso de AgNPs, en la que atacamos directamente y podamos impedir la entrada al virus es de gran importancia en la lucha contra el VIH.

Es importante conocer la etapa de entrada y fusión. Aunque aún no se conoce con exactitud el mecanismo que presentan las AgNPs frente al VIH se ha propuesto que su acción es a nivel de la gp120, proteína que interacciona con el receptor CD4 de la célula humana. (33)

Uno de los primeros estudios (25) que describen la interacción entre las NPs y el virus hace referencia a que esta interacción se produce a través de las glicoproteínas de la superficie del virus, específicamente la gp120, inhibiendo la unión del virus a la célula. En este estudio tratan de comprobar la interacción con el VIH empleando para ello microscopía electrónica de transmisión de exploración de campo oscuro anular de ángulo alto (HAADF). Esta técnica, en términos generales, permite obtener imágenes basándose en el número atómico por lo que los elementos más pesados aparecen brillantes y los más ligeros en oscuro. Esto permite distinguir fácilmente a las AgNPs, con un peso elevado, del virus.

Como se ha explicado anteriormente, el virus VIH presenta en su membrana lipídica glicoproteínas de superficie entre las que destaca gp120. Esta se encuentra más expuesta al exterior además de presentar varias cadenas disulfuro próximas al sitio de unión a CD4 (32) lo que hace que sea más accesible a esas posibles interacciones con las AgNPs.

Respecto a la técnica de HAADF, en el caso de que el número atómico sea similar, las imágenes de contraste las obtendremos de las variaciones de densidad de la muestra. Esto es lo que ocurre con los componentes del virus. Su membrana está formada por lípidos muy empaquetados y, por tanto, muy densos. Como presenta esas glicoproteínas de superficie de menor densidad, estas áreas se ven más claras.

En el estudio emplearon AgNPs marcadas de tres maneras diferentes: carbono espumoso, poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP) y albúmina de suero bovino (BSA).

Gracias a la técnica de HAADF consiguieron ver que la interacción es dependiente de tamaño, pues solo las nanopartículas de tamaño inferior a 10 nm se unían al virus de manera significativa. Además, esta unión no era aleatoria. Se vio que había diversas zonas a las que se unían de manera regular. Estas estructuras a las que se unían se encontraban separadas por la misma distancia a la que se encuentran los botones de la gp120. Por esas características propusieron que la zona de unión era la gp120.

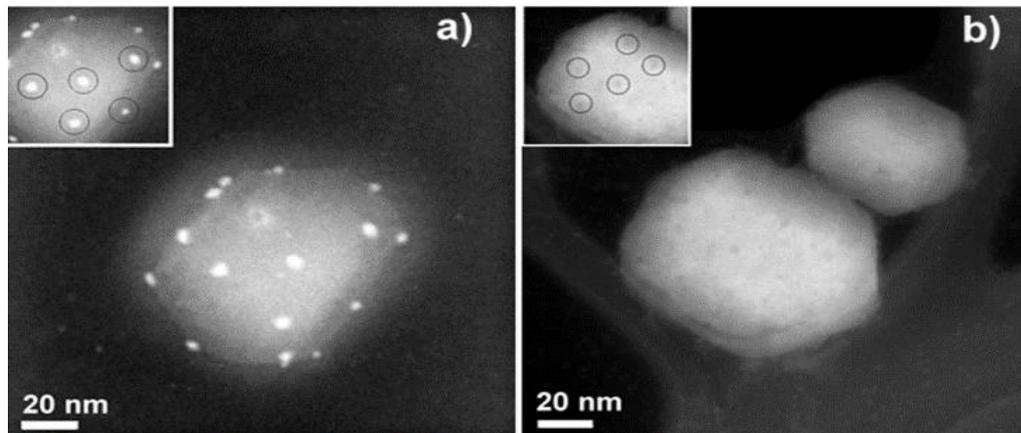


Figura 4. Imágenes de HAADF del VIH expuesto (a) y no expuesto (b) a AgNPs. Imagen tomada de referencia 25.

Midieron los efectos de las AgNPs frente al VIH. De la misma forma en la que los datos que obtuvieron sobre la interacción fueron congruentes con los distintos tipos de agentes que utilizaron para marcar a las AgNPs, no lo fueron respecto a la toxicidad e inhibición y no obtuvieron datos concluyentes. Por eso no se pudo demostrar una evidencia directa entre la acción de las AgNPs y su interacción con gp120. Este estudio se realizó en 2005 y fue uno de los primeros, por lo que sirvió de base a otros estudios posteriores.

El que sí demostró el mecanismo de acción fue el estudio realizado en 2010 por Lara *et al.* (33). En este estudio estudiaron la actividad antiviral de iones plata partiendo de la hipótesis que establecieron Elechiguerra *et al.* sobre que la diana molecular era gp120. Obtuvieron varios resultados:

1. Evaluaron el efecto antiviral de los iones plata en forma de sulfadiazina de plata y  $\text{AgNO}_3$ . Aunque ambas sales también inhibieron la infección por VIH su índice terapéutico fue 12 veces menos que el de las AgNPs.
2. Realizaron un ensayo de adsorción al virus para confirmar que la actividad frente al virus que presentan las nanopartículas se podía atribuir a la inhibición de la unión del virus al receptor de la célula humana. Utilizaron un fármaco antiviral inhibidor de la fusión (Enfuvirtida) como control. El resultado que obtuvieron indicó que las AgNPs actúan a nivel de las etapas iniciales del ciclo de infección por VIH.
3. Realizaron un ensayo de fusión en el que simulaban el proceso de fusión entre el VIH y la célula huésped a través de la unión con gp120-CD4. Para ello utilizaron un cultivo celular de células HL2/3 (que expresan en su superficie las proteínas Env y Tat del VIH en sus citoplasmas) y se co-cultivaron con células Hela-CD4-LTR-B-gal (células indicadoras) en relación 1:1. Este cocultivo se incubó en presencia y ausencia de AgNPs para medir la unión de la proteína Env con CD4. Estas líneas celulares se emplearon pues ambas se fusionan como resultado de la interacción gp120 y CD4; además, la cantidad de células fusionadas se pueden medir de una manera fácil a través del gen B-gal.

- Se vio como en presencia de una mezcla de estas células, las AgNPs consiguieron bloquear la fusión entre ambas células de manera dependiente a la dosis. Por el contrario, los fármacos controles (AZT, UC781 e Indinavir) no inhibieron la fusión celular en este ensayo de fusión.
4. Midieron la capacidad inhibitoria que presentan las AgNPs frente a la interacción gp120-CD4. Esta actividad se midió a través de la técnica *ELISA gp120 capture Assay Immunodiagnosics Incorporated*. Se trata de un kit de ELISA que detecta a gp120. ELISA es una técnica que nos permite detectar y cuantificar proteínas y antígenos que se encuentran inmovilizados mediante un anticuerpo enlazado a una enzima que, al detectarlo cambia de color, pudiendo medir la absorbancia por un espectrofotómetro. Incubaron una cantidad constante de gp120 durante 10 minutos con cantidades diferentes de AgNPs y un control sin AgNPs. Estas diferentes soluciones fueron depositadas en los pocillos del ELISA que previamente se habían impregnado con CD4. Los datos que obtuvieron aceptan la hipótesis de que las AgNPs bloquean la entrada viral a través de la interacción gp120-CD4 por lo que inhiben la infección del VIH.
  5. Llevaron a cabo el conocido TAE (experimento por adición en tiempos) con el fin de poder determinar la etapa del ciclo replicativo del virus donde actúan las AgNPs, pues una de las premisas era conocer en qué etapa actúan las nanopartículas. Para ello, utilizaron también células HeLa que expresan CD4, CXCR4 y CCR5. Primero fueron infectadas con virus libre y luego añadieron los antirretrovirales controles (Tak-779, AZT, Indinavir y 118-D-24) que actúan a diferentes niveles del ciclo replicativo, frente a las AgNPs. Los resultados que obtuvieron mostraron que la actividad antiviral de los anteriores fármacos comenzaba a disminuir una vez que la etapa a la que se dirigen ya había pasado. Las AgNPs, por su parte, eran capaces de continuar su actividad antiviral pasadas 12 horas de haber inoculado al virus, lo que demuestra que intervienen en otras etapas y no solo en la de fusión (la cual se creía que era su diana).
  6. También vieron la actividad que presentan las AgNPs a diferentes concentraciones sobre el VIH libre y el virus asociado a células. Ambos se encuentran en el semen y secreciones cervicovaginales y se pueden transmitir a través de la barrera mucosa del cervix. Tras los resultados obtenidos demostraron que las AgNPs actúan directamente en el virión y lo inactivan.

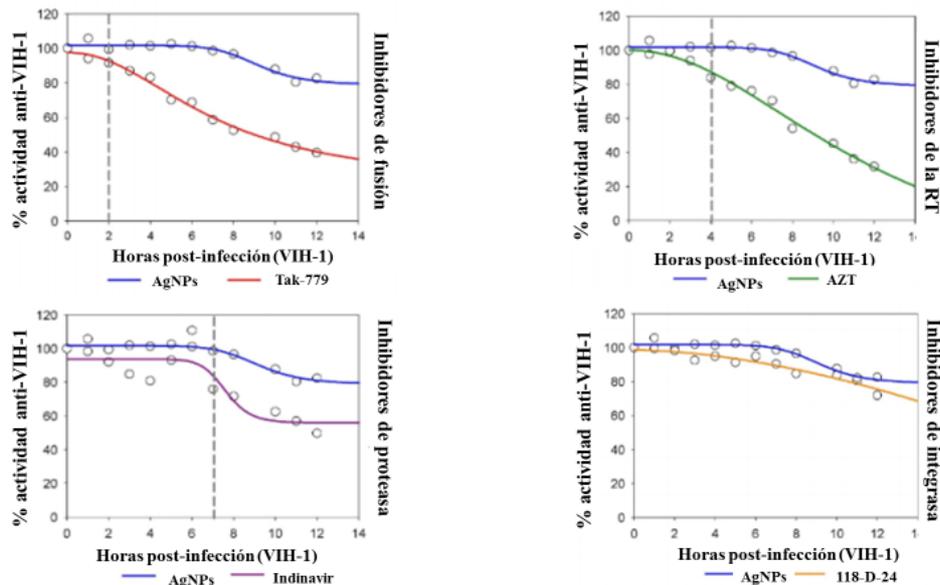


Figura 5. Actividad anti-VIH-1 de AgNPs frente a los diferentes fármacos. Figura tomada de referencia 33.

Otro estudio realizado también en 2010 (34) estudió la acción de las AgNPs recubiertas con PVP frente al VIH en un modelo de cérvix humano, sabiendo que es una de las principales fuentes de infección. Para ello emplearon AgNPs que recubrieron con PVP en un gel no espermicida (Replens). Así pudieron ver que estas nanopartículas inhibían rápidamente la transmisión del VIH y presentaba una protección del tejido cervical de hasta 48 horas frente a la infección.

Aun así, en todos los estudios hacen referencia a la necesidad de pruebas *in vivo* sobre la toxicidad, farmacocinética y farmacodinamia de las AgNPs siendo aún un campo inexplorado.

### 5.1 Empleo de AgNPs como agentes antitumorales

Según la *American Cancer Society* (35), el cáncer es el conjunto de enfermedades que se caracteriza por un crecimiento descontrolado de las células. Las células normales siguen un orden a la hora de dividirse. Sin embargo, en el cáncer las células crecen sin ningún control. El área donde esas células crecen sin control da lugar a una masa denominada tumor. El proceso de desarrollo del cáncer se conoce como carcinogénesis. Es un proceso que dura años y en el que están implicados los agentes carcinógenos, responsables del inicio de este proceso.

Actualmente existen multitud de cánceres conocidos. No existe un único desencadenante del cáncer, además no se conocen completamente. Se sabe que ciertos factores aumentan la posibilidad de padecer cáncer. Según la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) (36), el 40% de los cánceres se debe a la acción de estos factores externos (pueden ser físicos, químicos y/o biológicos) que actúan sobre el organismo y que la persona puede modificar con el cambio en los hábitos de vida. En función del tipo de cáncer existen distintos agentes carcinógenos. En el resto de los casos no se conoce con exactitud el mecanismo por el que se desarrolla el cáncer por lo que se piensa que es debido a mutaciones espontáneas en los genes.

Existen distintos tratamientos para el cáncer. Este se elegirá en función del tipo de cáncer y del grado que sea. Podríamos resumirlo en: cirugía (se extirpa el cáncer del cuerpo), radioterapia (se usa radiación en altas dosis), quimioterapia (uso de fármacos), inmunoterapia (destinado a ayudar al sistema inmune a combatir el cáncer) y terapia hormonal (uso de hormonas principalmente para el cáncer de mama y de próstata).

De manera más novedosa, se ha estudiado el uso de las AgNPs como agente anticancerígeno. Uno de los mecanismos (37) por el cual las AgNPs inducen citotoxicidad es debido a la producción de ROS y liberación de iones  $Ag^+$ . Cuando la producción de ROS es mayor que la capacidad antioxidante celular se produce estrés oxidativo y los consiguientes cambios biológicos. Las AgNPs generan ROS de una manera similar a la que se ha explicado en el apartado en la actividad antimicrobiana de las AgNPs. Las ROS son subproductos del metabolismo oxidativo celular que participan en la modulación de la supervivencia, muerte, señalización y diferenciación celular. Son muy reactivos y son capaces de provocar daños oxidativos a nivel de proteínas y ADN. Entre las especies reactivas más conocidas encontramos radicales libres como los iones superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^-$ ) y no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Los niveles de las ROS están regulados por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) o glutatión (GSH) que presentan acción antioxidante y se considera un sistema de defensa para la supervivencia celular. Las ROS intracelulares se generan principalmente en mitocondrias (siendo esta la fuente principal), retículo endoplasmático (RE), peroxisomas, microsomas y los complejos de NOX en las membranas celulares. De manera extracelular, la radiación, contaminación y exposición a diversos nanomateriales inducen también la producción de ROS (38).

Las AgNPs son capaces de generar también ROS, tanto como nanopartículas como por la liberación de  $\text{Ag}^+$  en la célula. A través de la difusión y, sobre todo, por endocitosis; invaden la célula y llegan a la mitocondria, orgánulo clave en la generación de especies reactivas (39). Aquí interfieren en la cadena de transporte de electrones lo que se traduce en un aumento a nivel celular de radicales libres, interrupción de la síntesis de ATP y la activación de la apoptosis dependiente de las mitocondrias. El exceso de producción de ROS hace que se activen diferentes vías de señalización que regulan la muerte celular como es la de la p53 y la caspasa 3. También estos ROS estimulan la señalización inflamatoria  $\text{TNF-}\alpha$  (40) que causa daño en la membrana. El resultado de ambos es la apoptosis de la célula.

Por otro lado, al aumentar los radicales libres se reduce GSH, por lo que no se puede controlar la producción de ROS y se produce el estrés oxidativo. Esto conduce a una serie de consecuencias: daño oxidativo en el ADN y alteración en la formación y función de proteínas lo que conduce a la muerte celular (17,37,38).

Además, diferentes autores han hecho referencia a las propiedades de las AgNPs como agente antiproliferativo (41) y antiangiogénico (42). Para poder entender qué ocurre en el cáncer podemos hacer comparación con una célula normal. En condiciones normales la célula sigue su ciclo celular que pasa por diferentes fases. La célula crece, replica su material genético y se divide dando lugar a otra célula. En el cáncer, las células cancerígenas sufren mutaciones en su genoma, por lo que este ciclo funciona mal y se produce una proliferación descontrolada (43). Estudios (44) sugieren que las AgNPs pueden detener la fase sub G1 de las células cancerígenas (fase en la que la población de células cancerígenas aumenta (45)), inhibiendo así su proliferación.

Respecto a la angiogénesis, se demostró que las AgNPs anulaban este proceso inducido por VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) en ratones y modelos de rata. La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes. Este proceso es de vital importancia en la cicatrización de heridas, pero también se cree que el crecimiento de tumores puede deberse a este proceso de angiogénesis ya que los nuevos vasos suministrarían los nutrientes y el oxígeno que las células cancerígenas necesitan para invadir el resto de los tejidos y órganos (44).

De manera resumida podríamos decir que las AgNPs pueden invadir la célula a través de procesos como endocitosis o difusión. Una vez dentro tanto las nanopartículas por sí mismas como por la liberación de  $\text{Ag}^+$  son capaces de generar ROS además de poder inhibir la división celular y el proceso de angiogénesis. Esto implica:

- Un aumento de estrés oxidativo que conduce a daño en el ADN y proteínas y que supone la muerte celular.
- Apoptosis de la célula debido a la activación de diferentes vías de señalización.
- Acción antiproliferativa al detener la fase G1 del ciclo celular.
- Acción angiogénica.

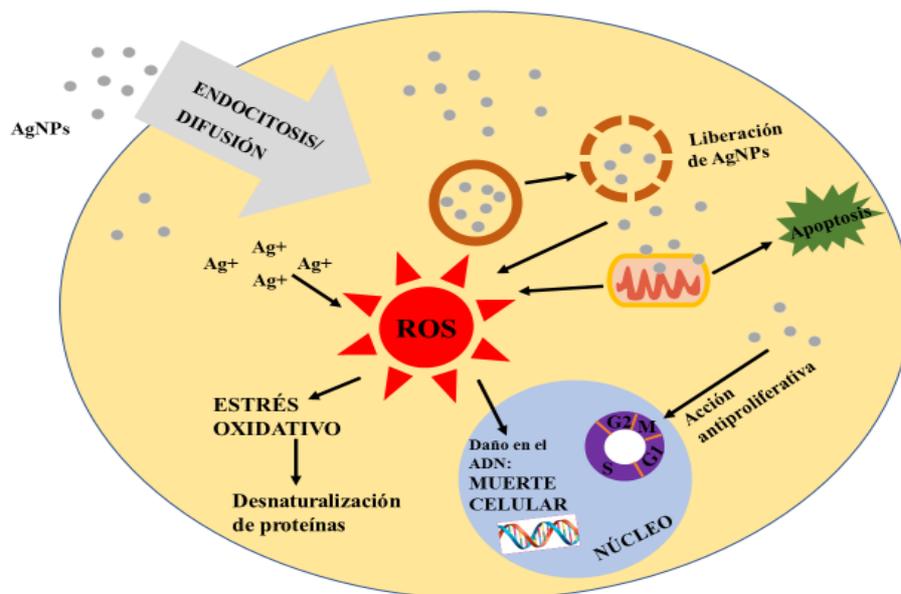


Figura 6. Imagen adaptada de referencias 38 y 40.

En diferentes estudios se ha demostrado la eficacia de las AgNPs frente a diferentes líneas celulares cancerígenas.

Frente a la leucemia (46) se demostró que AgNPs recubiertas con PVP tenían la capacidad de generar ROS y liberar iones plata, daños en la membrana de la mitocondria, daño en el ADN y apoptosis. Si que vieron que la N-Acetilcisteína y la vitamina C eran capaces de revertir estos efectos por ser agentes antioxidantes.

En ensayos realizados en células de cáncer de mama MDA-MB-231 con AgNPs sintetizadas a través de síntesis verde con dos tipos diferentes de organismos (47) también observaron que se generaban ROS. La diferencia es que investigaron acerca del papel que tenía p53. Su ensayo sugiere que se necesita la activación de p53 para generar ROS además de despolarizar la membrana de la mitocondria y activar la caspasa 3. Esto se traduce en que las nanopartículas son capaces de interferir en la proliferación de las células e inducir la apoptosis.

También se realizaron ensayos frente a la línea celular MCF-7. En uno de ellos (16) obtuvieron efectos citotóxicos dependiente de dosis.

En otro (48) vieron que las AgNPs inducían la producción de ROS con el consiguiente daño mitocondrial y estrés oxidativo en el retículo endoplasmático (RE). Esto permite la modulación de la actividad de la glucoproteína P. Tras esto, células resistentes a la acción de fármacos anticancerígenos se sensibilizaban, potenciando el efecto de los fármacos.

De manera similar a este último se vio en otro ensayo (49) como las AgNPs aumentaban la actividad apoptótica de la gemcitabina (agente antitumoral) en células del cáncer de ovario. Se vio como el efecto antitumoral en esta terapia combinada era mayor que si se usaban por separado.

También se realizó frente al cáncer de pulmón en líneas celulares A549 con AgNPs recubiertas con PVP (50). Se vio que se generaban ROS y se reducía la función mitocondrial. Esto provocaba la activación de caspasa-3 lo que inducía a la apoptosis.

Otro estudio (51) de terapia combinada con metotrexato (agente antitumoral en cánceres que expresen receptores de folato), óxido de grafeno (usado en varios ámbitos, entre ellos ablación fototérmica de células tumorales) y AgNPs (que generan ROS provocando daño en el ADN celular) respalda la idea de que este tratamiento combinado es un potencial tratamiento frente a distintos tipos de cáncer.

Todo esto hace de las AgNPs un potencial agente antitumoral tanto él solo como en terapia combinada con distintos fármacos.

## **5.2 Riesgos toxicológicos de AgNPs**

Siempre se ha pensado que la plata presenta pocos efectos tóxicos, a excepción de la enfermedad de argiria. Esta enfermedad se produce en aquellas personas que tienen exposición prolongada a la plata en forma de sales o de metal y que conduce a la coloración azulada-grisácea de la piel de la persona expuesta.

Es importante entender que la plata en forma de nanopartículas presenta propiedades diferentes respecto a la plata como la conocemos. Dado que la exposición a las AgNPs es cada vez mayor gracias a su uso en medicina, industria textil y alimentaria, es importante evaluar sus riesgos en el ser humano.

Autores (52) establecen que las concentraciones tóxicas de iones plata son de 1 a 10 mg L<sup>-1</sup> y de 10 a 100 mg L<sup>-1</sup> para las AgNPs. Esto nos haría pensar que, si ya de por sí la plata no presenta numerosos efectos tóxicos, en forma de nanopartícula habría menor riesgo.

Ya se ha comentado en el apartado anterior el mecanismo de toxicidad que presentan las AgNPs en las células humanas. De manera controlada y como terapia dirigida frente a células cancerígenas las AgNPs son un potencial agente antitumoral debido al mecanismo de acción que presentan. Cuando la exposición aumenta a través de diferentes vías, nuestro organismo y nuestras células están expuestas a la acción de las nanopartículas, provocando daño.

Las vías de exposición más importantes son la vía oral a través de la ingestión, respiratoria por inhalación y contacto dérmico (53,54).

- **Vía oral:** tras la ingesta de AgNPs estas y/o iones plata son capaces de llegar al intestino a través de circulación sistémica donde causan úlceras intestinales. A través del torrente sanguíneo son capaces de llegar al hígado (se cree que es el órgano diana de las AgNPs) y causa daño, provocando inflamación.
- **Vía respiratoria:** tras la inhalación de las nanopartículas se ha observado que estas son capaces de depositarse en la cavidad nasal y regiones alveolares provocando inflamación. Esto conduce a lesiones pulmonares y puede afectar a la reactividad vascular lo que aumenta las lesiones por isquemia (55).
- **Vía dérmica:** dado el uso de las AgNPs en textiles y apósitos las nanopartículas son capaces de entrar en contacto directo con la piel. Una vez han atravesado la piel, los queratinocitos de la piel fagocitan a las AgNPs y causan inflamación. Además, depósitos de plata dentro de la piel conducen a argiria,

Factores como el tamaño, forma, recubrimiento, carga superficial, dosis y el tipo de célula afectan al daño que hacen las nanopartículas. Estos factores también afectan al daño que se produce en los órganos cercanos a los que llegan las AgNPs (54).

Independientemente de la vía de exposición, gracias a su tamaño se ha visto que las AgNPs son capaces de llegar a circulación sistémica y distribuirse por órganos y tejidos siendo el hígado el órgano más afectado (56).

Es importante entender que el efecto tóxico que presentan las AgNPs aún no se conoce completamente y que se tiene que seguir estudiando. A pesar de tener estudios que hacen referencia a su mecanismo de toxicidad no se sabe realmente si se debe a las nanopartículas como tal o a su liberación como iones plata.

## 6. CONCLUSIÓN

El uso de las nanopartículas de plata constituye una innovación en el ámbito médico gracias a características como su pequeño tamaño y el área superficial que presenta. Siendo su uso como antibacteriano su aplicación más explotada y documentada se ha querido en esta revisión bibliográfica hacer hincapié en su posible uso en dos enfermedades para las que actualmente no existe cura.

Tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica se ha visto que las AgNPs interactúan con el VIH en una etapa de replicación viral temprana pero que además su efecto perdura hasta etapas posteriores una vez que el virus ha entrado en la célula. Las AgNPs se unen a gp120 impidiendo la unión, fusión y posterior infección de los viriones a los receptores CD4 de la célula humana. De esta manera, las AgNPs actúan como agente virucida eficaz frente a células libres y virus asociados a células.

Respecto al cáncer, podemos decir que las AgNPs inducen toxicidad de la célula cancerígena a través de la generación de ROS que inducen a estrés oxidativo provocando daño en el ADN y proteínas. De esta manera se conduce a la apoptosis de la célula. Además, son capaces de potenciar el efecto cancerígeno de fármacos antitumorales como metrotexato en terapia combinada.

Y es que, a pesar de la multitud de estudios que existen, aún no está claro el mecanismo por el cual las AgNPs causan daño y provocan los efectos que antes hemos visto. Por ello es tan necesario seguir estudiando y realizar más ensayos para lograr aumentar la selectividad de las AgNPs frente a las células cancerígenas y conocer con exactitud su mecanismo y ver así los efectos que presentan, minimizando los riesgos y efectos secundarios en nuestras células.

Aunque expertos hacen referencia a que los riesgos frente a la exposición de la plata no son altos, debido a que el uso de AgNPs es cada vez mayor tanto en el campo de la medicina como en otros campos a los que estamos expuestos diariamente es importante seguir haciendo estudios de los posibles riesgos que presentan tras la exposición a largo plazo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lansdown ABG. Silver in healthcare: Antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol*. 2006; 33:17-34
2. Barillo D, Marx D. Silver in medicine: the basic science. *Burns*. 2014;40(1):9-18
3. Politano A, Campbell P, Rosenberg L, Sawyer R. Use of silver in the prevention and treatment of infections: Silver Review. *Surg Infect (Larchmt)*. 2013;14(1):8–20.
4. Ahuja RB, Gupta A, Gur R. A prospective double-blinded comparative analysis of framycetin and silver sulphadiazine as topical agents for burns: A pilot study. *Burns*. 2009;35(5):672-676.
5. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 2010;28(11):580-588.
6. National Nanotechnology Initiative [Internet]. What´s so especial about the nanoscale). Disponible en: <https://www.nano.gov/nanotech-101/special>
7. Lizarazo Salcedo CG, González Jiménez EE, Arias Portela CY, Guarguati Ariza, J. Nanomateriales: un acercamiento a lo básico. *Med. Segur. Trab*. 2018; 64(251).
8. Chaparro Chaparro, F, Quintero Reyes, R. Nanociencia, nanotecnología, nanomateriales. *La Revolución Industrial del Siglo XXI. Letras con ciencia tecnológica*. 2008; 4:62-74
9. Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*. 2011;12(7):620-636.
10. Kim B, Rutka J, Chan W. Nanomedicine. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2434-43.
11. Ebrahiminezha A, Raei M, Manafi Z, Jahromi A, Ghasemi Y. Ancient and novel forms of silver in medicine and biomedicine. *JAMSAT*. 2016; 2(1): 122-128.
12. Prabhu S, Poulouse E. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett*. 2012; 2(32).
13. Bonilla L, Chevallier P, Sarkissian A, Mantovani D. Silver-based antibacterial strategies for healthcare-associated infections: Processes, challenges, and regulations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020; 24:102-142.
14. Durán N, Durán M, de Jesus, MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016; 12(3):789–799.
15. Gómez Quintero T, Arroyo Ornelas MA, Hernández Padrón G, Acosta Torres LS. Nanopartículas de plata: Aplicaciones biomédicas. *Química Hoy*. 2013;3(3):8-15.
16. Venugopal K, Rather HA, Rajagopal K, Shanthi MP, Sheriff K, Illiyas Met al. Synthesis of nanoparticles (AgNps) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *J Photochem Photobiol B*. 2017; 167:282-289.
17. Wei L, Lu J., Xu, H., Patel A, Chen, Z, Chen, G. Silver nanoparticles: synthesis, properties and therapeutic applications. *Drug Discove Today*. 2015; 20(5):595-601.
18. Wong K, Liu X. Silver nanoparticles-the real “silverbullet” in clinical medicine? *Med Chem Comm*. 2010; 1(2):125-131.
19. Tran Q, Nguyen V, Le AT. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol*. 2013; 4 (3)
20. Leyva G. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad*. 2013; 2(1): 18-22.
21. Prabhu S, Poulouse, E. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2012; 2(32).

22. Syafiuddin A, Salmiati, Salim MR, Beng Hong Kueh A, Hadibarata T, Nur H. A review of silver nanoparticles: research trends, global consumption, synthesis, properties, and future challenges. *J. Chin. Chem. Soc.* 2017; 64(7):732-756.
23. Dash SS, Samanta S, Dey S, Giri B, Dash SK. Rapid Green Synthesis of biogenic silver nanoparticles using *Cinnamomum tamala* leaf extract and its potential antimicrobial application against clinically isolated multidrug-resistant bacterial strains. *Biological Trace Element Research.* 2020.
24. Cardoso P. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños.* 2016; 58(260): 19-28.
25. Elechiguerra JL, Burt J, Morones J, Camacho-Bragado A, Lara H, Yacaman MJ. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. of Nanobiotechnology.* 2005; 3(6).
26. Misra S, Dybowska A, Berhanu D, Luoma S, Valsami-Jones E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *STOTEN.* 2012; 438:225-232.
27. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K, Park K, Yi K, Yi J, Ryu D. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro.* 2009;23(6):1076-84.
28. Centros para el control y la prevención de enfermedades. Transmisión del VIH. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hiv/spanish/basics/transmission.html>
29. Delgado R. características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2011; 29(1):58-65.
30. Santana A, Dominguez C, Lemes A, molero T, Salido E. Biología celular y molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). *Rev Diagn Biol.* 2003;52(1).
31. Galdiero S, Falanga A, Vitiello M, Cantisani M, Marra V, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules.* 2011; 16(10):8894-8918.
32. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thoman JN, Gregory TJ. Assignment of intra chain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1990; 265: 10373-82.
33. Lara HH, Ayala-Nuñez N, Ixtepan-turrent L, Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnol.* 2010;8(1).
34. 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. *J Nanobiotechnol.* 2010;8(15).
35. American Cancer Society. ¿Qué es el cáncer? Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
36. Asociación Española Contra el Cáncer. ¿Qué es el cáncer? Causas del cáncer Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/factores-riesgo>
37. McShan D, Ray P, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *JFDA.* 2014; 22(1):116-127.
38. Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, *et al.* The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1):120.
39. Raja G, Jang Y.-K, Suh J.-S, Kim, H.-S, Ahn S.H, Kim T.-J. Microcellular Environmental Regulation of Silver Nanoparticles in Cancer Therapy: A Critical Review. *Cancers.* 2020;12(3):664.
40. Akter M, Sikder MT, Rahman MM, *et al.* A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res.* 2017; 9:1-16.

41. Asharani P, Hande MP, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* 2009; 10:65.
42. Gurunathan S, Lee K-J, Kalishwaralal K, et al. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 2009; 30(31):6341-6350.
43. Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *PNAS.* 1997; 94(7):2776-2778.
44. Ratan ZA, Haidere MF, Nurunnabi M, et al. Green Chemistry Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Potential Anticancer Effects. *Cancers.* 2020;12(4):855.
45. Mao X, Seidlitz E, Truant R, Hitt M, Gosh HP. Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene.* 2004; 23: 5632-5642.
46. Guo D, Zhu L, Huang Z, et al. Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials.* 2013;34(32):7884-7894.
47. Gurunathan S, Park Jh, Hang JW, Ki J-H. Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10:4203-4223.
48. Gopisetty MK, Kovács D, Igaz N, et al. Endoplasmic reticulum stress: major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells. *J Nanobiotechnology.* 2019;17(1):9.
49. Yuan Y-G, Peng Q-L, Guranathan S. Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12:6487-6502.
50. Dadashpour M, Firouzi-Amandi A, Pourhassan-Moghaddam M, et al. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria chamomilla* extract and their potential anticancer activity against human lung cancer cells. *Mat Sci Eng C-Bio S.* 2018;92(1):902-912.
51. Thapa RK, Kim JH, Jeong JH, et al. Silver nanoparticle-embedded graphene oxide-methotrexate for targeted cancer treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;153(1):95-103.
52. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chemie - Int Ed.* 2013;52(6):1636-53.
53. Ávalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 2013;7(2):1-23.
54. Ferdous Z, Nemmar, A. Health impact of silver nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *Int J Mols Sci.* 2020;21(7):2375.
55. Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Ficai A, Andronescu E. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel).* 2018;8(9):681.
56. Del Rocío Coutiño EM, Ávila Lagunes, L, Arroyo Helguera O. Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *REB.* 2017;36(2):39-54.