



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO HEMOLÍTICO DE ARGOVIT™ EN ERITROCITOS DE  
DONADORES SANO Y DIABÉTICO COMO BASE PARA APLICACIONES  
TERAPÉUTICAS EN HUMANOS

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

ROBERTO LUNA VÁZQUEZ GÓMEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA MÉXICO. DICIEMBRE DE 2020.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO HEMOLÍTICO DE ARGOVIT™ EN ERITROCITOS DE  
DONADORES SANO Y DIABÉTICO COMO BASE PARA APLICACIONES  
TERAPÉUTICAS EN HUMANOS”

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

ROBERTO LUNA VÁZQUEZ GÓMEZ

Aprobado por:



---

DRA. MARÍA EVARISTA  
ARELLANO GARCÍA  
Director de tesis  
Presidente del Comité



---

DR. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS  
Sinodal  
Miembro del Comité



---

DRA. YANIS TOLEDANO  
MAGAÑA Sinodal  
Miembro del Comité



---

DRA. PATRICIA RADILLA  
CHÁVEZ Sinodal  
Miembro del Comité



---

DR. DAVID SERGIO SALAS  
VARGAS Sinodal  
Miembro del Comité

## DEDICATORIA

*Este trabajo está dedicado a mis padres; María Guadalupe Vázquez Gómez Molina† y Miguel Luna Castillo†, quienes me enseñaron a amar y ser tolerante con todos los seres humanos.*

*A mis hermanos Miguel, Rosa, Charlie, Memo y Marcela, que son un ejemplo de integración y amor.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco inconmensurablemente a mi esposa Nina, quien siempre me alentó en los tiempos difíciles del desarrollo de esta tesis. (nunca estaremos solos Nina).

A mi Directora de tesis, la Dra. María Evarista Arellano García (Eva), quien representa para mí un ejemplo de formación humana y sabiduría. (Eva, eres luz).

A los miembros de mi comité de tesis; los Dres. Juan Carlos García Ramos y Yanis Toledano Magaña, quienes con su ejemplar paciencia y tolerancia hicieron posible este trabajo (Juan Carlos y Yanis; muchas, muchas gracias). Así mismo a los Dres. Patricia Radilla Chávez y David Sergio Salas Vargas por su apoyo en este trabajo y en el trabajo académico que compartimos.

A mis amigos Balam y Pancho quienes, para mí, son sinónimos vivientes de nobleza y dedicación. (no necesariamente en el orden mencionado).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por darme la oportunidad de superarme académicamente.

A los proyectos: PAPIIT-UNAM IT200114, así como al proyecto CONACYT No. 270242, Redes 279889 otorgados a la Red Internacional de Bionanotecnología con Impacto en Biomedicina y Bioseguridad, por proporcionar los materiales de estudio.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

A la Escuela de Ciencias de la Salud, por facilitarme sus instalaciones para realización de este trabajo.

## RESUMEN

Con el surgimiento de la nanotecnología en la década de los 80, las aplicaciones de los nanomateriales se han venido diversificando continuamente hasta nuestros días. En particular, las aplicaciones de la nanotecnología en el campo biomédico han cobrado relevancia por su impacto potencial en la salud humana y el medio ambiente. En el caso específico de las nanopartículas de plata (AgNPs); el poder microbicida que estas tienen ha llevado a la nanotecnología a buscar alternativas novedosas que permitan hacer frente a la crisis mundial de antibióticos. En el presente trabajo se evaluó el efecto hemolítico de las AgNPs Argovit mediante la prueba de hemólisis *ex vivo* pH-dependent hemólisis assay, sobre eritrocitos de donador diabético (EDD) en paralelo con eritrocitos de donador sano (EDS), frente al nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Nuestros resultados muestran que existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el porcentaje de hemólisis que ejercen las AgNPs Argovit (4%) sobre EDD y el que ejercen en EDS ( $\approx 0\%$ ) sin exceder el límite de no hemólisis de 5%, a concentraciones  $\leq 24 \mu\text{g} / \text{mL}$  de contenido de Ag en las AgNPs, mientras que el  $\text{AgNO}_3$  a la misma concentración produce porcentajes de hemólisis mucho mayores en EDD (18%) y EDS (13%), excediendo el límite de baja hemólisis de 10%. También se muestra que los EDD tienen mayor susceptibilidad a la hemólisis que los EDS bajo el mismo contenido de Ag ya sea por las AgNPs Argovit o por  $\text{AgNO}_3$ , por lo que se evidencia que las AgNPs poseen un mecanismo hemolítico adicional al de los iones  $\text{Ag}^+$ . También se presenta un resumen gráfico de los bioefectos de Argovit reportados en otros trabajos para compararlos con el efecto hemolítico que aquí se reporta. Adicionalmente se aborda una comparación del efecto hemolítico de otras nanopartículas (reportado en otros trabajos) y el que ejerce Argovit en el presente estudio. Nuestros resultados muestran que a concentraciones  $\leq 400 \mu\text{g} / \text{mL}$ , las AgNPs Argovit no son hemolíticas; tanto en EDS como en EDD.

## ABSTRACT

With the emergence of nanotechnology in the 1980s, the applications of nanomaterials have been continuously diversifying to this day. In particular, the applications of nanotechnology in the biomedical field have gained relevance due to their potential impact on human health and the environment. In the specific case of silver nanoparticles (AgNPs); the microbicidal power they have, has led nanotechnology to seek novel alternatives that allow it to face the global antibiotic crisis. In the present work, the hemolytic effect of Argovit AgNPs was evaluated by the *ex vivo* pH-dependent hemolysis assay on diabetic donor erythrocytes (DDE) in parallel with healthy donor erythrocytes (HDE), against silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ). The present work shows that there are significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the percentage of hemolysis exerted by Argovit AgNPs (4%) on EDD and that exerted on EDS ( $\approx 0\%$ ) without exceeding the limit of no hemolysis of 5%, at concentrations  $\leq 24 \mu\text{g} / \text{mL}$  of Ag content in AgNPs, while  $\text{AgNO}_3$  at the same concentration produces much higher percentages of hemolysis in EDD (18%) and EDS (13%), exceeding the limit of low hemolysis of 10%. It is also shown that EDDs have a greater susceptibility to hemolysis than EDS under the same Ag content either by Argovit AgNPs or by  $\text{AgNO}_3$ , thus it is evidenced that AgNPs have an additional hemolytic mechanism to that of  $\text{Ag}^+$  ions. A graphical summary of the Argovit bio-effects reported in other works is also presented to compare them with the hemolytic effect reported here. Additionally, a comparison of the hemolytic effect of other nanoparticles (reported in other works) and that exerted by Argovit in the present study is addressed. Our results show that at concentrations  $\leq 400 \mu\text{g} / \text{mL}$ , Argovit AgNPs are not hemolytic; in both EDS and EDD.

<b>Contenido</b>	
<b>Contenido</b> .....	7
<b>Lista de figuras</b> .....	8
<b>Lista de tablas</b> .....	9
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	4
2.1 Trabajos realizados con Argovit .....	5
2.2 Hemólisis .....	19
2.3. La Diabetes y el eritrocito humano .....	19
2. 2.4. Estudios de hemólisis producida por iones Ag <sup>+</sup> y AgNPs .....	24
<b>3. Justificación</b> .....	28
<b>4. Objetivo general</b> .....	29
4.1. Objetivos específicos .....	29
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	30
5.1. Diseño experimental .....	30
5.2. Caracterización de las AgNPs Argovit .....	35
5.3. Preparación de soluciones .....	36
5.4. Preparación de suspensión de eritrocitos .....	38
5.5. Ensayo de hemólisis .....	38
5.6. Análisis estadístico .....	41
<b>6. Resultados y Discusión</b> .....	42
6.1. Hemólisis en eritrocitos de donante sano (EDS) y eritrocitos de donante diabético (EDD) producidos por las AgNPs Argovit y AgNO <sub>3</sub> .....	46
6.2. Hemólisis de EDS por Ag <sup>+</sup> y AgNPs .....	46
6.3. Hemólisis de EDD por Ag <sup>+</sup> y AgNPs .....	49
6.4. Hemólisis en EDS y EDD .....	50
6.5. Hemólisis producida por otras AgNP, Ag <sup>+</sup> y Argovit en EDS .....	52
<b>7. Conclusiones</b> .....	67
<b>8. Referencias</b> .....	69
<b>9. Anexos</b> .....	74
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	77

## Lista de figuras

Fig. 1. Intervalos de concentración estudiados con Argovit. (Fuente: elaboración propia)	6
Fig. 2. Determinaciones de hemólisis. Intervalo amplio e intervalo reducido de concentraciones.....	31
Fig. 3. Montaje de pruebas de hemólisis. (Fuente: elaboración propia) .....	34
Fig. 4. Características fisicoquímicas de AgNPs Argovit. Fig. 4A Imagen que muestra la morfología esférica de AgNPs Argovit, Fig. 4B frecuencia de distribución de tamaño de AgNPs calculada por MET, Fig. 4C Resumen de las características fisicoquímicas. ....	35
Fig. 5. Montaje de tubos para ensayo de hemólisis. ....	40
Fig. 6. Centrifugación. ....	41
Fig. 7. Incubación. ....	41
Fig. 8. Placas montadas para el intervalo amplio de concentraciones. ....	42
Fig. 9. Placa de 96 pozos con sobrenadantes para el ensayo con EDD. (Fuente: elaboración propia) .....	45
Fig. 10. Placa de 96 pozos con sobrenadantes para el ensayo con EDS. (Fuente: elaboración propia) .....	45
Fig. 11. Dependencia de hemólisis en EDD y EDS respecto de la concentración. (Fuente: elaboración propia).....	47
Fig. 12. Hemólisis en EDS por AgNPs con recubrimientos similares. (fuente: elaboración propia con base en artículos publicados según la Tabla 9).....	53

## Lista de tablas

Tabla 1. Intervalo amplio de concentraciones finales ensayadas. ....	31
Tabla 2. Montaje de tubos y placas para el intervalo amplio de concentraciones.....	32
<i>Tabla 3. Intervalo reducido de concentraciones finales ensayadas. ....</i>	<i>32</i>
Tabla 4. Montaje de tubos y placas para el intervalo reducido de concentraciones.....	32
Tabla 5. Concentraciones finales de Ag <sup>+</sup> en el ensayo de hemólisis. ....	37
Tabla 6. Intervalo amplio de concentraciones ensayadas.....	42
Tabla 7. Intervalo reducido de concentraciones. ....	44
Tabla 8. Estadística para el intervalo reducido de concentraciones de Ag <sup>+</sup> . ....	45
Tabla 9. Características fisicoquímicas de las AgNPs comparadas.....	58

## 1. Introducción

Los nanomateriales para aplicaciones biológicas se han desarrollado con éxito en las últimas décadas y han tenido éxito en la administración de fármacos, la obtención de imágenes teranósticas, etc.[1]. Son muy utilizados en diferentes campos por sus propiedades únicas, pero también pueden ocasionar efectos adversos tanto a la salud humana como al medio ambiente, por lo que es necesario conocer los riesgos y factores que aumentan estos efectos adversos. [2] .

El uso biomédico y no biomédico de nanomateriales se ha generalizado cada vez más en los campos comercial e industrial de muchos países, mientras que los mecanismos de acción siguen siendo esquivos. Las nanopartículas de plata (AgNPs) se han utilizado principalmente como agentes microbicidas, mientras que otras aplicaciones biomédicas son menos recurrentes. En el caso de las AgNPs Argovit, se han publicado varios estudios con usos potenciales en nanomedicina. Algunos de los bioefectos que se han estudiado con Argovit se muestran en la Fig. anexa 1. En esta figura los intervalos de concentración en los que se reportan los efectos para diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, se clasifican en grupos de estudios similares. Los bioefectos incluyen el genotóxico, citotóxico y microbicida entre otros. Se llevaron a cabo en diferentes sistemas biológicos: bacterias, virus, hongos, animales (ratones, perros, etc.), plantas y líneas celulares humanas. Para más detalles, se puede consultar la Tabla anexa 2

Después de la exposición a las AgNPs, la mayoría de las publicaciones muestran una viabilidad celular reducida [3], sin embargo, no existe consenso sobre el mecanismo de citotoxicidad de las AgNPs. La plata daña o mata las bacterias en el mismo intervalo de

concentración en el que daña las células humanas [4]. Sin embargo, para los bioefectos mostrados en la Fig. 1, hay ciertas concentraciones en las que Argovit no es genotóxico ni citotóxico.

En el trabajo de genotoxicidad y citotoxicidad de Ruiz, et al.,[5], se determinó que Argovit no es genotóxico en linfocitos de sangre periférica humana. La absorción de las AgNPs Argovit en el hígado, el bazo y la mucosa del intestino delgado se reporta en el trabajo de Platonova, et al., [6]. La bioacumulación de Argovit AgNPs podría considerarse no peligrosa o no tóxica según Buzulukov, et al. [7]. En el estudio de exposición a corto plazo y dosis única intragástrica en ratas, Gmshinski, et al.,[8] reporta una absorción de AgNPs Argovit de solo 2%, siendo excretado 98% en heces.

A partir de ahora y a lo largo del presente texto, la discusión se llevará a cabo utilizando la concentración de AgNPs en  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , a menos que se especifique lo contrario. En la Tabla 6 se muestran las concentraciones de  $\text{Ag}^+$  contenidas en Argovit y  $\text{AgNO}_3$  en  $\mu\text{g} / \text{mL}$  y  $\text{mM}$ .

La prueba de hemólisis *in vitro* juega un papel importante en la aprobación y posterior uso y elección de medicamentos, especialmente hoy en día que COVID-19 (SARS-CoV-2) es parte de una nueva realidad mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 1 de cada 11 o 422 millones de personas en el mundo tiene diabetes. La diabetes y otras comorbilidades son importantes predictores de morbilidad y mortalidad en pacientes con COVID-19 [9]. Existe evidencia de una mayor incidencia y gravedad de COVID-19 en pacientes con diabetes. [10]. En este sentido, la prueba de hemólisis en

eritrocitos de donante diabético (EDD) se convierte en un modelo importante para las pruebas de hemólisis. Los EDD tienen una disminución en la deformabilidad y por lo tanto, son más susceptibles a la ruptura en comparación con los eritrocitos de donante sano (EDS), [11], [12], [13].

Una hemólisis menor al 5% se considera nula según la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM), ya que a partir de este límite se daña el eritrocito (ASTM E2524, 2013). La hemólisis baja está entre el 5 y el 10%, y los valores superiores al 10% representan una hemólisis marcada [14].

La prueba de hemólisis es una de las diversas pruebas de citotoxicidad establecidas por el Comité Científico para la Seguridad del Consumidor (SCCS) [15]. Se han utilizado muchas AgNPs para tratar las úlceras de pie diabético y otras heridas relacionadas con la diabetes [16], [17], [18], incluyendo Argovit [19], [20].

[21]. Se han realizado muchos estudios para Argovit, incluidas pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad (consulte Fig. 1), sin embargo, la prueba de hemólisis no se había informado antes de este trabajo.

Numerosos estudios describen la hemólisis de AgNP en EDS, sin embargo, no se han encontrado estudios basados en experimentos con EDD.

La hemólisis representa la ruptura o alteración de la integridad de la membrana de los glóbulos rojos (GR), provocando la liberación de hemoglobina. [22]. Una mayor

susceptibilidad a la hemólisis de los EDD respecto EDS se puede explicar por los cambios estructurales que induce la hiperglucemia en los glóbulos rojos, provocando estrés osmótico y mayor fragilidad de la membrana [23], [24].

Por tanto, el objetivo del presente trabajo es identificar la capacidad hemolítica de Argovit y compararla con la hemólisis producida por los  $\text{Ag}^+$  de  $\text{AgNO}_3$  en EDD y EDS. Nuestros resultados muestran que la hemólisis producida por Argovit es mayor en EDD que en EDS y mayor por los  $\text{Ag}^+$  que por Argovit.

En el presente trabajo se determina la hemólisis inducida por Argovit en EDS y EDD; mediante el ensayo de hemólisis dependiente del pH *ex vivo*, contra nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), usando Triton X-100 como control positivo y PBS como control negativo.

Los resultados de hemólisis de este trabajo se contrastan con los reportados en otros trabajos tomando en consideración que las AgNPs tienen diferentes propiedades fisicoquímicas como el tamaño, la forma, el recubrimiento, la carga, la solubilidad, etc. [25]. Estas propiedades se han asociado a la genotoxicidad y la citotoxicidad, incluida la hemólisis.

## **2. Antecedentes**

Los nanomateriales en el campo de la biología han producido bioefectos que se sabe tienen una posible aplicación en nanomedicina. Se han probado muchos nanomateriales emergentes en busca de efectos biológicos con aplicaciones potenciales; pero la toxicidad ha limitado su uso. Los efectos adversos de muchos nanomateriales incluyen citotoxicidad, genotoxicidad y teratogenicidad. Por tanto, la biocompatibilidad en

diferentes modelos biológicos es un tema que requiere especial atención. Las nanopartículas de plata (AgNPs) han atraído mucha atención debido a su bien establecido efecto microbicida. Las pruebas de biocompatibilidad y seguridad necesarias para garantizar el uso bioético de los nanomateriales han sido establecidas por el Comité Científico de Seguridad del Consumidor de la Unión Europea (SCCS). Sin embargo, el uso de nanomateriales se está generalizando cada vez más en todo el mundo, mientras que sus mecanismos de acción siguen siendo esquivos. Entre las pruebas de citocompatibilidad de primera línea se encuentra la citotoxicidad, que incluye la prueba de hemólisis. La mayoría de los bioefectos reportados en otros trabajos para Argovit y que tienen una aplicación biológica potencial, se producen a concentraciones en las que Argovit no es hemolítico. Nuestros resultados sugieren que Argovit tiene un potencial uso seguro y que es menos hemolítico que las otras 22 AgNP mencionadas en este trabajo.

## **2.1 Trabajos realizados con Argovit**

Se han realizado diversos estudios entorno a los bioefectos y toxicidad de Argovit en modelos vegetales, animales, microbianos y líneas celulares humanas, mientras que sus aplicaciones más recurrentes son como antimicrobiano y antiviral en agricultura, acuicultura, veterinaria y tópica en humanos en el tratamiento de úlceras de pie diabético.

La Fig. 1 muestra algunos estudios que se han publicado por nuestro grupo, con diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los bigotes en los gráficos representan el intervalo en el que se llevó a cabo el estudio y la marca ■ en cada intervalo indica la

concentración a la que se encontró el bioefecto. En la Tabla anexa 2 se presenta una descripción más detallada de cada estudio con su número de estudio (S#) mostrado en el eje vertical de la Fig. 1.

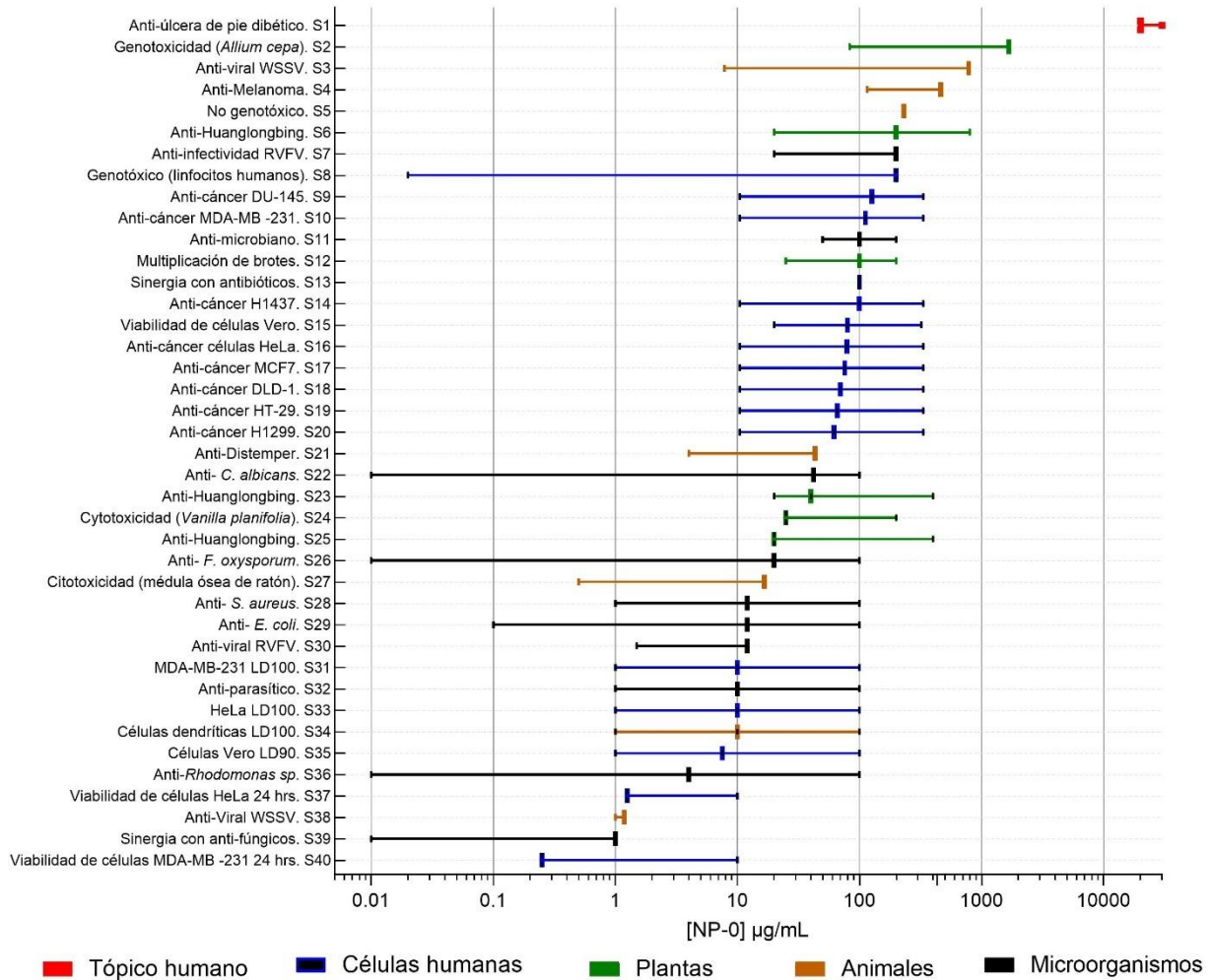


Fig. 1. Intervalos de concentración estudiados con Argovit. (Fuente: elaboración propia)

En el estudio S1, se presentó por primera vez el uso de AgNPs Argovit para el tratamiento de las úlceras del pie diabético grado II y III de la clasificación de Wagner. Las úlceras fueron tratadas por administración tópica de AgNPs a 1.8 mg / mL de plata

metálica además de los antibióticos convencionales. En todos los casos presentados en este estudio, se observó una mejora significativa en la evolución de las con la administración de AgNPs. Los bordes de la lesión llegaron al punto de cierre. Estos resultados constituyeron la base para más estudios sobre el uso de AgNP para el tratamiento de enfermedades crónicas y úlceras de diferentes orígenes [21].

Dando continuidad al estudio S1, en un trabajo subsecuente se presentó el uso de AgNPs para el tratamiento de úlceras de pie diabético grado II de la clasificación de Wagner. Además del tratamiento con antibióticos convencionales, las úlceras fueron tratadas mediante la administración tópica de AgNPs a una concentración de 1.2 mg / mL de plata metálica. Los resultados obtenidos, revelan una mejora significativa en la evolución de las úlceras, en donde los bordes de la lesión se acercaron de manera efectiva, observándose tejido de granulación, disminución del edema y placas de fibrina. [20].

En otra réplica del estudio S1, se reporta un enfoque de nanomedicina para el tratamiento exitoso de las úlceras de pie diabético de clasificación de Wagner grados II y III. La administración tópica diaria de una solución de AgNPs a una concentración de plata de 1.8 mg / mL provoca una mejora de la curación de la UPD en menos de 60 días en promedio. [26].

En el estudio S2, se abordó un trabajo sistemático de la actividad citotóxica y genotóxica con AgNP Argovit en *Allium cepa*. El rango de concentración evaluado de 5–100 g / mL

de contenido de plata metálica (85–1666 g / mL de formulación completa), es 10 a 17 veces mayor que el utilizado en informes previos con formulaciones de AgNP recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) y no mostraron daño citotóxico o genotóxico en *Allium cepa*. Por el contrario, concentraciones bajas (5 y 10 g / mL) promueven el crecimiento sin dañar raíces o bulbos. Hasta este trabajo, todas las formulaciones de PVP-AgNP evaluadas en *Allium cepa* independientemente de su tamaño, concentración o tiempo de exposición habían mostrado fitotoxicidad. La respuesta biológica observada en *Allium cepa* expuesto a Argovit es causada por las nanopartículas y no por iones de plata. La relación metal / agente de recubrimiento juega un papel fundamental en esta respuesta y debe ser considerada dentro de los parámetros fisicoquímicos clave para el diseño y fabricación de nanomateriales más seguros [27].

En el estudio S3 sobre acuicultura, se evaluó la tasa de supervivencia de camarones blancos juveniles sanos (*Litopenaeus vannamei*) después de la administración intramuscular de AgNP Argovit. Después de 96 horas de la administración, la supervivencia del camarón fue mayor al 90% en todos los tratamientos. La tasa de consumo de oxígeno y el recuento total de hemocitos permaneció inalterado después de la inyección de AgNP, lo que refleja ningún estrés causado. Los resultados revelaron que la tasa de supervivencia de los camarones infectados con virus de la mancha blanca (WSSV) después de la administración de AgNPs fue del 80%, mientras que la tasa de supervivencia de los organismos infectados, pero no tratados con AgNPs, fue sólo del 10% a las 96 horas después de la infección. Estos resultados abren la posibilidad de explorar el uso potencial de las AgNPs como agentes antivirales para el tratamiento de

enfermedades en organismos de la acuicultura, en particular el WSSV en cultivo de camarón [28].

En los estudios S9, S10, S14, S16, S17, S18, S19, S20, S31, S37 y S40.

En este documento, los efectos citotóxicos de Argovit™ AgNP se evaluaron en ocho líneas de células cancerosas. Se realizaron más estudios citotóxicos en líneas celulares de cáncer ginecológico de cuello uterino (HeLa) y cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7). En ambos casos, la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC<sub>50</sub>) de AgNPs produjo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) después de 24 horas de incubación, pero fue estadísticamente no significativa en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, las células HeLa, MDA-MB-231 y MCF7 tratadas con la concentración inhibitoria (CI) máxima de AgNPs indujeron la formación de ROS a las 12 o 24 h de incubación. La genotoxicidad lograda por el ensayo cometa en células HeLa, MDA-MB-231 y MCF7 reveló que la exposición a IC<sub>50</sub> de AgNPs no induce un daño notable en el ADN de las células. Sin embargo, la CI de las AgNPs provocó un daño grave del ADN después de 12 y 24 horas de exposición. El trabajo concluye que, Argovit (AgNPs recubiertas de polivinilpirrolidona) induce un efecto citotóxico de una manera dependiente del tiempo y de la dosis en las ocho líneas celulares de cáncer probadas.

Sin embargo, el efecto genotóxico está restringido principalmente por la concentración. Los resultados contribuyen a explorar nuevas aplicaciones terapéuticas de las AgNPs en tumores malignos de modelos murinos y estudiar en profundidad los efectos citotóxicos y genotóxicos de las AgNPs en células sanas en el tejido circundante de la neoplasia [29].

En el estudio S4, se presenta un trabajo sistemático centrado en el efecto antiproliferativo y antitumoral de las AgNPs. Los principales cambios en la viabilidad celular, la inducción de apoptosis y necrosis y la generación de ROS se investigaron en las células B16-F10 después de seis horas de exposición a las AgNPs ( $IC_{50} = 4.2 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) o cisplatino ( $IC_{50} = 20 \mu\text{g} / \text{mL}$ ). A pesar de la respuesta similar para las AgNPs y el cisplatino sobre la potencia, se desencadenaron vías de muerte celular significativamente diferentes. Mientras que las AgNPs solo inducen apoptosis ( $45.98 \pm 1.88\%$ ), el cisplatino induce apoptosis y necrosis en la misma proporción ( $22.31 \pm 1.72\%$  y  $24.07 \pm 1.10\%$ , respectivamente). Además de su actividad antiproliferativa, los experimentos *in vivo* mostraron que los tratamientos de 3, 6, y 12 mg / kg de AgNPs producen una tasa de supervivencia casi 4 veces mayor ( $p < 0.05$ ) en comparación con la tasa de supervivencia obtenida con Cisplatino (2 mg / kg). Además, los ratones supervivientes tratados con AgNPs no muestran daño genotóxico determinado por cuantificación de la frecuencia de micronúcleos en células sanguíneas periféricas. Estos resultados muestran la notable actividad antitumoral de la formulación de AgNPs no genotóxicas y constituyen el primer avance hacia la aplicación de estas AgNPs para el tratamiento del melanoma, que podría reducir considerablemente los efectos adversos provocados por los quimioterápicos actualmente aplicados [30].

En el estudio S5 se evaluó la capacidad genotóxica de AgNPs Argovit™ a partir de la técnica de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratones. Las nanopartículas de plata se suministraron en dosis terapéuticas por vía oral (indicadas para perros como tratamiento para el moquillo) durante tres días a un grupo conformado

por siete ratones y a otros dos grupos con igual número de ratones se administró respectivamente agua inyectable y arabinosa C. Los resultados preliminares muestran diferencias significativas en el número de micronúcleos en reticulocitos entre los tres grupos, por lo que se requiere comprobar este resultado con otro tipo de modelos *in vitro* [31].

En los estudios S6, S23 y S25, se presenta el primer enfoque nanotecnológico para evaluar la capacidad de las AgNPs para erradicar directamente las bacterias responsables de la enfermedad de Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), en el campo. Las AgNPs se administraron mediante aspersión foliar e inyección en el tronco de 93 árboles enfermos con resultados notables. Ambos métodos producen una disminución del 80-90% del título bacteriano, cuantificado por qRT-PCR en tejido foliar recolectado, en comparación con el grupo de control. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran una reducción esencial de acumulación de almidón en los vasos del floema después de los tratamientos con AgNP sin evidencia de bacterias en las muestras analizadas. En comparación con otros métodos efectivos que involucran antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la potencia de AgNPs es de 3 a 60 veces mayor cuando se administra por aspersión foliar y de 75 a 750 veces mayor cuando la administración fue por inyección en el tronco. En el estudio se propone a esta formulación de AgNPs como una alternativa prometedora para el tratamiento de árboles infectados en el campo [32].

En los estudios S7 y S30 se probó la actividad antiviral potencial de las nanopartículas de plata formuladas como Argovit™ contra el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV).

La actividad antiviral de Argovit se probó en cultivos de células Vero y en ratones deficientes en el receptor de interferón tipo I (ratones IFNAR - / -) mediante dos enfoques diferentes: (i) se agregaron diferentes diluciones de Argovit a las células previamente infectadas o se administraron a los animales infectados con una dosis letal de virus; (ii) el virus se preincubó con diferentes diluciones de Argovit antes de la inoculación en ratones o células. Aunque la capacidad de las nanopartículas de plata para controlar una infección por RVFV en curso en las condiciones probadas fue limitada, la incubación del virus con Argovit antes de la infección condujo a una reducción de los títulos de infectividad, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados revelan la posible aplicación de las AgNPs para controlar la infectividad del RVFV, que es un patógeno zoonótico importante.[33].

En el estudio S8, se presentó el comportamiento citotóxico y genotóxico de dos formulaciones de nanopartículas de plata, nano-Composix™ y Argovit™ recubiertas de polivinilpirrolidona disponibles comercialmente. Ambas AgNPs pueden identificarse como no citotóxicas y no genotóxicas con solo evaluar la inducción de micronúcleos (MNi) y el índice mitótico, pero presentan enormes diferencias cuando otros parámetros como citostasis, apoptosis, necrosis y daño nuclear (brotes nucleares (NBUD) y puentes nucleoplasmáticos (NPB)). Los resultados muestran que Argovit (PVP-AgNP de 35 nm) y nano-Composix (PVP-AgNP de 50 nm), en concentraciones de 0.012 a 12 µg / mL, no producen cambios en el índice de división nuclear (NDI) o la frecuencia de micronúcleos (MNi) en comparación con los valores encontrados en cultivos de control de linfocitos de sangre periférica humana de un donante sano. Aun así, las PVP-AgNPs de 50 nm

disminuyen significativamente el índice de replicación y aumentan significativamente la citostasis, apoptosis, necrosis y las frecuencias de NBUD y NPB. Además, proporciona información muy importante sobre el papel que desempeña la relación [agente de recubrimiento] / [metal] en el diseño de nanomateriales que podrían reducir los efectos adversos tanto como sea posible manteniendo su capacidad terapéutica [5].

En el trabajo S11, se evaluó los efectos antimicrobianos y horméticos de Argovit sobre la regeneración *in vitro* de la planta de vainilla (*Vanilla planifolia*) utilizando un sistema de inmersión temporal (TIS). Los resultados mostraron que la contaminación bacteriana se redujo con el uso de 50, 100 y 200 mg / L de Argovit. Se observó estimulación del crecimiento de la planta con 25 y 50 mg / L, mientras que la inhibición significativa del crecimiento de la planta fue detectada a 100 y 200 mg / L. El análisis de nutrientes minerales reveló cambios en las concentraciones de macro y micronutrientes producidos por Argovit. Además, la presencia de Argovit indujo la producción de ROS y aumentó el total contenido fenólico, capacidad antioxidante y peroxidación lipídica con un efecto dosis-dependiente. Los resultados de este trabajo sugieren que la producción de ROS y la nutrición mineral son mecanismos clave de la hormesis inducida por AgNPs sobre la planta de vainilla. En el trabajo se sugiere que con la adición de 50 mg / L de Argovit en el medio de cultivo, habría un efecto antimicrobiano y hormonal y que el uso de Argovit podría ser una estrategia eficiente para la micropropagación comercial de vainilla y otras especies [34].

En el estudio S12, se evaluó la respuesta hormonal a las nanopartículas de plata (AgNP) en la multiplicación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* Cv. Mex 69-290) mediante un sistema de inmersión temporal en medio de cultivo Murashige y Skoog con AgNPs a concentraciones de 0, 25, 50, 100 y 200 mg / L. Los resultados muestran que el crecimiento de la fase de estimulación se observó a 50 mg / L de AgNPs, mientras que la fase de inhibición se detectó a 200 mg / L de AgNPs. El análisis de nutrientes minerales mostró cambios en macronutrientes y micronutrientes contenidos debido al efecto de AgNPs. Además, las AgNPs indujeron la producción de ROS y aumentaron el contenido fenólico total, con un efecto dosis-dependiente.

En este trabajo se sugiere que la producción de ROS y la nutrición mineral son mecanismos clave de la hormesis inducida por AgNP y que la acumulación fenólica se obtuvo como respuesta de la planta al estrés producido por altas dosis de AgNPs. Por lo tanto, pequeñas dosis de AgNPs en el medio de cultivo podrían ser una estrategia eficaz para la micropropagación comercial [35].

En el trabajo S13, se estudió la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata (AgNPs), los agentes antifúngicos (Anfotericina B y Fluconazol) y combinaciones de AgNPs con antifúngicos sobre la levadura dimórfica patógena *Candida albicans*. Los tratamientos combinados de AgNPs y antifúngicos mostraron un efecto diferente sobre la actividad antimicrobiana. En el estudio se concluye que las AgNPs alteran la capacidad antimicrobiana de los antifúngicos. Se presenta un efecto sinérgico en el tratamiento combinado de las AgNPs y anfotericina B, mientras que fueron antagonistas en la combinación AgNPs-fluconazol. Adicionalmente aclara que ni las AgNPs, los

antifúngicos, o su combinación alteran la capacidad dimórfica de *C. albicans* en condiciones de cultivo estándar [36].

En los estudios S15, S22, S26, S28, S29, S33, S34, S35 y S36 sobre la toxicidad de las AgNPs en sistemas biológicos de diferentes niveles de complejidad, se encontró que los sistemas biológicos de diferentes grupos taxonómicos se inhiben a concentraciones de AgNPs dentro del mismo orden de magnitud. Por tanto, la toxicidad de los nanomateriales en sistemas biológicos / vivos restringidos por su complejidad, por ejemplo; los grupos taxonómicos, resultó contrario a lo esperado. El estudio menciona que el hecho de que las células y los virus se inhiben con una concentración de AgNPs dentro del mismo orden de magnitud, podría explicarse considerando que las AgNPs afectan a mecanismos celulares muy primitivos debido a su interacción con estructuras fundamentales para células y virus por igual [37].

En el estudio S21 se utilizó una composición farmacéutica veterinaria de AgNPs Argovit, para el tratamiento del moquillo en perros (distemper) con síntomas neurológicos y no neurológicos. El tratamiento con AgNPs de perros enfermos de moquillo con síntomas no neurológicos, proporciona una tasa de recuperación y motilidad muy alta (90 %) sin presentar secuelas a los siete días de tratamiento teniendo una recuperación completa a los 10 días. Sin embargo, en perros con síntomas neurológicos, el tratamiento con AgNP no pudo revertir la enfermedad [38].

En el estudio S24 se presentó el primer estudio de los efectos citotóxicos y genotóxicos promovidos por AgNPs en plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia*) después de un largo tiempo de exposición de seis semanas. Los resultados mostraron que el crecimiento de las plántulas de *vainilla planifolia* se favorecen con dosis de 25 y 50 mg / L con una pequeña disminución del índice mitótico. Se encontró una dependencia de la dosis en la frecuencia de las aberraciones cromosómicas y micronúcleos en las células. Sin embargo, los efectos genotóxicos podrían considerarse mínimos debido a que con la concentración más alta empleada (200 mg / L), el porcentaje total de aberraciones cromosómicas es inferior al 5% con solo tres micronúcleos en 3,000 células, a pesar de la exposición prolongada a las AgNPs. Por tanto, 25 y 50 mg / L (1.5 y 3 mg / L de plata metálica) se identificaron como concentraciones seguras para el crecimiento de *Vanilla planifolia* en condiciones *in vitro*. La exposición de las plántulas a las AgNPs aumenta el polimorfismo registrado por el método de repetición de secuencia Inter- simple (ISSR), que podría ser útil para promover la variabilidad genética de esta especie. [39].

En el estudio S27, se evaluó la citotoxicidad y genotoxicidad de las AgNPs Argovit en células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón (BMDC) consideradas importantes células presentadoras de antígenos del sistema inmunológico. Los resultados mostraron que después de 12 horas de exposición a las AgNPs, se produjo una disminución significativa en la viabilidad de las BMDC a la concentración más alta probada (1.0 mg de AgNPs / mL) mientras que, a dosis más bajas, las células mantuvieron la integridad de la membrana y la actividad metabólica. El daño del ADN fue no significativo con todas las concentraciones probadas, con excepción de la

concentración de 1.0 µg de AgNPs / mL. En cuanto al fenotipo, no se presentaron diferencias en la expresión de CD40 (molécula coestimuladora muy presente en BMDC maduras) ni en CD273 (un marcador de respuesta inhibitoria de células T). Este trabajo publicado en 2019 representa el primer paso para identificar los efectos tóxicos de esta formulación de AgNP en las células dendríticas [25].

En el trabajo S32, se evaluaron por primera vez los efectos letales de la formulación Argovit en hipnosporas de *P. marinus*, una etapa particularmente resistente del parásito de ostras que persiste en el medio ambiente hasta que se presentan condiciones favorables para que se induzca la zoosporulación. Una concentración de AgNPs de 0.093 nM produjo un 50% de mortalidad en *P. marinus*. El tratamiento con 0.927 nM de plata, como AgNPs o AgNO<sub>3</sub> fue altamente letal, produciendo una mortalidad mayor a 90%. En el estudio se reporta que las AgNPs estuvieron implicadas en la deformación de las hipnosporas. Estos resultados sugieren investigaciones posteriores de los posibles efectos de Argovit contra otras etapas de desarrollo de este parásito, como trofozoítos y tomontes que se desarrollan en tejidos o hemolinfa de ostras infectadas, así como estudios sobre sus efectos en el huésped y el medio ambiente [40].

En el estudio S38 se realizaron ensayos experimentales para evaluar el uso de una nueva formulación de nanopartículas de plata llamada Argovit-4, que se preparó con una ligera modificación para mejorar su actividad biológica contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en cultivo de camarón. Este estudio es la primera demostración de que la nueva formulación de Argovit-4 tiene potencial como aditivo antiviral en los

piensos contra el virus del síndrome de la mancha blanca y demuestra una práctica estrategia terapéutica para controlar WSSV y posiblemente otros patógenos de invertebrados en acuicultura de camarón [41].

El estudio S39 aborda el efecto sinérgico antimicrobiano de las AgNPs y los antibióticos convencionales en bacterias grampositivas y gramnegativas. La concentración inhibitoria mínima de las AgNPs fue 10-12  $\mu\text{g} / \text{mL}$  en todas las cepas bacterianas analizadas, independientemente de su diferente susceptibilidad a los antibióticos. En lo referente a la sinergia, en este trabajo se destacan tres observaciones relevantes; primera, un efecto antimicrobiano sinérgico al combinar las AgNPs y kanamicina según el índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI:  $<0.5$ ), segunda, un efecto aditivo al combinar AgNPs y cloranfenicol (FICI: 0.5 a 1) y tercera, no se encontró ningún efecto con las combinaciones de AgNPs y antibióticos  $\beta$ -lactámicos. El estudio también muestra que las concentraciones subletales de las AgNPs (6-7  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) alteró el potencial de la membrana bacteriana y causó daño ultraestructural, aumentando su permeabilidad. No se detectaron interacciones químicas entre las AgNPs y los antibióticos. El trabajo propone con bases experimentales, un mecanismo de acción mediante el cual el efecto combinatorio de los antimicrobianos impulsa la sinergia en función de su objetivo específico, facilitado por alteraciones de membrana generadas por las AgNPs. Se menciona que estos resultados proporcionan una comprensión más profunda sobre el mecanismo sinérgico de las AgNPs y los antibióticos, con el objetivo de combatir las infecciones de manera eficiente, especialmente aquellas producidas por

microorganismos multirresistentes a fármacos, con el fin de mitigar la crisis actual debido a la resistencia a los antibióticos [42].

## **2.2 Hemólisis**

En el entorno fisiológico la hemólisis es la ruptura de la membrana de los glóbulos rojos que lleva al escape del contenido celular al plasma. El contenido citosólico más abundante de los glóbulos rojos es la hemoglobina, que comprende el 97% de la masa seca de los glóbulos rojos. [43]. La hemoglobina intraeritrocítica es un tetramero estable de ferrohemoportirina de 64 kDa especializada en el transporte de gases en la sangre de animales; mientras que la hemoglobina extraeritrocítica es un  $\alpha\beta$ -heterodímero tóxico de 32 kDa que puede atravesar barreras tisulares, por tanto, una hemólisis significativa compromete la funcionalidad de muchos tejidos, produce el agotamiento de óxido nítrico (NO) (un potente vasodilatador natural), produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y altera la transcripción de genes y el metabolismo celular [44]. Muchos factores pueden contribuir a la hemólisis, como los físicos, fisicoquímicos, bioquímicos y biológicos en general.

La concentración de hemoglobina liberada por la ruptura de eritrocitos se puede determinar mediante técnicas espectrofotométricas. [45].

## **2.3. La Diabetes y el eritrocito humano**

De acuerdo con la IDF (Federación Internacional de la Diabetes, 2020), la diabetes es una enfermedad crónica que se presenta cuando el páncreas ya no puede producir

insulina o cuando el cuerpo no puede hacer un buen uso de la insulina que produce. La insulina es una hormona producida por el páncreas, que actúa como una llave para permitir que la glucosa de los alimentos que ingerimos pase del torrente sanguíneo a las células del cuerpo para producir energía. No poder producir insulina o utilizarla de forma ineficaz provoca un aumento de los niveles de glucosa en la sangre, lo que se conoce como hiperglucemia. A largo plazo, los altos niveles de glucosa en sangre se asocian con daños al cuerpo y fallas en varios órganos y tejidos [46].

De acuerdo con la ADA (American Diabetes Association), la diabetes se puede clasificar en: *Tipo 1* cuando hay una destrucción autoinmune de las células  $\beta$ , que generalmente conduce a la deficiencia absoluta de insulina. *Tipo 2* cuando existe una pérdida progresiva de la secreción adecuada de insulina por las células  $\beta$ , con frecuencia en el contexto de la resistencia a la insulina. *Diabetes mellitus gestacional*, que se diagnostica en el segundo o tercer trimestre de embarazo y que no se manifiesta claramente antes de la gestación. *Tipos específicos de diabetes*: que se deben a otras causas, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (como diabetes neonatal y juvenil), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis), y la diabetes inducida por medicamentos o sustancias químicas (como el uso de glucocorticoides en el tratamiento de VIH / SIDA, o después de un trasplante de órganos [47].

En un amplio estudio de Lin, X., et al., 2020 sobre la prevalencia y proyecciones del impacto de la carga económica de la diabetes en 195 países para 1990-2025; se concluye que los cinco países con mayores prevalencias de diabetes son China (89.5

millones), India (67.8 millones), Estados Unidos (30.7 millones), Indonesia (21.0 millones) y México (13.1 millones). Los cinco países con mayor número de defunciones fueron India (254,555), China (153,185), Indonesia (97,005), Estados Unidos (68,558) y México (64,067). Los cinco principales países con mayor número de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD o DALY por sus siglas en inglés) fueron India (11.2 millones), China (10.0 millones), Indonesia (4.4 millones), Estados Unidos (3.9 millones) y México (2.6 millones) [48]. Este panorama estadístico coloca México entre los cinco primeros países con mayor mortalidad, prevalencia y años de vida en los que la productividad se pierde, por lo que la carga económica que representa la diabetes en México es muy relevante.

Diversas comorbilidades se han reportado para la diabetes, como la falla renal [49]. La falla renal se asocia con la anemia, como lo demuestra el estudio de Jitraknatee, J., 2020, en el que se reporta un 38.5% de pacientes diabéticos que presentan anemia, particularmente en ancianos y aquellos con condiciones más comórbidas [50]. En una condición previa a la falla renal, otra comorbilidad de la diabetes es la nefropatía. La nefropatía afecta negativamente la señalización de la producción de eritropoyetina, que es la hormona encargada de estimular la formación de glóbulos rojos. La nefropatía diabética consecuentemente también induce a la anemia. La anemia es una acompañante de la diabetes y puede pasar inadvertida, como lo demuestra el estudio de Thomas, M., et al., 2003 en el que se reporta un 23% de anemia no detectada previamente, entre pacientes diabéticos [51]. En este sentido, la propensión a la anemia en los pacientes diabéticos requiere que la dieta y los fármacos utilizados en el tratamiento de las comorbilidades de la diabetes, tengan preferentemente características no hemolíticas. Con lo anterior, una evaluación de la hemocompatibilidad de fármacos

antidiabéticos es indispensable y la prueba de hemólisis contribuye a establecer el panorama citotóxico de dichos fármacos.

La susceptibilidad a la lisis de eritrocitos en pacientes diabéticos se ve afectada por diversos factores, uno de ellos es el cambio en el potencial  $\zeta$  de los GR. El potencial  $\zeta$  es la diferencia de potencial eléctrico que existe entre la doble capa de iones en la cercanía de la membrana del eritrocito y la capa difusa de iones que rodea a los GR.

El potencial  $\zeta$  es una propiedad electroquímica de las superficies de la célula que está determinada por la carga eléctrica neta de moléculas expuestas en la superficie de las membranas celulares [52].

En el estudio de Gaikwad, et al., 2018, se observó que el potencial  $\zeta$  de los eritrocitos en el grupo de control fue de  $22.13 \pm 0.2789$  mV mientras que en eritrocitos de pacientes con diabetes mellitus resultó ser  $8.559 \pm 0.4864$  mV. Esta disminución en el potencial  $\zeta$  en eritrocitos de pacientes diabéticos indica que los eritrocitos se repelen menos por lo que se agregan con mayor facilidad. La agregación eritrocitaria se ha asociado a la mayoría de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo las originadas por la hiperglicemia [53].

Por otro lado, en el trabajo de M, S.A., et al., 2018, se concluye que el exceso de glucosa en la sangre conduce a una deformación significativa de los glóbulos rojos, perdiendo gran parte de su morfología de disco bicóncavo, incluso presentando una forma convexa. Produce una leve corrosión en su superficie debido a que la glucosa puede pasar a través de la membrana e incluso envolverla. Por lo que se reportan dos efectos; los GR aumentan de volumen y la capa envolvente de glucosa ayuda a que las células se

agreguen, ya que la glucosa presenta características adhesivas. Ambos efectos eventualmente conducen a una mayor viscosidad y una movilidad retardada del eritrocito [54]. Complicando aún más el escenario hiperglucémico; las especies reactivas de oxígeno (ROS) están significativamente elevadas en pacientes con diabetes tipo 2 [55].

En el trabajo Calderon-Salinas, J.V., et al., 2011, se demostró que los eritrocitos de pacientes diabéticos tienen un aumento del daño oxidativo, una reducción de sistemas antioxidantes y más fosfatidilserina (PS) eritrocitaria externalizada [56]. Una señal temprana de apoptosis es la pérdida de asimetría de fosfolípidos y la aparición de fosfatidilserina en la cara exterior de la membrana celular [57].

El metabolismo del glutatión y la actividad de las enzimas relacionadas se estudiaron en eritrocitos de pacientes con diabetes mellitus no insulino dependientes en el trabajo de Murakami, K., et al., 1989, en el que se encontró una disminución en los niveles de la forma reducida de glutatión y un aumento en los niveles de disulfuro de glutatión en los eritrocitos de diabéticos. Estos datos también sugieren que el deterioro del metabolismo del glutatión debilita el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo en los eritrocitos de los diabéticos [58].

En la diabetes, las membranas de los eritrocitos se ven afectadas por la exposición crónica a la glucosa, y se desencadenan varias modificaciones bioquímicas con subsiguiente alteración estructural y funcional de los glóbulos rojos, que posteriormente se involucran más en la fisiopatología de la diabetes y sus complicaciones [59].

En el estudio de Viskupicova, J., et al., 2015, se observa que la alta concentración de glucosa sanguínea acentúa la peroxidación lipídica [60].

Como se observa en el estudio de Alamri, B., et al., 2019, la hiperglucemia afecta la producción de glóbulos rojos, su función y propiedades físicas. Esto eventualmente puede afectar la fisiología funcional normal de los eritrocitos o tener un efecto directo sobre la estructura vascular, que conduce a la microangiopatía. [61].

Los resultados obtenidos en el trabajo de Desouky, O., et al., 2009, muestran un aumento de las propiedades reológicas (viscosidad y límite elástico) y eléctricas (constante dieléctrica, pérdida dieléctrica, tiempo de relajación y conductividad) de los eritrocitos diabéticos en comparación con los eritrocitos sanos; mencionando que los trastornos reológicos de los eritrocitos diabéticos (como el aumento de la agregación y disminución de la deformabilidad) causarán complicaciones microvasculares de la diabetes. [62].

## **2. 2.4. Estudios de hemólisis producida por iones Ag<sup>+</sup> y AgNPs**

Para la toxicidad de la plata se ha establecido una dosis de referencia (RfD) por la US EPA, 2005; en 0.005 mg / kg / día, o para una persona estándar de 70 kg, en 0.35 mg / día. [63].

La evaluación del efecto hemolítico producido por diferentes AgNPs en EDS ha sido reportada en varios estudios, no obstante, las diferencias en las características fisicoquímicas de las AgNPs (ver Tabla 9) podrían desempeñar un papel importante al hacer ciertas comparaciones; por lo que en algunos estudios se pone énfasis en las diferencias de tamaño, forma de preparación o tipo de recubrimiento entre otros parámetros. En el estudio de Kim, M.J. y S. Shin, 2014, se confirma que los resultados de hemólisis obtenidos para las AgNPs probadas fueron causados por las AgNPs y no por los iones Ag<sup>+</sup> [11]. Por otro lado, Choi, J., et al., 2011, propone que el mecanismo de

hemólisis inducida por las AgNPs puede estar relacionada con la tasa de liberación de iones de plata, la cantidad total de iones de plata liberados, la interacción directa entre partículas y glóbulos rojos, o una combinación de estos factores [14].

Huang, H., et al., 2016, en su estudio concluye que la actividad hemolítica de AgNP-PVP-20 y AgNP-CIT-20 muestran hemólisis dependiente de la dosis, en la que las AgNP-PVP-20 fueron más hemolíticas (19 %) que AgNP-CIT-20 (10 %) a la concentración de 40  $\mu\text{g} / \text{mL}$  [64]. En el trabajo de Chi, Z., et al. 2018, se estudió la toxicidad de AgNPs de 20 nm y iones de plata en glóbulos rojos, reportando que la hemólisis inicia a 15  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de AgNPs y a 0.29  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de  $\text{Ag}^+$ . A nivel molecular, los  $\text{Ag}^+$  fueron más tóxicos para los residuos de aminoácidos que las AgNPs según el cambio de características de fluorescencia de la hemoglobina (Hb). Sin embargo, las AgNPs fueron más tóxicas para la estructura secundaria de Hb debido a la pérdida de la hélice  $\alpha$  [65].

Sen, I.K., et al., 2013, consideraron que las AgNPs recubiertas con glucano de biosíntesis con hongos, resultaron hemocompatibles con glóbulos rojos humanos, mostrando una  $\text{LD}_{50}$  a 15 g / mL. Además, encuentra que el efecto antibacteriano sinérgico observado con dosis hemocompatibles AgNPs-glucano en combinación con diferentes antibióticos, indica una estrategia potencial para combatir infecciones por bacterias multirresistentes a antibióticos [66]. Halbandge, S.D., et al., 2017, reportan que una combinación de Anfotericina B y AgNPs no presenta actividad hemolítica y que el uso de combinaciones de AgNPs con anfotericina B parece ser una estrategia prometedora para la inhibición de biopelículas de *C. albicans* resistentes a fármacos. [67].

Qasim Nasar, M., et al. 2019, encontraron que los las AgNPs biosintetizadas con *Seripheidium quettense* fueron efectivas contra *E. coli*, *K. pneumonia a*, *B. subtilis* y *A. nigar*. Además, resultaron considerablemente citotóxicas contra células HepG2 con un IC<sub>50</sub> de 62.5 µg / mL al tiempo que fueron biocompatibles y con menos citotoxicidad para glóbulos rojos [68]. Laloy, J., et al., 2014, concluyen que las AgNPs muestran un efecto prohemolítico, procoagulante y promueven la adhesión plaquetaria. Determina la concentración de efecto no observado (NOEC) y la concentración más baja de efecto observado (LOEC) en sangre humana, en 5 y 50 µg / mL respectivamente. Menciona que, en aplicaciones locales como apósitos para heridas, estas propiedades pueden ser favorables [69]. Hamouda, R.A., et al., 2019, concluye que las AgNPs biosintetizadas con *Oscillatoria limnetica*, presentan una baja actividad hemolítica y pueden ser útiles en la administración de algunos dispositivos médicos, al tiempo que presentan citotoxicidad en algunas líneas celulares humanas de cáncer de mama (MCF-7) y de cáncer de colon (HCT-116), con aplicaciones prometedoras en medicina y las industrias cosmética y farmacéutica [70]. Katva, S., et al., 2018, observó que la incubación de AgNP con glóbulos rojos no causó ninguna hemólisis (< 3 %) en eritrocitos humanos expuestos a seis diferentes concentraciones de la formulación; 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg / mL [71]. Hossain, M.M., et al., 2019, reporta que los valores de HC<sub>50</sub> (la concentración de antimicrobiano que hemoliza al 50% de los glóbulos rojos) para AgNPs biogénicas con extracto acuosos y extracto etanólico, fueron de 700 y 800 µg / mL respectivamente. Esta AgNPs mostraron excelente hemocompatibilidad y no mostró toxicidad significativa para el hígado y los riñones a dosis altas. Por lo que los autores consideran que se puede concluir que las AgNP biosintetizadas en su trabajo tienen efecto antibacteriano de

amplio espectro, excelente biocompatibilidad y se pueden recomendar para futuras aplicaciones terapéuticas [72]. Shah, A., et al., 2018, muestran que las AgNPs recubiertas con el extracto acuoso de *D. mucronata* no mostraron actividad hemolítica (<5 %); por lo que estas AgNP de 12 nm podrían considerarse biocompatibles a bajas concentraciones (<60 µg / mL) [73]. Parthiban, E., et al., 2019, determinan que las AgNPs biosintetizadas con extracto de *Annona reticulata*, demostró tener una potente actividad larvicida y exhiben actividad potencialmente antimicrobiana con biocompatibilidad con glóbulos rojos tipo O+. Por lo tanto, sugieren que en general estas nanopartículas de plata deben ser consideradas biocompatibles y no tóxicas, pudiéndose utilizar como control de plagas y en la administración controlada de medicamentos en seres humanos afectados por patógenos infecciosos [74]. Asharani, P.V., et al., 2010, muestran resultados en los que las AgNPs recubiertas con almidón o alcohol polivinílico (PVA) en general tienen propiedades hemolíticas y potencial hemoaglutinante, mientras que las NPs de Au y Pt son hemocompatibles. Proponen que la lisis pudiera ser el resultado de daño de la membrana según lo determinado por estudios de peroxidación de lípidos. También se plantea que los glóbulos rojos lisados pueden causar más daño a los alrededores de las células normales a través del daño del ADN como se observa con fibroblastos en su estudio. [75]. Siritongsuk, P., et al., 2016, muestran que las AgNP no producen hemólisis (<10%) en el intervalo de concentraciones mínima inhibitoria (MIC) y la mínima bactericida (MBC) contra *B. pseudomallei*, aunque provocó hemólisis de más del 10% a mayor concentración (256 µg / mL). Por lo que se concluye que las AgNP no son tóxicas para células de mamíferos en concentraciones bactericidas [76]. Bian, Y., et al., 2019, reportan que la hemólisis inducida por las AgNPs ensayadas en su

estudio fue de aproximadamente 11.9 y 43.1% en concentraciones de 250 y 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente [77].

Es importante hacer notar que ninguno de los estudios anteriormente citados incluye EDD en su diseño experimental, lo que hace que el presente trabajo cobre particular importancia.

### **3. Justificación**

A pesar de la diversidad de estudios que se han realizado para Argovit, la hemocompatibilidad no se ha abordado sistemáticamente. Como parte de la hemocompatibilidad, el ensayo de hemólisis desempeña un papel preponderante al evaluar la citotoxicidad de cualquier agente bioactivo. Para comenzar a definir el panorama de hemocompatibilidad de Argovit, es necesaria una primera aproximación para evaluar su citotoxicidad en eritrocitos humanos. El ensayo de hemólisis provee esta primera aproximación, permitiendo sentar las bases para la realización de otras pruebas de citotoxicidad, genotoxicidad y finalmente establecer su hemocompatibilidad. De acuerdo con el Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación en España (ENAC del Parlamento Europeo), para determinar la hemocompatibilidad de materiales que entran en contacto con la sangre humana, deben realizarse las pruebas de la Activación del sistema del complemento, Trombogenicidad, Pirogenicidad, Endotoxinas y Hemólisis [78]. Considerando que la única aplicación actual de Argovit en humanos es el uso tópico para el tratamiento de úlceras de pie diabético; la evaluación de hemólisis no solo en eritrocitos de donador

sano sino también en eritrocitos de donador diabético, aporta elementos que ayudan a definir el panorama de la hemocompatibilidad de Argovit. Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos.

#### **4. Objetivo general**

Estimar el intervalo de concentraciones de AgNPs Argovit que produce baja hemólisis en eritrocitos de donador diabético (EDD) y eritrocitos de donador sano (EDS).

##### **4.1. Objetivos específicos**

- 4.1.1. Determinar la capacidad hemolítica de las AgNPs Argovit y los Ag<sup>+</sup> en AgNO<sub>3</sub> en eritrocitos diabéticos y sanos, en función del contenido de Ag.
- 4.1.2. Contrastar la capacidad hemolítica de las AgNPs Argovit con respecto a otros bioefectos reportados en modelos biológicos como úlceras de pie diabético, líneas celulares humanas y microorganismos entre otros.
- 4.1.3. Analizar el papel de las características del recubrimiento de las AgNPs en eritrocitos respecto de la hemólisis.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Diseño experimental

En el presente trabajo se determina la hemólisis inducida por Argovit en EDS y EDD; mediante el ensayo de hemólisis dependiente del pH *ex vivo*, descrito por Evans, B.C., et al., 2013, contra nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), usando Triton X-100 como control positivo y PBS como control negativo [45].

Para determinar el efecto hemolítico en la primera aproximación, un intervalo amplio de concentraciones se ensayó con Argovit y  $\text{Ag}^+$  (en  $\text{AgNO}_3$ ), tal como se indica en la Tabla 1. Para cada pH de ensayo (7.4, 6.8, 6.2 y 5.6) se montaron volúmenes de las soluciones madre de AgNPs Argovit y  $\text{AgNO}_3$  en tubos cónicos de 1.5 mL con el fin de determinar el pH en el que se observan las mayores absorbancias. Así mismo, para determinar las concentraciones en las que se verifica el cambio de no hemólisis (< 5 %) a baja hemólisis ( $\geq 5$  %) y realizar la segunda aproximación con un intervalo reducido de concentraciones (ver Fig. 2 , Tabla 1 y Tabla 3).

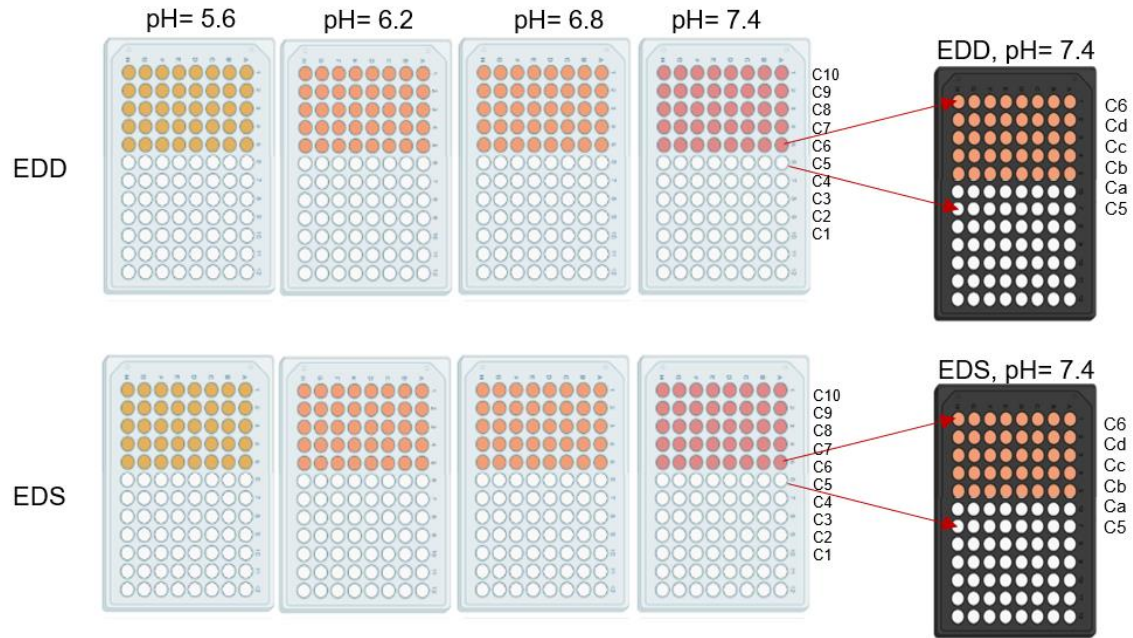


Fig. 2. Determinaciones de hemólisis. Intervalo amplio e intervalo reducido de concentraciones.

Los resultados obtenidos para los diferentes pHs ensayados sirven como pauta para estudios posteriores sobre la formación de endosomas en eritrocitos y, proporcionar datos útiles para aplicaciones potenciales en estudios sobre la liberación controlada de fármacos.

Tabla 1. Intervalo amplio de concentraciones finales ensayadas.

Concentración	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
µg / mL [Ag]	0.12	1.2	3	6	12	120	600	1,200	2,400	3,000

El montaje de placas y tubos para el ensayo se realizó de acuerdo con la Tabla 2.

Tabla 2. Montaje de tubos y placas para el intervalo amplio de concentraciones.

	C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	11	12
A	3 réplicas de 10 concentraciones de AgNPs + EDD										3 répl. C(+) + EDD	3 répl. PBS + EDD
B												
C												
D	10 concentraciones de AgNPs										PVP	3 répl. de PVP + EDD
E	3 réplicas de 10 concentraciones de AgNO <sub>3</sub> + EDD										X	
F											X	
G	10 concentraciones de AgNO <sub>3</sub>										X	X
H											C(+) + PBS	PBS
I	3 réplicas de 10 concentraciones de AgNPs + EDS										3 répl. C(+) + EDS	3 répl. PBS + EDS
J												
K												
L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	3 répl. de PVP + EDS
M	3 réplicas de 10 concentraciones de AgNO <sub>3</sub> + EDS										X	
N											X	
O	X										X	X
P											X	X

Tabla 3. Intervalo reducido de concentraciones finales ensayadas.

Concentración	C5	Ca	Cb	Cc	Cd	C6
µg / mL [Ag]	12	24	48	72	96	120

Tabla 4. Montaje de tubos y placas para el intervalo reducido de concentraciones.

	C5	Ca	Cb	Cc	Cd	C6	7	8	9	10	11	12
A	AgNPs + EDD						EDD+PBS	EDD	X	Triton + EDD	X	PBS
B							EDD+PBS	EDD	X		X	
C							EDD+PBS	EDD	X		X	
D	Controles individuales de AgNPs						X	X	X	X	X	X
E	AgNO <sub>3</sub> + EDD						X	X	X	X	X	X
F							X	X	X	PVP + EDD	X	PVP

G		X	X	X	X	X	X
H	Controles individuales de AgNO <sub>3</sub>	X	X	X	X	X	X

	C5	Ca	Cb	Cc	Cd	C6	7	8	9	10	11	12
I	AgNPs + EDS						EDS+PBS	EDS	X	Triton + EDS	X	PBS
J							EDS+PBS	EDS	X		X	
K							EDS+PBS	EDS	X		X	
L	Controles individuales de AgNPs						X	X	X	X	X	X
M	AgNO <sub>3</sub> + EDS						X	X	X	X	X	X
N							X	X	X	PVP + EDS	X	PVP
O							X	X	X	X	X	X
P	Controles individuales de AgNO <sub>3</sub>						X	X	X	X	X	X

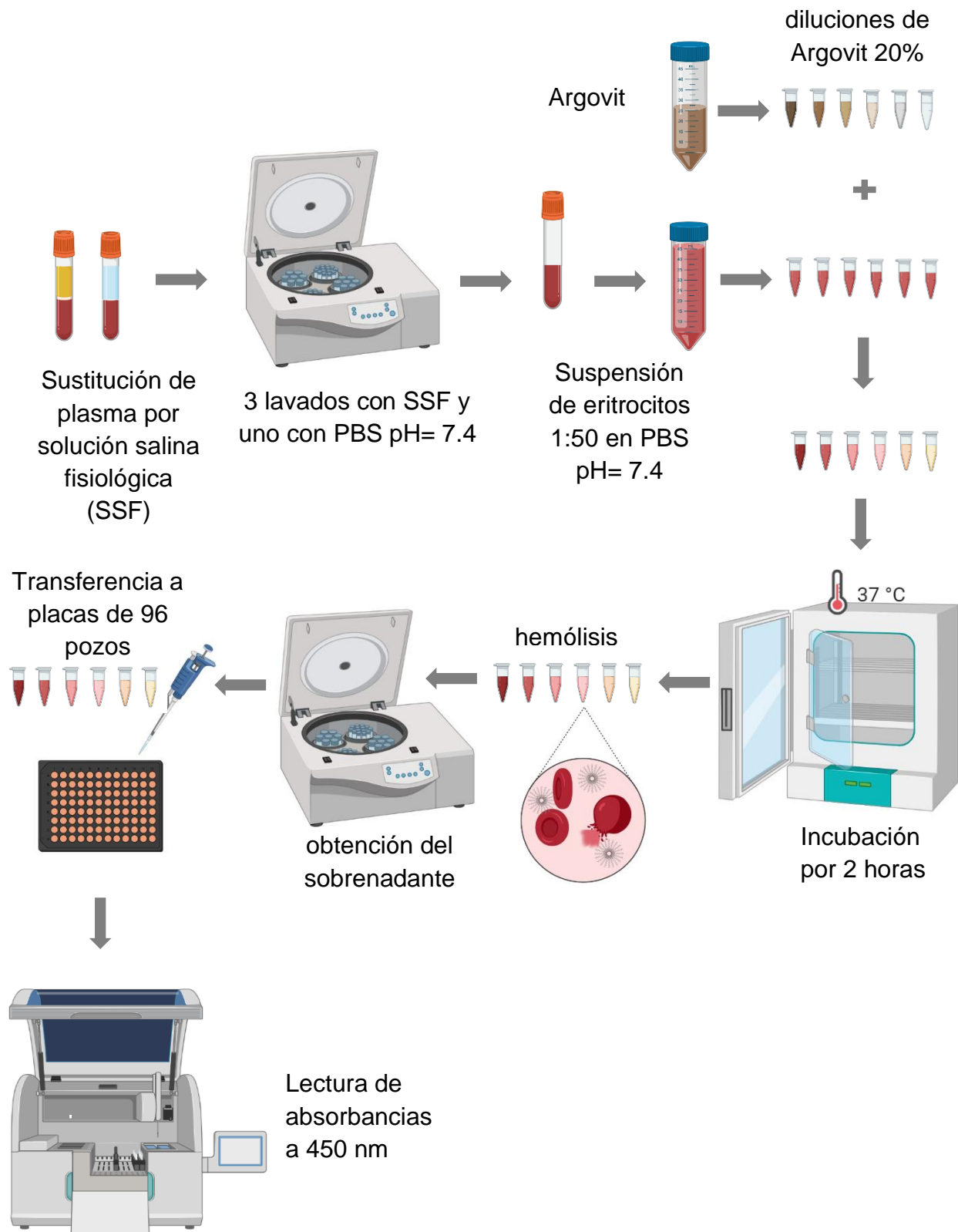


Fig. 3. Montaje de pruebas de hemólisis. (Fuente: elaboración propia)

## 5.2. Caracterización de las AgNPs Argovit

Argovit es una formulación que consiste en una suspensión de 20% o 200 mg / mL de AgNPs, con un contenido de Ag metálico de 1.2% en peso, estabilizada con una capa de recubrimiento de polivinilpirrolidona (PVP  $12.6 \pm 2.7$  kDa), que representa 18.8% peso. Se ha caracterizado por microscopía electrónica de transmisión (TEM), como esferoidal de 1 a 90 nm, con un tamaño promedio de  $35 \pm 12$  nm, un diámetro hidrodinámico de 70 nm, un potencial  $\zeta$  de -15 mV y una resonancia plasmónica en el 420 nm [32].

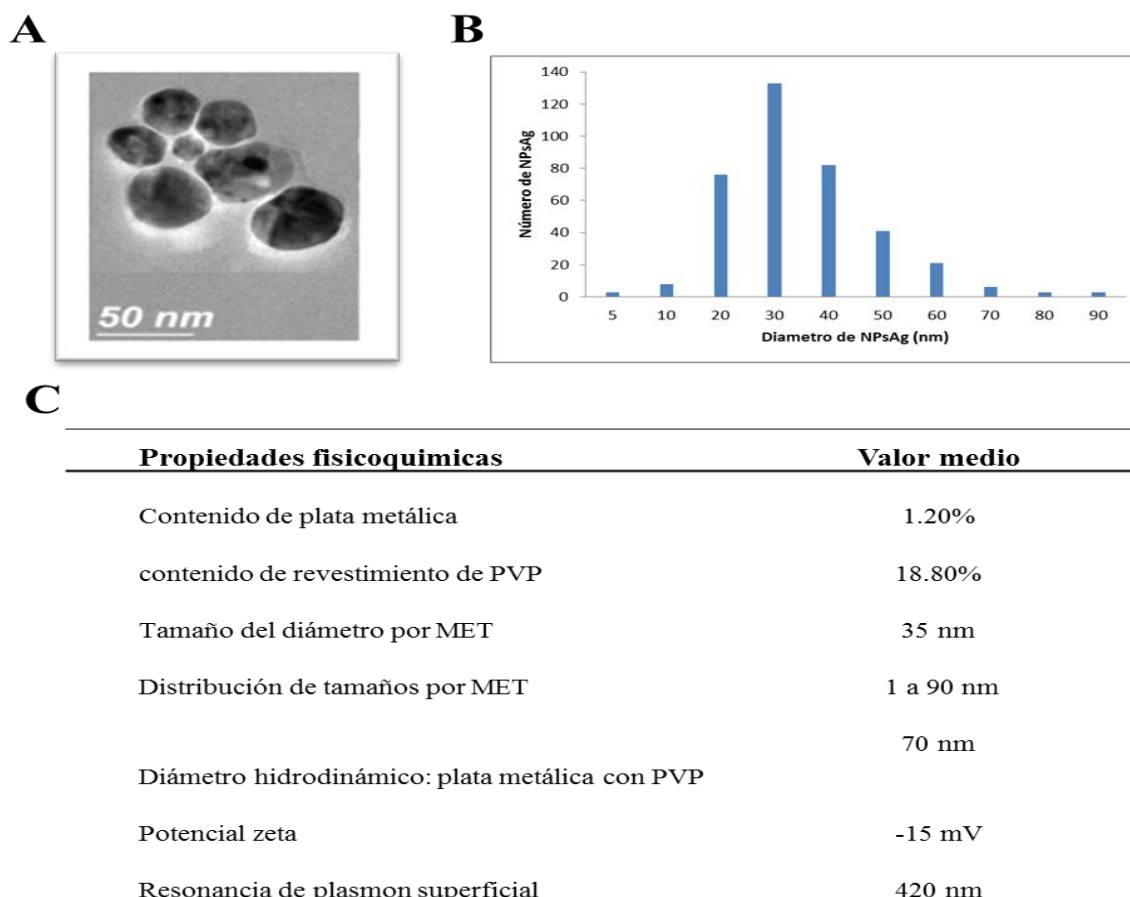


Fig. 4. Características fisicoquímicas de AgNPs Argovit. Fig. 4A Imagen que muestra la morfología esferoidal de AgNPs Argovit, Fig. 4B frecuencia de distribución de tamaño de AgNPs calculada por MET, Fig. 4C Resumen de las características fisicoquímicas.

Las AgNPs Argovit han sido ampliamente utilizadas en aplicaciones médicas, veterinarias e industriales y cuentan con los correspondientes certificados de uso. [20].

Las AgNPs Argovit fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Vasily Burmistrov del Centro Científico y de Producción Vector-Vita (Novosibirsk, Federación Rusa).

### **5.3. Preparación de soluciones**

Para los ensayos en el intervalo amplio de concentraciones se prepararon soluciones madre a partir de Argovit al 20% y  $\text{AgNO}_3$  con agua nanopura; para lograr que las concentraciones finales de Ag en los ensayos fuesen de 0.12, 1.2, 3, 6, 12, 120, 600, 1200, 2400 y 3000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  respectivamente.

Se preparó una solución tampón de PBS con agua nanopura (Milli-Q), ajustando a un pH = 7.4 con soluciones de NaOH y HCl a 0.01 M. El ajuste de pH se realizó utilizando un potenciómetro digital Mettlet-Toledo AG 8603 Schwerzenbach Switzerland.

Se preparó una solución de Triton X-100 al 20% como control positivo, mezclando 20 mL de Triton X-100 en 80 mL de agua nanopura. Se agitó vigorosamente con vórtex hasta disolver por completo para eliminar las burbujas durante la noche.

Se utilizó nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) Sigma Aldrich 2091-39-25G EE. UU., proporcionado por el Almacén de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Ensenada. Se seleccionó  $\text{AgNO}_3$  como fuente de iones  $\text{Ag}^+$  ya que tiene la mayor solubilidad entre los compuestos de Ag.

Para el intervalo reducido de concentraciones; las soluciones madre se prepararon con los dos agentes de prueba: Argovit AgNPs en concentraciones de 4000, 8000 y 16000

$\mu\text{g} / \text{mL}$ , y  $\text{AgNO}_3$  en 2.22, 4.44 y 8.88 mM, ambos correspondientes a 240, 480 y 960  $\mu\text{g} / \text{mL}$  debido a su contenido de Ag.

Las soluciones madre se diluyeron 1:20 cuando se prepararon los experimentos, de modo que las concentraciones finales a las que se expusieron los eritrocitos en las pruebas son 200, 400 y 800  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para las AgNPs Argovit, y 0.111, 0.222 y 0.444 mM para  $\text{AgNO}_3$ , correspondientes ambas a 12, 24 y 48  $\mu\text{g} / \text{mL}$  debido a su contenido de Ag (ver Tabla 5).

*Tabla 5. Concentraciones finales de Ag en el ensayo de hemólisis.*

Sustancia de prueba	[AgNPs], $\mu\text{g} / \text{mL}$	Contenido de plata [Ag], $\mu\text{g} / \text{mL}$	Contenido de plata [Ag], mM
AgNPs	200	12	0.11125
	400	24	0.22249
	800	48	0.44499
$\text{AgNO}_3$	n/a	12	0.11125
	n/a	24	0.22249
	n/a	48	0.44499

Se preparó una solución de PVP (polivinilpirrolidona) al 18.8% en agua nanopura, misma que coincide con el contenido de PVP en la formulación de Argovit. El PVP fue proporcionado por centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### **5.4. Preparación de suspensión de eritrocitos**

Se extrajo un volumen de 25 mL de sangre venosa de un donante sano y 25 mL de un donante diabético mediante flebotomía al vacío con heparina dipotásica para evitar la coagulación. Después de la extracción, la sangre se centrifugó durante cinco minutos a 500 x g, se marcaron los niveles de hematocrito y plasma, eliminándose este último mediante aspiración suave con pipeta.

Después de tres lavados con solución salina fisiológica estéril (150 mM de NaCl) y centrifugación durante cinco minutos a 500 x g, se realizó un lavado final con solución tampón PBS a pH = 7.4 bajo las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente se reemplazó el sobrenadante con una nueva solución de PBS pH = 7.4. Para la preparación de los experimentos, se diluyó 1 mL del paquete de eritrocitos en 49 mL de PBS a pH 7.4 en un tubo de fondo cónico, lo que produjo la suspensión madre de eritrocitos de 1:50.

#### **5.5. Ensayo de hemólisis**

Para el intervalo amplio de concentraciones se montó un experimento por triplicado de acuerdo con la Tabla 1 y Tabla 2. Esto permitió determinar el pH al que se observan las mayores hemólisis en el experimento y verificar las concentraciones entre las cuales se observa el cambio de no hemólisis a hemólisis (ver Fig. 8).

Para el intervalo reducido de concentraciones se realizaron tres experimentos de hemólisis independientes, cada uno por triplicado (n = 9) en tubos de fondo cónico de 1.5 mL, con las soluciones madre experimentales de AgNPs Argovit y AgNO<sub>3</sub>, para lograr

concentraciones finales en los ensayos de 12, 24 y 48  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de contenido de Ag. Además, se prepararon un control negativo (PBS) y un control positivo (TritonX-100). El experimento se configuró para lograr un volumen final de 1000  $\mu\text{L}$  en cada ensayo; esto se logró agregando 50  $\mu\text{L}$  del agente de prueba a 950  $\mu\text{L}$  de la dilución de suspensión madre de eritrocitos.

El montaje de los tubos experimentales fue el siguiente: para evaluar la hemólisis de las AgNPs (tubos p), se añadió la suspensión de eritrocitos a los agentes probados a diferentes concentraciones. Para restar la interferencia de las AgNPs y obtener controles negativos individuales  $c(-)_{ind}$ , no se añadió suspensión de eritrocitos a cada concentración de agentes ensayados. Para producir un control negativo general  $c(-)$ , la suspensión de eritrocitos se añadió a PBS y para un control positivo  $c(+)$ , la suspensión de eritrocitos se añadió a Triton X-100 al 20%.

Todos los tubos se incubaron simultáneamente a 37 ° C durante 2 horas y se agitaron mediante inversión suave una vez cada media hora durante las 2 horas de incubación. Los tubos se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos y se transfirieron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a placas de 96 pozos; para posteriormente realizar las lecturas de absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Controlab EliRead (RT-21007) para 96 pozos. Los porcentajes de hemólisis se calcularon mediante la fórmula:

$$\% \text{ Hem.} = 100 * \left[ \frac{A_p - A_{c(-)_{ind}}}{A_{c(+)} - A_{c(-)}} \right]$$

dónde

$A_p$  = absorbancia de la muestra

Ac (-) ind = absorbancia del control negativo con eritrocitos en cada muestra

Ac (+) = absorbancia del control positivo

Ac (-) = absorbancia del control negativo con eritrocitos

Potencial hemolítico de las AgNPs Argovit

Después de firmar un consentimiento informado, se obtuvieron muestras de sangre venosa de un sujeto sano y un sujeto diabético. Para la determinación del potencial hemolítico de las AgNPs Argovit y  $\text{AgNO}_3$ , se utilizó el protocolo del ensayo de hemólisis *ex vivo* dependiente del pH [45].

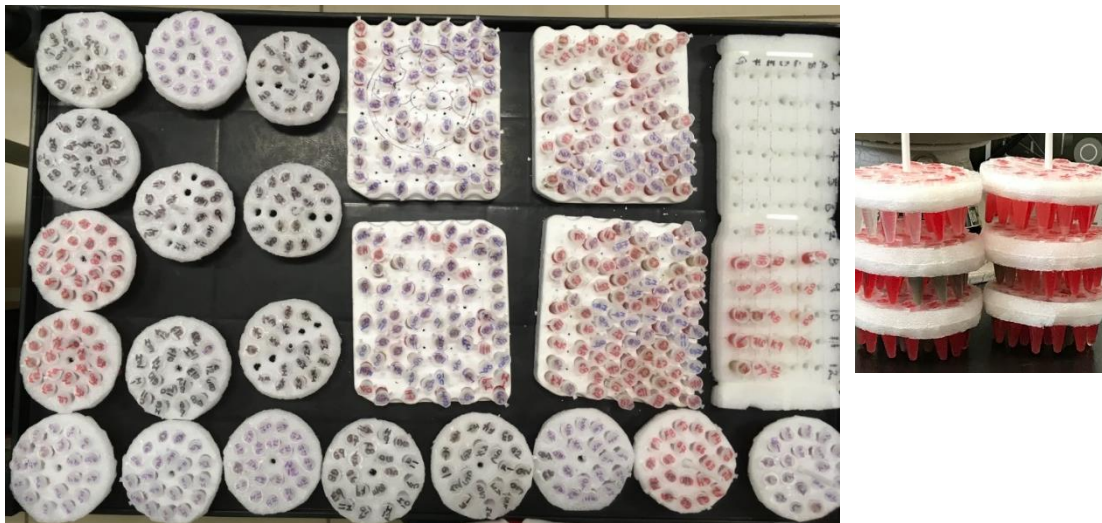
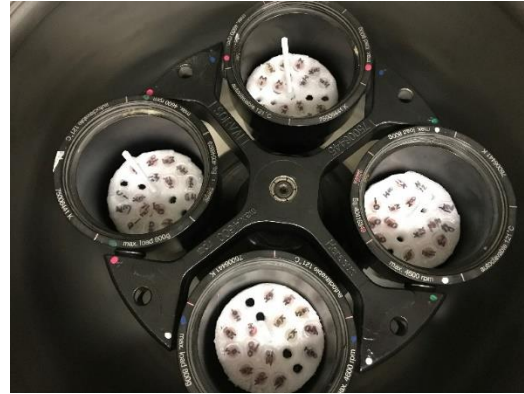


Fig. 5. Montaje de tubos para ensayo de hemólisis.



*Fig. 7. Incubación.*



*Fig. 6. Centrifugación.*

## **5.6. Análisis estadístico**

Luego de verificar la homocedasticidad con la prueba de Bartlett, se realizó un análisis de varianza multifactorial, para detectar diferencias estadísticas en los datos de hemólisis; con  $n = 9$  en tres experimentos independientes con tres repeticiones. Se realizó una prueba post hoc de Tukey en Statistica V.13.3 1984-2017, TIBCO Software Inc., y se generaron gráficos con GraphPad Prism 8.1.0 (32)

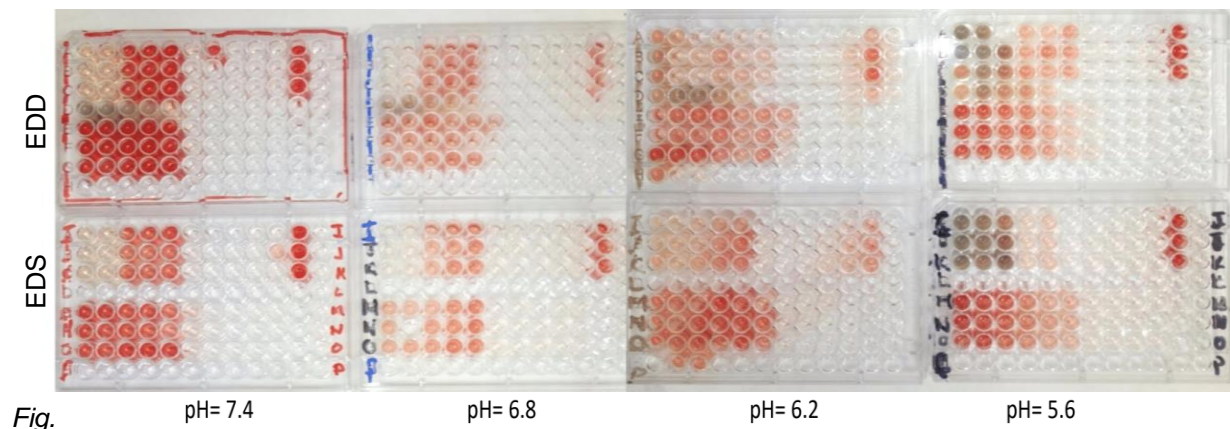
## 6. Resultados y Discusión

Los resultados de la hemólisis producida por las AgNPs y AgNO<sub>3</sub>, se muestran en las Figuras Fig. 8, Fig. 9 y Fig. 10. Las Tablas Tabla 6 y Tabla 7, indican las concentraciones de Ag probadas en cada ensayo de los intervalos amplio y reducido respectivamente. La Tabla 8, muestra los resultados del análisis estadístico realizado para la hemólisis del intervalo reducido y se discuten en las secciones 6.1 a 6.5 de este documento.

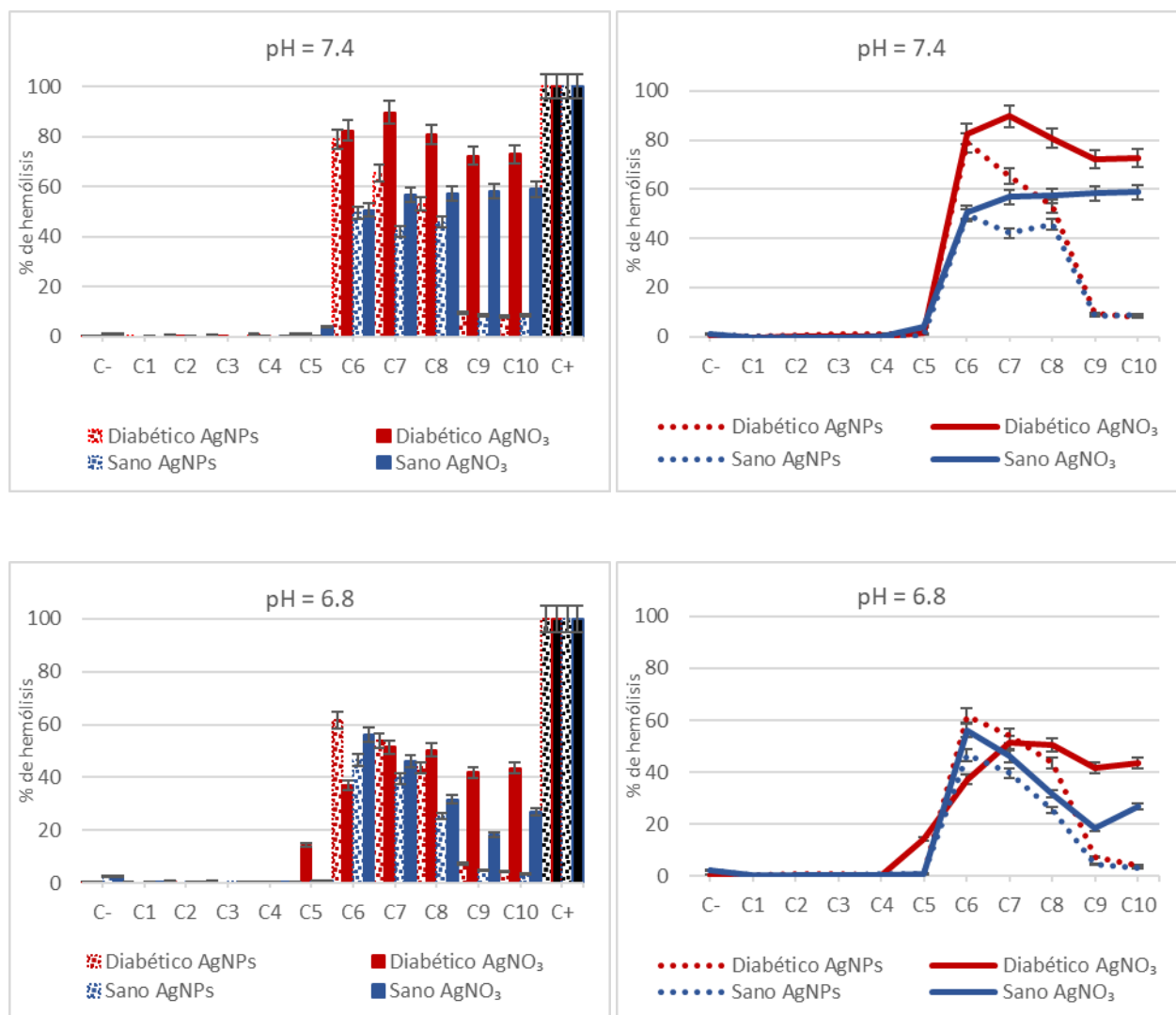
*Tabla 6. Intervalo amplio de concentraciones ensayadas.*

Concentración	C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1
µg / mL [Ag]	3,000	2,400	1,200	600	120	12	6	3	1.2	0.12

Intervalo amplio de concentraciones: Ensayos de hemólisis a concentraciones finales de 3000, 2400, 1200, 600, 120, 12, 6, 3, 1.2 y 0.12 µg / mL de contenido de Ag en las AgNPs y AgNO<sub>3</sub> para EDD y EDS a pHs= 7.4, 6.8, 6.2 y 5.6.



En la Fig. 8 se observa que el pH en el que se libera una mayor cantidad de hemoglobina es el de 7.4 (fisiológico), tanto en EDS como en EDD. Los pHs del ensayo de hemólisis *ex vivo* indican la ruptura de la membrana endosómica que la interacción extracelular o fisiológica de las AgNPs con los eritrocitos produce mayor hemólisis que a otros pHs. El protocolo de hemólisis *ex vivo* dependiente del pH, permite por un lado determinar a cuál pH ocurre la mayor hemólisis. de las concentraciones a las que Argovit™ pasa de ser no hemolítico a hemolítico,



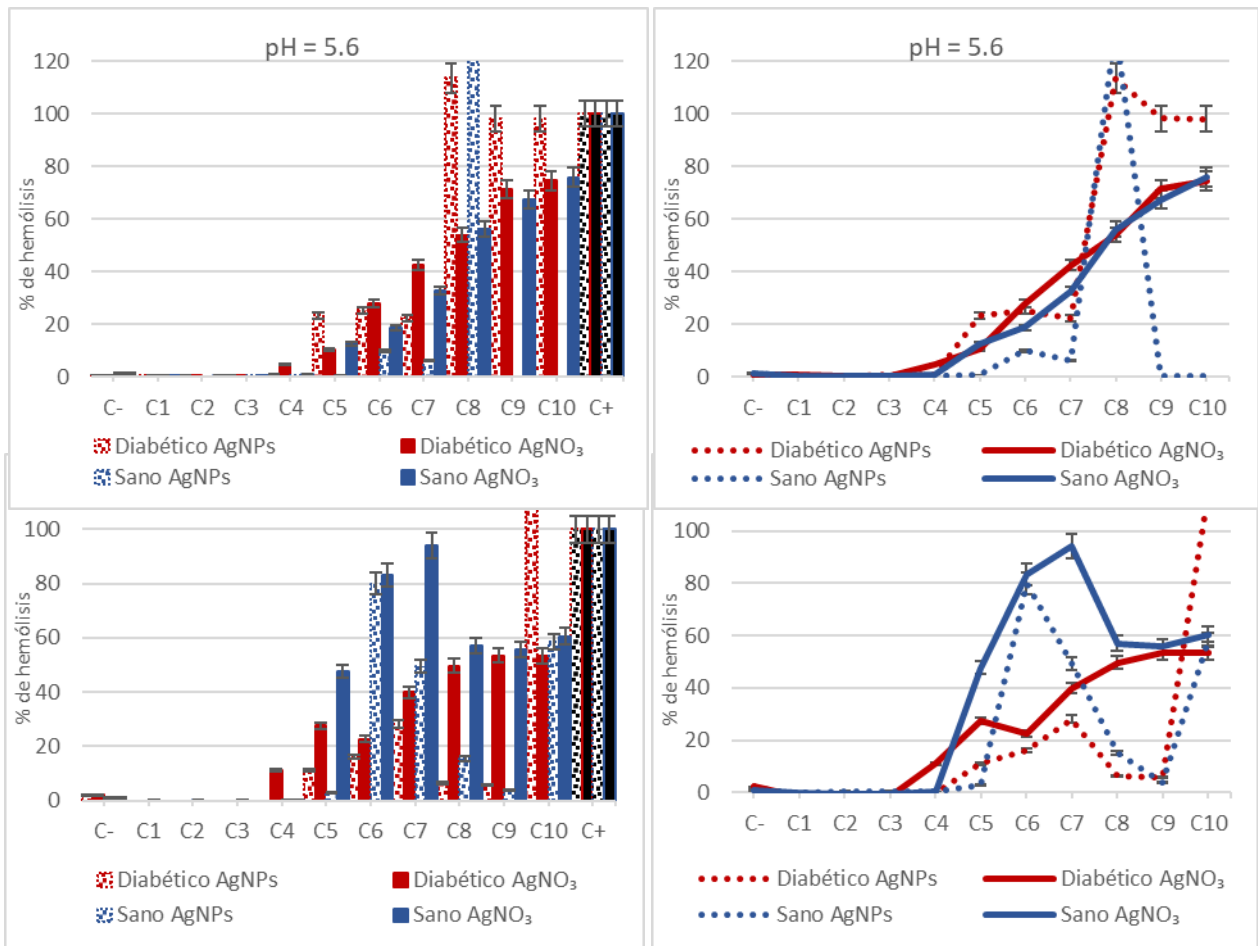


Tabla 7. Intervalo reducido de concentraciones.

Concentración	C5	Ca	Cb	Cc	Cd	C6
µg / mL [Ag]	12	24	48	72	96	120

Ensayos de hemólisis a concentraciones finales de 12, 24, 48, 72, 96 y 120 µg / mL de contenido de Ag en las AgNPs y AgNO<sub>3</sub> a pH= 7.4 en EDD y EDS.

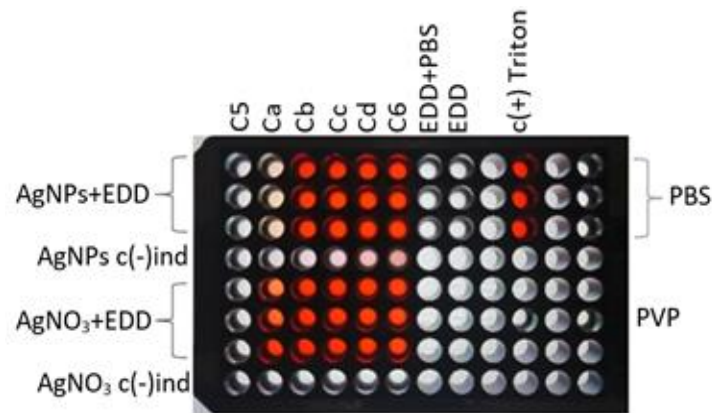


Fig. 9. Placa de 96 pozos con sobrenadantes para el ensayo con EDD. (Fuente: elaboración propia)

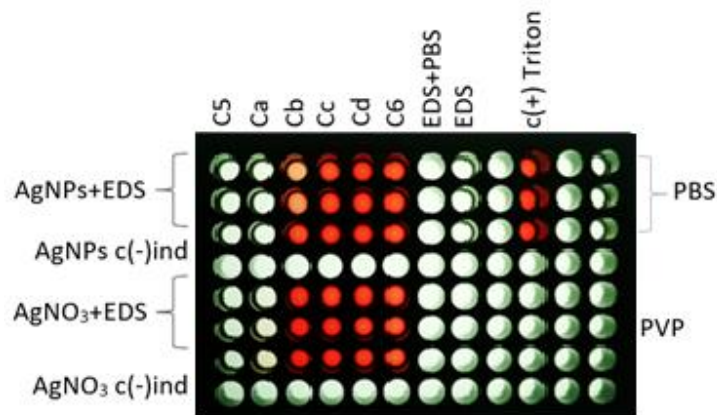


Fig. 10. Placa de 96 pozos con sobrenadantes para el ensayo con EDS. (Fuente: elaboración propia)

Tabla 8. Estadística para el intervalo reducido de concentraciones de Ag<sup>+</sup>.

Agente	Eritrocitos	Concentración	% H	SEM
AgNPs	Diab.	0	0.21	0.29
AgNPs	Diab.	12	2.21	0.39
AgNPs	Diab.	24	4.25	1.13
AgNPs	Diab.	48	91.88	2.84
AgNPs	Diab.	Triton X-100	99.79	0.29
AgNPs	Sano	0	0.25	0.28
AgNPs	Sano	12	1.97	0.23
AgNPs	Sano	24	-0.24	0.13
AgNPs	Sano	48	74.60	5.62
AgNPs	Sano	Triton X-100	99.75	0.28

AgNO <sub>3</sub>	Diab.	0	0.21	0.29
AgNO <sub>3</sub>	Diab.	12	1.64	0.39
AgNO <sub>3</sub>	Diab.	24	17.78	3.81
AgNO <sub>3</sub>	Diab.	48	105.58	4.28
AgNO <sub>3</sub>	Diab.	Triton X-100	98.98	0.05
AgNO <sub>3</sub>	Sano	0	0.25	0.28
AgNO <sub>3</sub>	Sano	12	2.34	0.22
AgNO <sub>3</sub>	Sano	24	13.64	1.86
AgNO <sub>3</sub>	Sano	48	100.37	3.04
AgNO <sub>3</sub>	Sano	Triton X-100	99.14	0.06

### 6.1. Hemólisis en eritrocitos de donante sano (EDS) y eritrocitos de donante diabético (EDD) producidos por las AgNPs Argovit y AgNO<sub>3</sub>

Se realizaron ensayos para determinar el efecto hemolítico de una formulación de nanopartículas de plata (AgNPs Argovit) y nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) sobre eritrocitos de dos tipos de donantes, sanos (EDS) y diabéticos (EDD). Las concentraciones de AgNP ensayadas fueron 200, 400 y 800 µg / mL considerando la composición completa de la formulación de AgNPs. Se utilizaron 12, 24 y 48 µg / mL correspondientes a las concentraciones de Ag<sup>+</sup> en AgNO<sub>3</sub> y al contenido de plata de la formulación de AgNPs. Se utilizó PBS como control negativo y Triton X-100 como control positivo.

### 6.2. Hemólisis de EDS por Ag<sup>+</sup> y AgNPs

En la Fig. 11 se observa una dependencia de la hemólisis por las AgNPs y Ag<sup>+</sup> en EDS. Los porcentajes de hemólisis de las AgNPs (1.96 ± 0,23%) y (-0.24 ± 0,13%) mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo (p≤0,05) a concentraciones de

200 y 400  $\mu\text{g} / \text{mL}$  respectivamente, sin sobrepasar el límite. no hemolítico al 5%, por lo que las AgNPs a estas concentraciones podrían considerarse no hemolíticas. Para  $\text{Ag}^+$ , la hemólisis fue  $(2.3 \pm 0.2\%)$  y  $(13.6 \pm 1.9\%)$  a concentraciones de 12 y 24  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , siendo esta última una marcada hemólisis para  $\text{Ag}^+$ . La diferencia de hemólisis entre  $\text{Ag}^+$  y AgNP es del 13.8%. Incluso teniendo el mismo contenido de plata (24  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), las EDS son más susceptibles a la hemólisis por  $\text{Ag}^+$  que por AgNP.

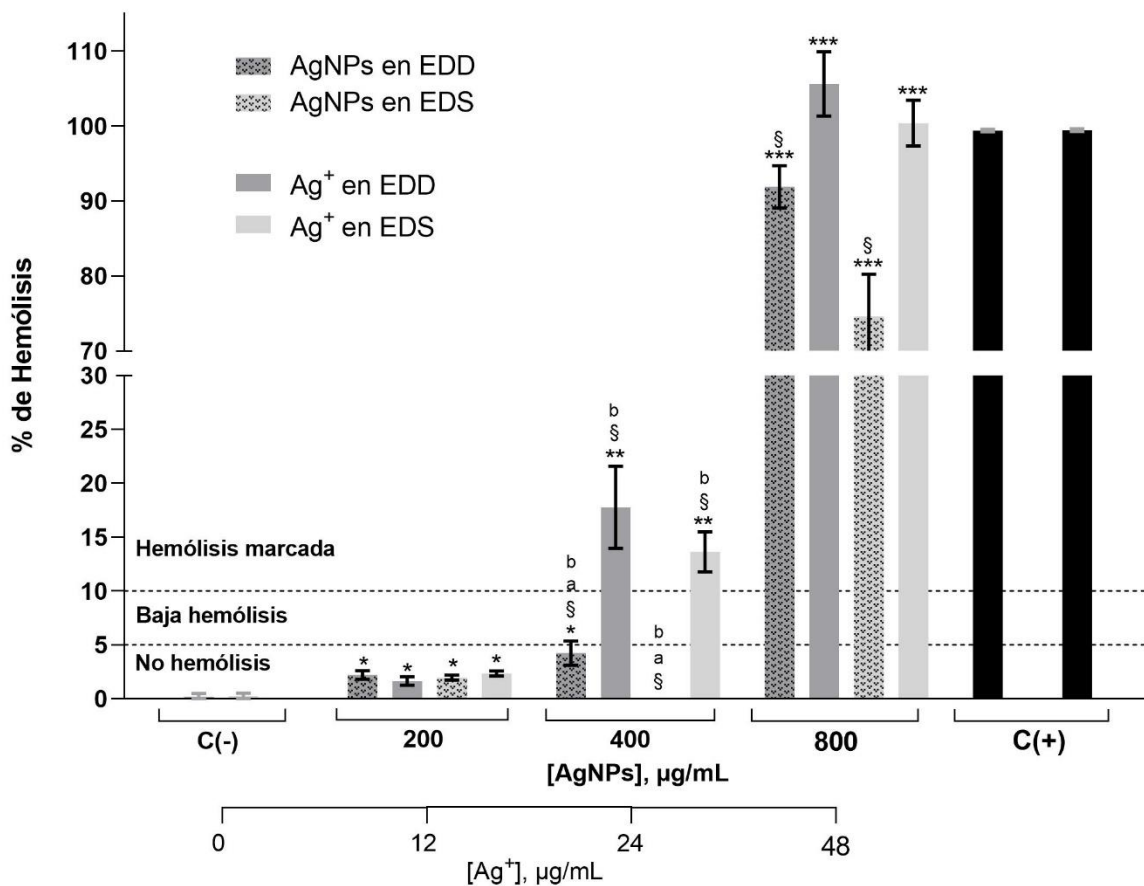


Fig. 11. Dependencia de hemólisis en EDD y EDS respecto de la concentración. (Fuente: elaboración propia)

En la Fig. 11 se observa una dependencia de la hemólisis por las AgNPs y Ag<sup>+</sup> en EDS. Los porcentajes de hemólisis de las AgNPs ( $1.96 \pm 0.23\%$ ) y ( $-0.24 \pm 0.13\%$ ) mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo ( $p \leq 0,05$ ) a concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{g} / \text{mL}$  respectivamente, sin sobrepasar el límite. no hemolítico al 5%, por lo que las AgNPs a estas concentraciones podrían considerarse no hemolíticas. Para Ag<sup>+</sup>, la hemólisis fue ( $2.3 \pm 0.2\%$ ) y ( $13.6 \pm 1.9\%$ ) a concentraciones de 12 y 24  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , siendo esta última una marcada hemólisis para Ag<sup>+</sup>. La diferencia de hemólisis entre Ag<sup>+</sup> y AgNP es del 13.8%. Incluso teniendo el mismo contenido de plata (24  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), las EDS son más susceptibles a la hemólisis por Ag<sup>+</sup> que por AgNP.

Las AgNPs son marcadamente hemolíticas cuando la concentración es de 800  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , produciendo una hemólisis de  $74.6 \pm 5.6\%$ , con diferencias muy significativas con el control negativo (\*\* $p \leq 0.001$ ). La hemólisis para Ag<sup>+</sup> ( $100.4 \pm 3.0\%$ ) también mostró diferencias altamente significativas con el control negativo (\*\* $p \leq 0.001$ ). Los EDS son más susceptibles a la hemólisis por Ag<sup>+</sup> que las AgNPs, incluso teniendo el mismo contenido de plata (48  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) ya que hay una diferencia de hemólisis del 25,8% entre los dos agentes analizados.

La toxicidad del AgNO<sub>3</sub> como fuente de iones de plata depende en gran medida de su alta solubilidad (2160 g / L) [79] y la rápida formación de iones Ag, mientras que en las AgNPs solo se disocia una fracción de la plata contenida (0.024  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de Ag<sup>+</sup> en 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de AgNP) debido al polímero envolvente de PVP [5]. Además, el núcleo de las AgNPs está en una forma metálica que es una forma insoluble de Ag, por lo que no contribuye inmediatamente a la disponibilidad de iones Ag<sup>+</sup> como lo haría una solución de AgNO<sub>3</sub>.

Los resultados presentados en este trabajo para hemólisis en EDS de  $2.3 \pm 0.2\%$ ,  $13.6 \pm 1.9\%$  y  $100.4 \pm 3.0\%$  para 12, 24 y 48  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de  $\text{Ag}^+$  respectivamente, son consistentes con Kim, M.J. et al. [11] para  $\text{Ag}^+$ , donde se informa de hemólisis de 4.5, 17.9, 35.7% para concentraciones de 19, 31.7 y 63.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de  $\text{Ag}^+$  respectivamente.

Nuestros resultados confirman que la disponibilidad de  $\text{Ag}^+$  cuando se libera de la nanopartícula es mucho menor que la del  $\text{AgNO}_3$  disuelto, produciendo así un mayor efecto hemolítico por  $\text{Ag}^+$  que por AgNPs, como han demostrado otros autores con otros biomarcadores (y otros modelos biológicos) [5], [27], [80] y [81].

Esta diferencia en la disponibilidad de  $\text{Ag}^+$  entre una solución de  $\text{AgNO}_3$  y AgNP podría explicar las diferencias en las hemólisis observadas para  $\text{Ag}^+$  y AgNP en nuestros resultados.

### **6.3. Hemólisis de EDD por $\text{Ag}^+$ y AgNPs**

Hasta donde sabemos, el presente trabajo es el primer informe en el que se estudia el efecto hemolítico de AgNPs o  $\text{Ag}^+$  sobre EDD.

En Fig. 11 Se observa una dependencia de la hemólisis por las AgNPs y  $\text{Ag}^+$  en EDD. Los porcentajes de hemólisis de AgNPs ( $2.2 \pm 0.4\%$ ) y ( $4.2 \pm 1.1\%$ ) mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo (\*  $p \leq 0.05$ ) a concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{g} / \text{mL}$  respectivamente, sin exceder el no límite hemolítico. 5%, por lo que las AgNPs

a estas concentraciones podrían considerarse no hemolíticas. Para  $\text{Ag}^+$ , la hemólisis fue de  $1.6 \pm 0.4$  y  $17.8 \pm 3.8\%$ , a concentraciones de 12 y 24  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , siendo esta última una marcada hemólisis para  $\text{Ag}^+$ . La diferencia de hemólisis entre  $\text{Ag}^+$  y AgNP es del 13.6%. Incluso teniendo el mismo contenido de plata (24  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), los EDD son más susceptibles a la hemólisis por  $\text{Ag}^+$  que por AgNP.

Las AgNPs son marcadamente hemolíticas cuando la concentración es de 800  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , produciendo una hemólisis del  $91.9 \pm 2.8\%$ , con diferencias muy significativas con el control negativo (\*\* $p \leq 0.001$ ). La hemólisis para  $\text{Ag}^+$  ( $105.6 \pm 4.3\%$ ) también mostró diferencias altamente significativas con el control negativo (\*\* $p \leq 0.001$ ). Los EDD son más susceptibles a la hemólisis por  $\text{Ag}^+$  que las AgNPs, incluso si tienen el mismo contenido de plata (48  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), ya que existe una diferencia de hemólisis del 13.7% entre los dos agentes analizados.

#### **6.4. Hemólisis en EDS y EDD**

Independientemente del tipo de eritrocito (EDS o EDD), ninguno de los dos agentes hemolíticos probados parece desencadenar ningún mecanismo hemolítico a 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de AgNP.

Claramente, la hemólisis causada por las AgNPs es mucho menor que la causada por  $\text{Ag}^+$  con una concentración de plata de 24  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Si comparamos el efecto hemolítico de AgNPs y  $\text{Ag}^+$  en EDD, encontramos que el primero produce cuatro veces menos hemólisis ( $4.2 \pm 1.1\%$ ) que el segundo ( $17.8 \pm 3.8\%$ ). Si hacemos la misma comparación

con los valores de hemólisis encontrados en EDS, la sensibilidad de EDS es 68 veces mayor a  $\text{Ag}^+$  que a AgNPs, presentando valores de hemólisis de  $13.6 \pm 1.9\%$  y  $-0.24\% \pm 0.13$ , respectivamente. Es importante señalar que, si bien la sensibilidad del EDD es mayor que la del EDS en relación con la hemólisis, en ningún caso se podría decir que hay hemólisis, ya que los valores son inferiores al valor límite establecido del 5%. (Fig. 11). Lo contrario es el caso de  $\text{Ag}^+$ , en el que la misma concentración de  $24 \mu\text{g} / \text{mL}$ , causa una hemólisis marcada tanto en EDS como en EDD. Aunque a la concentración de  $48 \mu\text{g} / \text{mL}$  de  $\text{Ag}^+$  ambas sustancias ya generan una marcada hemólisis en EDS y EDD, el daño es aún menor con AgNP que con  $\text{Ag}^+$ .

Las diferencias que muestran una mayor susceptibilidad de las EDD que las EDS a cualquiera de los dos agentes de prueba podrían explicarse por los cambios estructurales que induce la hiperglucemia en los glóbulos rojos provocando estrés osmótico y mayor fragilidad en la membrana, como se explicó. [23] y [24].

Los EDD tienen una disminución en la deformabilidad y, por lo tanto, son más susceptibles a la ruptura en comparación con los EDS. [11], [12], [13]. Es probable que la hemólisis producida por  $\text{Ag}^+$  y AgNPs esté relacionada con la disminución de la plasticidad y la deficiencia en la energía de los eritrocitos reportada por Sopjani, et al. [82]. La diferencia en la funcionalidad estructural entre las membranas EDD y EDS implica que las primeras pueden tener un mayor porcentaje de hemólisis que las últimas.

En resumen, para los agentes de plata estudiados, la hemólisis presenta la siguiente secuencia:

$\text{AgNO}_3$  EDD >  $\text{AgNO}_3$  EDS > AgNPs EDD > AgNPs EDS

## 6.5. Hemólisis producida por otras AgNP, Ag<sup>+</sup> y Argovit en EDS

La Fig. 12 muestra la hemólisis producida por AgNPs y Ag<sup>+</sup> en EDS reportada en 16 trabajos. Los resultados de este trabajo se incluyen con fines comparativos. Las propiedades fisicoquímicas y los resultados de hemólisis de las AgNPs se muestran en la Tabla 9. Se utiliza la abreviatura NP-X donde X es el número asignado para la nanopartícula.

Para incorporar el papel del recubrimiento de las AgNPs en el análisis comparativo que se presenta en este trabajo, las AgNPs se clasificaron en los grupos que se muestran en la Fig. 12. Con recubrimiento biogénico (BIO), con Citrato (CIT), con almidón (ALM) y con polivinilpirrolidona (PVP). La NP-22 recubierta con alcohol polivinílico (PVA) se excluyó de este análisis ya que solo se encontró un estudio con este recubrimiento que cruza el límite de hemólisis del 5% a 160 µg / mL, cerca de NP-19 recubierta con almidón.

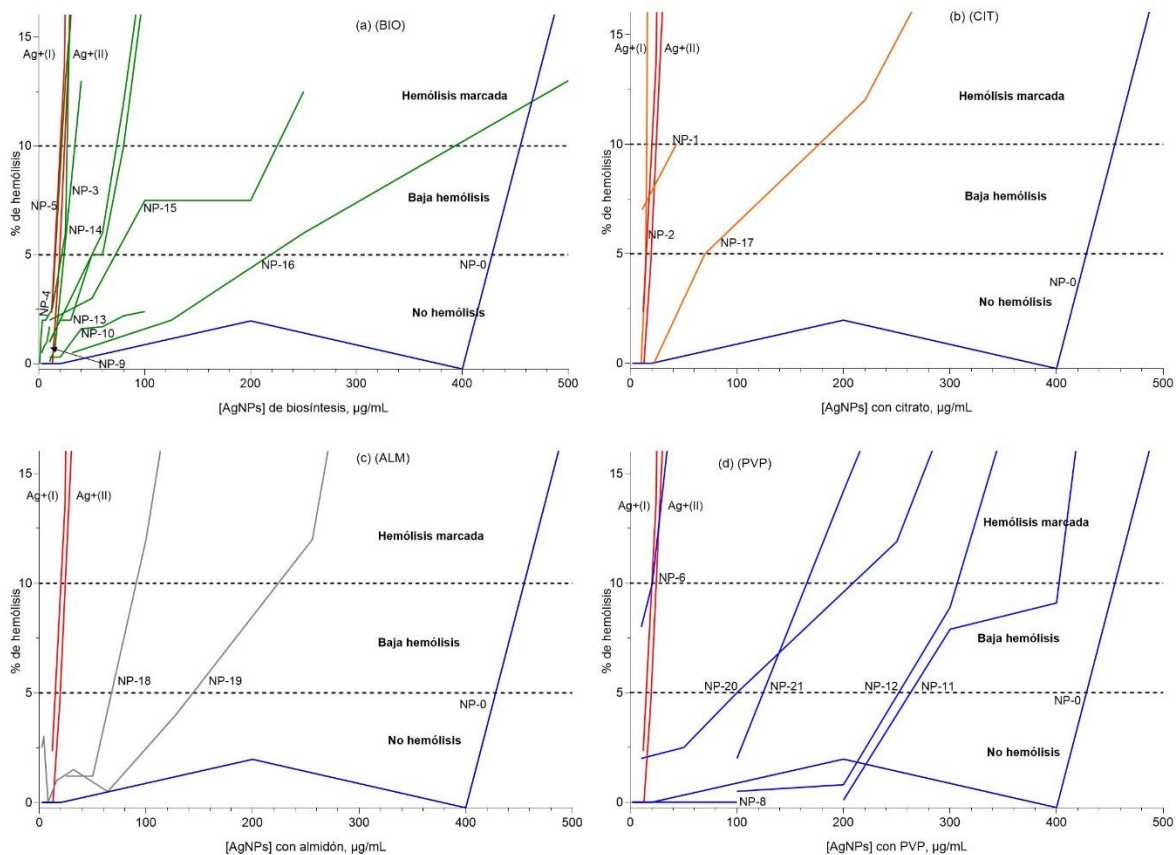


Fig. 12. Hemólisis en EDS por AgNPs con recubrimientos similares. (fuente: elaboración propia con base en artículos publicados según la Tabla 9)

Fig. 12. Hemólisis en EDS por AgNPs con recubrimientos similares. Fig. 12(a) de biosíntesis (BIO), Fig. 12(b) con citrato (CIT), Fig. 12 (c) con almidón (ALM), Fig. 12 (d) con polivinilpirrolidona (PVP). Con fines comparativos, se agrega a cada gráfico la curva de hemólisis de NP-0 (Argovit). Los límites de no hemólisis (5%) y hemólisis baja (10%) se muestran con líneas horizontales de puntos.

La Fig. 12(a) ilustra la hemólisis por las AgNPs de biosíntesis. La hemólisis mayor o igual al 5% ocurre a concentraciones de 12, 18, 50, 60, 70 y 220  $\mu\text{g} / \text{mL}$  y tienen un diámetro

de 52, 29.3, 25.3, 24.9, 12 y 8 nm para NP-5, NP -4, NP-13, NP-14, NP-15 y NP-16, respectivamente.

Como se muestra en la Fig. 12(a), las AgNPs biosintéticas más grandes son las más hemolíticas. Este hallazgo es paradójicamente contrario a lo que comúnmente se establece de que las AgNPs más tóxicas son las más pequeñas, probablemente esto se deba a diferencias en la composición química del recubrimiento.

Para las AgNPs biosintetizadas es importante considerar que el recubrimiento que se incorpora al AgNP de forma natural puede contener una gran variedad de moléculas que no se reportan claramente en ensayos publicados.

La naturaleza química diversa que implica un estabilizador presente en las AgNPs producidas por biosíntesis, podría jugar un papel importante en la relación directa entre el diámetro y la hemólisis, por lo que se requieren estudios más sistemáticos y profundos para aclarar esta relación.

En la Fig. 12(b) muestra datos de tres formulaciones con citrato como recubrimiento NP-1, NP-2 y NP-17 de 20, 20 y 30 nm respectivamente. NP-1 no presenta datos suficientes para evaluar la concentración a la que ocurre la hemólisis al 5%, sin embargo, se observa que a 40  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ya se alcanza el límite hemolítico del 10%. Con 15  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de NP-2, la hemólisis producida supera el valor límite del 5%. Para lograr el mismo efecto con la formulación NP-17, se requiere una concentración 4 veces mayor, 60  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Aunque solo están presentes tres tamaños de AgNPs-CIT, claramente al aumentar el tamaño, el efecto hemolítico disminuye. El diámetro se ha descrito como uno de los parámetros que

influyen en la toxicidad de las AgNPs en diferentes tipos de células. [83], [84], lo cual es consistente con los datos trazados para formulaciones de AgNP-CIT.

Fig. 12(c) muestra que las AgNPs estabilizadas con almidón tienen un patrón similar al observado para las AgNPs con citrato; las nanopartículas más pequeñas son más hemolíticas ya que NP-18 es más hemolítica que NP-19, superando el 5% de hemólisis a 70 y 145  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente.

El intervalo de concentraciones que presentan estas formulaciones para superar el límite de hemólisis del 5%, es superior al encontrado para las AgNPs estabilizadas con citrato, aunque estas últimas son mayores. Lo anterior corrobora el papel del agente de recubrimiento en el efecto hemolítico de las AgNPs en EDS.

Las formulaciones encontradas para las AgNPs recubiertas con PVP (Fig. 12(d)) fueron NP-6, NP-20, NP-21, NP-12, NP-11 y NP-0, con diámetros de 20, 49,3, 30, 100, 40 X 2  $\mu\text{m}$  y 35 nm respectivamente. Para estas AgNPs, se produjo una hemólisis del 5% a concentraciones de 15, 100, 120, 255, 260 y 430  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente.

En el caso de las AgNPs estabilizadas con PVP, en general la tendencia a ser menos hemolíticas se mantiene a medida que aumenta el diámetro. Sin embargo, existen dos inconsistencias, la primera es que NP-21 (30 nm) con PVP de 40 kDa con un diámetro menor es menos hemolítica que NP-20 (49.3 nm) en el que no se reporta la masa de PVP en kDa, sin embargo, para este último los porcentajes de Ag y PVP en AgNP son 95.5 y 0.2% respectivamente (ver Tabla 9), lo que implica que se trata de un AgNP casi desnuda, característica que podría explicar su capacidad hemolítica a pesar de su tamaño.

La segunda inconsistencia es que NP-0 es la nanopartícula menos hemolítica que cualquier otra con un diámetro mayor. Para explicar esta diferencia, se compararon específicamente las propiedades fisicoquímicas de NP-21 y NP-0. Estas dos formulaciones tienen el mismo agente estabilizador (PVP), tamaños promedio aproximados (30 y 35 nm) y casi las mismas proporciones de PVP y Ag en las AgNPs (94 y 6% y 95 y 5%, respectivamente). Sin embargo, la masa molecular de PVP en NP-21 es de 40 kDa, mientras que en NP-0 es de  $12 \pm 2,7$  kDa.

En el trabajo de Kyrychenko, et al. [85], Se descubrió que, cuanto mayor es la masa molecular de PVP, menor es la superficie cubierta de AgNP. Cuando esto ocurre, la superficie de plata metálica en AgNP está más expuesta a su entorno, es más reactiva y puede oxidarse más rápido haciéndola menos estable. Este hallazgo es consistente con la estabilidad reportada por los productores de estas dos formulaciones de AgNP. NanoComposix™ Company recomienda usar su formulación NP-21 en menos de 30 días, mientras que el productor Vector-Vita garantiza una estabilidad de NP-0 durante 2 años según la etiqueta del producto.

Si la mayor masa molecular de PVP en NP-21 conduce a una oxidación más rápida y una mayor producción de  $\text{Ag}^+$ , está claro por qué estos AgNP son mucho más hemolíticos que NP-0.

Es importante conocer la masa polimérica de la PVP de las diferentes formulaciones al comparar la hemólisis en EDS, considerando que la masa polimérica de la PVP puede influir significativamente en la estabilidad y reactividad de las AgNPs.

En resumen, los NP-0 son los menos hemolíticos porque el recubrimiento de PVP tiene una masa polimérica menor de  $12 \pm 2.7$  kDa en comparación con NP-21, que tiene una masa polimérica de 40 kDa, según lo establecido por Kyrychenko, et al. [85] y considerando que estos dos AgNP son muy similares en el resto de propiedades fisicoquímicas.

Las diferencias en las características fisicoquímicas de los recubrimientos de las AgNPs son importantes para explicar las diferencias en la hemólisis en EDS cuando se comparan las AgNPs.

Tabla 9. Características fisicoquímicas de las AgNPs comparadas.

Características fisicoquímicas, algunas condiciones experimentales y los resultados de hemólisis en artículos publicados y el presente trabajo.

AgNP (NP-X)	Forma	Recubrimiento	Ag y recubrimiento en la AgNP (%) peso	Tiempo de exposición (horas)	% de eritrocitos en la suspensión de ensayo	Solvente	Concs. de AgNPs usadas en el ensayo ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	% de hemólisis	Ref.
	Diámetro (nm)								
	Diám. hidrodin. (nm)								
	Potencial $\zeta$ (mV)								
NP-0	esferoide	PVP, 12.6 $\pm$ 2.7 kDa, at 18.8% en la formulación	6, 94	2	5	PBS	200	1.97	Este trabajo
	35 $\pm$ 12						400	-0.24	
	70						800	74.60	
	-15								
NP-1	esferoide	Citrato	-	3	3	DPBS	10.8	7.00	[64]
	20								
	26.6 $\pm$ 1.89						21.6	8.00	
	-37						43.2	10.00	
NP-2	esférica	Citrato	-	3	$\approx$ 2.3	PBS	10	0.00	[65]
							12	2.00	
							14	4.00	
	20						15	8.00	
							16	17.00	
	-						17	24.00	
							18	34.00	
							20	57.00	
							25	90.00	
							30	100.00	
-	40	109.00							

							50	105.00	
NP-3	esférica	glucano de hongos	-	2	1	PBS	10	0.09	[66]
	2.445 ± 1.08						15	0.68	
	-						40	13.00	
	-								
NP-4	circular	extracto de planta	-	1	1	sol. salina	0.781	0.00	[67]
	60						1.563	1.00	
	29.3						3.13	2.00	
	-23						6.25	2.00	
							12.5	2.50	
							25	6.00	
							50	69.00	
	100	96.00							
NP-5	-	extracto acuoso de planta	-	1	2	PBS	12.5	2.60	[68]
	52						25	13.00	
	-						50	27.50	
	-						100	27.30	
NP-6	esférica	PVP, 40 kDa	5, 95	3	3	DPBS	10.3	8.00	[64]
	20						20.6	10.00	
	58.6±2.4						41.2	19.00	
	-25.1±3.7								
NP-7	-	sin recubrimiento	-	3.5	≈1	DPBS	22	6.00	[14]
	100						70	13.00	
	-						220	22.00	
	-1.35						700	60.00	
							2200	66.00	
NP-8	esferoide	PVP	-	1	5	tyrode	1	0	[69]
	16						5	0	
	-						10	0	

	-						50	0	
							100	0	
NP-9	Cuasiesférica	proteína	-	1	10	PBS	2.5	0.50	[70]
	7.5 ± 4						5	0.80	
	-						7.5	1.00	
	-						10	1.70	
NP-10	-	proteína	-	1	-	PBS	10	0.30	[71]
							20	0.30	
	20						40	1.60	
	-						60	1.70	
	-						80	2.20	
	-						100	2.40	
NP-11	alambre	PVP, 40 kDa	6, 94	2	5	PBS	100	0.00	[11]
	40 nm X (1-2)						200	0.10	
	μM						300	7.90	
	40						400	9.10	
	-						500	47.70	
NP-12	esférica	PVP, 40 kDa	6, 94	2	5	PBS	100	0.50	[11]
	100						200	0.80	
	117						300	8.90	
							400	25.20	
	-						500	92.20	
NP-13	esférica	extracto etanólico de planta	-	0.5	7.21	PBS	10	1.00	[72]
							20	2.00	
							30	2.00	
							40	3.50	
							50	5.00	
							60	5.00	
	25.2								

	190.1 ± 102						80	10.00	
							100	17.50	
							200	28.00	
	-26.1 ± 1.4						400	37.00	
							800	48.00	
							1600	64.00	
NP-14	esférica	extracto acuoso de planta	-	0.5	7.21	PBS	10	1.00	
							20	2.00	
							30	3.00	
	24.9						40	4.00	
							50	5.00	
							60	6.00	
	428.2 ± 197.0						80	12.00	
							100	19.00	
							200	31.00	
							400	41.00	
	800	52.50							
							1600	67.50	
NP-15	-	extracto acuoso de planta	-	0.5	≈23.5 estimado del artículo	Sol. salina 0.5%	10	2.00	[73]
	12						50	3.00	
	-						100	7.50	
	-						200	7.50	
	-						250	12.50	
NP-16	esférica	extracto de planta	-	2	1.6	PBS	31.25	0.50	[74]
							62.5	1.00	
	8						125	2.00	
	-						250	6.00	
	-						500	13.00	
NP-17	-	citrato	-	3.5	≈1	DPBS	22	0.00	[14]

							70	5.00	
	30						220	12.00	
	-						700	56.00	
	-41.8						2200	80.00	
NP-18	-	almidón	10, 90	3	≈1	DPBS	25	1.20	[75]
	5.78						50	1.20	
	-						100	12.00	
	-1.72						200	42.00	
						400	64.00		
NP-19	esférica	almidón	-	1	4	PBS	2	2.50	[76]
	17.02 ± 6.54						4	3.00	
	-						8	0.00	
							16	1.00	
							32	1.50	
							64	0.50	
							128	4.00	
							256	12.00	
	512	82.50							
						1024	86.00		
NP-20	-	PVP	99.5, 0.2	4	≈1	TBS	10	2.00	[77]
	49.3						50	2.50	
	-						100	5.00	
	- 32.07						250	11.90	
						500	43.10		
NP-21	esférica	PVP, 40 kDa	6, 94	2	5	PBS	100	2.00	[11]
	30						200	14.20	
	36.2						300	26.00	
							400	26.80	
							500	50.00	

NP-22	-	PVA	-	3	≈1	DPBS	25	1.20	[75]
	10.8						50	1.20	
	-						100	0.60	
	0.0921						200	7.00	
Ag <sup>+</sup> (I) (este trabajo)	N/A	N/A	N/A	2	2.5	PBS	400	27.00	este trabajo
							12	2.34	
							24	13.64	
Ag <sup>+</sup> (II)	N/A	N/A	N/A	2	5	PBS	48	100.37	[11]
							19.05	4.50	
							31.75	17.90	
							63.50	35.70	
							190.50	91.00	

Los resultados de hemólisis para NP-0 comparados con los de otros AgNP y Ag<sup>+</sup>, revelan que, dado que el AgNP es menos hemolítico, tiene un mayor potencial terapéutico. El trabajo de Ruiz, et al. [5] nos presenta un panorama claro del efecto genotóxico y selectivo de NP-0 (Argovit) en el que se determina que no existe genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana a concentraciones de 0.2 a 200 µg / mL, atribuyéndolo fundamentalmente a la relación [revestimiento] / [metal]. El intervalo de concentraciones estudiado en el trabajo mencionado está muy por debajo de la concentración hemolítica reportada en este trabajo (405 y 430 µg / mL) en EDD y EDS respectivamente, abriendo la posibilidad de aplicaciones biomédicas. Por otro lado, el efecto antimicrobiano reportado por Vázquez M-Muñoz et al. [37] y antiviral de Borrego et al. [33] coinciden en reportar concentraciones alrededor de 10 µg / mL para la inhibición del crecimiento bacteriano y fúngico y la reducción de la infectividad viral. Nuevamente, las concentraciones de antimicrobianos informadas en estos trabajos están muy por debajo de la concentración hemolítica informada en este trabajo. Además, el estudio de células dendríticas realizado por Castro-Gamboa, et al. [25], muestra que a la concentración de 16.6 µg / mL de NP-0, comienza a identificarse un efecto citotóxico y daño al ADN. Esto tiene importantes implicaciones que limitan las aplicaciones terapéuticas que podría tener NP-0. Dado que, el hecho de que NP-0 no sea hemolítico a concentraciones antimicrobianas y no genotóxico para los linfocitos no descarta la citotoxicidad y genotoxicidad en las células dendríticas. Por tanto, las posibles aplicaciones biomédicas del NP-0 deberán ser evaluadas cuidadosamente considerando el panorama de toxicidad más completo posible.

Otro aspecto para considerar en el uso potencial de las AgNPs es la bioacumulación en tejidos y órganos. Buzulukov et al. [7], en su estudio sugiere que existe un espacio de más de 50 veces entre el contenido específico de AgNP observado en un órgano y la supuesta concentración umbral de su efecto tóxico. Con administraciones intragástricas de 100 µg / Kg durante 28 días en ratas, se registró una acumulación máxima de  $768 \pm 246$  ng de Ag en el hígado, concluyendo que el contenido de Ag en órganos y tejidos de rata podría considerarse como no peligroso o no tóxico.

En el estudio de exposición corta (24 a 72 horas) con una sola dosis intragástrica de AgNP en ratas, Gmshinski, et al. [8], reporta una absorción total del 2% de las AgNPs distribuidas en 11 órganos, siendo el 98% excretado en las heces.

La absorción de NP-0 en el hígado, el bazo y la mucosa del intestino delgado se informa en el trabajo de Platonova, et al. [6].

Lo anterior podría tener importantes implicaciones fisiológicas en las posibles aplicaciones biomédicas, especialmente en pacientes diabéticos, ya que las EDD presentan una mayor fragilidad eritrocitaria que las EDS.

En el contexto de las aplicaciones de las AgNPs en pacientes con diabetes tipo II, el uso tópico de NP-0 ha mostrado efectividad contra las úlceras del pie diabético, resultando en una disminución del edema junto con la diferenciación de líneas celulares que promueven el cierre y reepitelización de la úlcera [19]. Considerando que la aplicación de NP-0 en las úlceras del pie diabético es tópica, estudios como los de Buzulukov, et al. [7], Gmshinski, et al., [8] y Platonova, et al., [6], Sería necesario evaluar la bioacumulación en órganos y tejidos en modelos animales diabéticos con úlceras

diabéticas tratadas con AgNP. Sin embargo, si se considera que en el tratamiento del pie diabético se utilizan volúmenes menores a 2 mL de NP-0 y en una concentración máxima de 30,000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de AgNPs, aun cuando estos volúmenes entren en contacto con el sistema circulatorio humano; con unos 5 litros de sangre en total [86], la concentración final efectiva de interacción entre NP-0 y EDD sería  $\approx 8 \mu\text{g} / \text{mL}$ , que es una concentración no hemolítica según nuestros resultados. Este escenario representa un margen de seguridad de dos órdenes de magnitud entre la concentración efectiva final y la concentración hemolítica, por lo que se podría considerar que el uso de NP-0 es suficientemente seguro. Sin embargo, para la evaluación de la hemólisis in vitro, deben realizarse determinaciones de los niveles de efecto adverso no observado (NOAEL) y el nivel más bajo de efecto adverso observado (LOAEL) in vivo e in vitro para NP-0.

La determinación de hemólisis ya sea en EDD o EDS, contribuye a la evaluación del panorama citotóxico de las AgNPs ante posibles aplicaciones biomédicas ya que es una de las pruebas fundamentales de citocompatibilidad junto con genotoxicidad.

Conocer las concentraciones a las que se producen los diferentes bioefectos estudiados para NP-0, tiene la ventaja de aportar más información sobre la biocompatibilidad de la formulación NP-0 y por tanto de su aplicabilidad.

Sin duda, la prueba de hemólisis en EDS o EDD de NP-0, contribuye al desarrollo de potenciales fármacos derivados de NP-0.

## 7. Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que las nanopartículas de Argovit™ no presentan efecto hemolítico a concentraciones iguales o inferiores a 400 µg / mL en los eritrocitos de donantes sanos y diabéticos. El rango de concentración superior encontrado aquí es superior a la concentración efectiva para desarrollar sus efectos microbicidas, anticancerígenos e inmunoestimulantes.

La masa de recubrimiento polimérico ( $12 \pm 2,7$  kDa) de PVP en Argovit puede ser un factor relevante en el efecto no hemolítico sobre EDS y EDD.

Argovit tiene entre 3 y 4 veces menos poder hemolítico que las soluciones de  $\text{AgNO}_3$  probadas en este trabajo, incluso con el mismo contenido de plata. Esto muestra el poder atenuador de la liberación de  $\text{Ag}^+$  ejercida por PVP en esta formulación.

En el contexto experimental del efecto hemolítico que ejerce cualquier formulación de AgNP, es importante incluir no solo los EDS, sino también los EDD para sopesar mejor los posibles usos biomédicos; porque existen diferencias en la fragilidad de la membrana celular entre los EDS y los EDD.

La potencia hemolítica de esta formulación de AgNPs es de 3 a 4 veces menor en comparación con los iones de plata de  $\text{AgNO}_3$ . Por lo tanto, estos resultados nos permiten concluir que la hemólisis observada con más de 400 µg / ml de Argovit no es causada por la liberación de  $\text{Ag}^+$ , sino debido a la interacción con las AgNP en su conjunto. Las concentraciones no hemolíticas de Argovit™ determinadas en eritrocitos

de donantes sanos y diabéticos se identificaron como 405 y 430  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente. Se encontró que Argovit™ era la formulación menos hemolítica para eritrocitos de donantes sanos en comparación con otras 22 formulaciones de AgNP publicadas anteriormente. El bajo efecto hemolítico se asoció con la estabilidad de la formulación, que está finamente modulada por la naturaleza y la cantidad del agente de recubrimiento empleado. Por lo tanto, no solo la naturaleza sino también la cantidad de agente de recubrimiento deben considerarse en el diseño y la obtención de nanomateriales seguros y eficaces. Finalmente, los resultados de este trabajo también muestran la urgente necesidad de evaluar la capacidad hemolítica, entre otros parámetros toxicológicos, en muestras de donantes diabéticos debido al uso generalizado de los AgNP en el tratamiento de complicaciones de la diabetes como las úlceras de pie diabético.

## 8. Referencias

1. Ferrari, M., *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(3): p. 161-171.
2. Bailón-Moscoso, N. and J.C. Romero-Benavides, *Genotoxicity of nanomaterials, discrepancies and challenges*. 2016. **33**: p. 8-15.
3. Wijnhoven, S.W.P., et al., *Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment*. Nanotoxicology, 2009. **3**(2): p. 109-138.
4. Greulich, C., et al., *The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range*. RSC Advances, 2012. **2**(17).
5. Ruiz-Ruiz, B., et al., *Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs*. ACS Omega, 2020. **5**(21): p. 12005-12015.
6. Platonova, T., et al., *Identification of Silver Nanoparticles in the Small Intestinal Mucosa, Liver, and Spleen of Rats by Transmission Electron Microscopy*. Bulletin of experimental biology and medicine, 2013. **155**: p. 236-241.
7. Buzulukov, Y.P., et al., *Bioaccumulation of silver and gold nanoparticles in organs and tissues of rats studied by neutron activation analysis*. Biology Bulletin, 2014. **41**(3): p. 255-263.
8. Gmshinski, I.V., et al., *Nanomaterials and nanotechnologies: methods of analysis and control*. Russian Chemical Reviews, 2013. **82**(1): p. 48-76.
9. Hussain, A., B. Bhowmik, and N.C. do Vale Moreira, *COVID-19 and diabetes: Knowledge in progress*. Diabetes Res Clin Pract, 2020. **162**: p. 108142.
10. Singh, A.K., et al., *Diabetes in COVID-19: Prevalence, pathophysiology, prognosis and practical considerations*. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 2020. **14**(4): p. 303-310.
11. Kim, M.J. and S. Shin, *Toxic effects of silver nanoparticles and nanowires on erythrocyte rheology*. Food Chem Toxicol, 2014. **67**: p. 80-6.
12. Ibang, I.A., C.A. Usoro, and A.C. Nsonwu, *Glycaemic control in type 2 diabetics and the mean corpuscular fragility*. Nigerian journal of medicine : journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria, 2005. **14**(3): p. 304-306.
13. Kung, C.-M., Z.-L. Tseng, and H.-L. Wang, *Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients*. Clinical hemorheology and microcirculation, 2009. **43**(4): p. 345-351.
14. Choi, J., et al., *Physicochemical Characterization and In Vitro Hemolysis Evaluation of Silver Nanoparticles*. Toxicological Sciences, 2011. **123**(1): p. 133-143.
15. Bernauer, U., et al., *The SCCS guidance on the safety assessment of nanomaterials in cosmetics*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2020. **112**: p. 104611.
16. Paladini, F. and M. Pollini, *Antimicrobial Silver Nanoparticles for Wound Healing Application: Progress and Future Trends*. Materials (Basel), 2019. **12**(16).
17. Ezhilarasu, H., et al., *Nanoparticle-Based Therapeutic Approach for Diabetic Wound Healing*. Nanomaterials (Basel), 2020. **10**(6).
18. 자오리, *Preparation of High Valence Silver Complex Nanoparticles for Diabetic Foot Ulcers Application*. 2017, 서울대학교 대학원.
19. Almonaci-Hernández, et al., *Nanomedicine approach for the rapid healing of diabetic foot ulcers with silver nanoparticles*. 2020. **3**: p. 1-7.

20. Hernández, C., et al., *Diabetic foot ulcers treatment with silver nanoparticles*. Revista de Ciencias Tecnológicas, 2019. **2**: p. 20-25.
21. Hernández, C.A.A., et al., *Silver Nanoparticles for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers*. International Journal of Medical Nano Research, 2017. **4**(1).
22. Sowemimo-Coker, S.O., *Red blood cell hemolysis during processing*. Transfus Med Rev, 2002. **16**(1): p. 46-60.
23. Priyadarshini, K.H., et al., *Comparative study of erythrocyte fragility in diabetes mellitus and non diabetes mellitus*. International Journal of Medical Research & Health Sciences, 2015. **4**(1).
24. Rafiq, S., et al., *Study of Osmotic Fragility Status of Red Blood Cell in Type II Diabetes Mellitus Patients*. European Journal of Environment and Public Health, 2017. **1**(2).
25. Castro-Gamboá, S., et al., *Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: Implications for phenotype*. J Immunotoxicol, 2019. **16**(1): p. 54-62.
26. Hernández, A., et al., *Nanomedicine Approach for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers with Silver Nanoparticles*. Journal of Clinical and Medical Images, 2020.
27. Casillas-Figueroa, F., et al., *Argovit Silver Nanoparticles Effects on Allium cepa: Plant Growth Promotion without Cyto Genotoxic Damage*. Nanomaterials (Basel), 2020. **10**(7).
28. Juárez-Moreno, K., et al., *Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp Litopenaeus vannamei*. Chemosphere, 2017. **169**: p. 716-724.
29. Juárez-Moreno, K., et al., *Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines*. Hum Exp Toxicol, 2017. **36**(9): p. 931-948.
30. Valenzuela-Salas, L.M., et al., *Antiproliferative and Antitumour Effect of Nongenotoxic Silver Nanoparticles on Melanoma Models*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**: p. 1-12.
31. Castañeda-Yslas, I., et al., *Micronúcleos en reticulocitos de ratones Balb/c tratados de forma oral con nanopartículas de plata*. Revista de Ciencias Tecnológicas, 2018. **1**: p. 65-68.
32. Stephano-Hornedo, J.L., et al., *Argovit™ silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (Citrus aurantifolia Swingle)*. RSC Advances, 2020. **10**(11): p. 6146-6155.
33. Borrego, B., et al., *Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo*. Nanomedicine, 2016. **12**(5): p. 1185-92.
34. Spinoso-Castillo, J.L., et al., *Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2017. **129**(2): p. 195-207.
35. Bello-Bello, J.J., et al., *Hormetic Response by Silver Nanoparticles on In Vitro Multiplication of Sugarcane (Saccharum spp. Cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System*. Dose Response, 2017. **15**(4): p. 1559325817744945.
36. Arriola, Y., et al., *Effect on antimicrobial activity of antifungal agents-silver nanoparticles combined treatments*. Revista de Ciencias Tecnológicas, 2018. **1**: p. 69-71.
37. Vazquez-Munoz, R., et al., *Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter?* Toxicol Lett, 2017. **276**: p. 11-20.
38. Bogdanchikova, N., et al., *Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs*. International Journal of Nanotechnology, 2016. **13**: p. 227.
39. Bello-Bello, J.J., et al., *Cytotoxic, Genotoxic, and Polymorphism Effects on Vanilla planifolia Jacks ex Andrews after Long-Term Exposure to Argovit((R)) Silver Nanoparticles*. Nanomaterials (Basel), 2018. **8**(10).
40. Bravo-Guerra, C., et al., *Lethal effects of silver nanoparticles on Perkinsus marinus, a protozoan oyster parasite*. Journal of Invertebrate Pathology, 2020. **169**.

41. Romo-Quinonez, C.R., et al., *Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp Litopenaeus vannamei against White Spot Syndrome Virus infection*. PeerJ, 2020. **8**: p. e8446.
42. Vazquez-Munoz, R., et al., *Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane*. PLoS One, 2019. **14**(11): p. e0224904.
43. Weed, R.I., C.F. Reed, and G. Berg, *IS HEMOGLOBIN AN ESSENTIAL STRUCTURAL COMPONENT OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES?* The Journal of Clinical Investigation, 1963. **42**(4): p. 581-588.
44. Buehler, P.W., R. Humar, and D.J. Schaer, *Haptoglobin Therapeutics and Compartmentalization of Cell-Free Hemoglobin Toxicity*. Trends Mol Med, 2020. **26**(7): p. 683-697.
45. Evans, B.C., et al., *Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs*. J Vis Exp, 2013(73): p. e50166.
46. International Diabetes Federation. *What is diabetes*. 2020, march 26; Available from: <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes.html>.
47. American Diabetes, A., *2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020*. Diabetes Care, 2020. **43**(Suppl 1): p. S14-S31.
48. Lin, X., et al., *Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 14790.
49. Piette, J. and E. Kerr, *The Impact of Comorbid Chronic Conditions on Diabetes Care*. Diabetes care, 2006. **29**: p. 725-31.
50. Jitraknatee, J., C. Ruengorn, and S. Nochaiwong, *Prevalence and Risk Factors of Chronic Kidney Disease among Type 2 Diabetes Patients: A Cross-Sectional Study in Primary Care Practice*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 6205.
51. Thomas, M., et al., *Unrecognized Anemia in Patients with Diabetes: A Cross-Sectional Survey*. Diabetes care, 2003. **26**: p. 1164-9.
52. Tokumasu, F., et al., *Modifications in erythrocyte membrane zeta potential by Plasmodium falciparum infection*. Exp Parasitol, 2012. **131**(2): p. 245-51.
53. Gaikwad, S., M. Karemore, and J. Avari, *Alterations in Zeta Potential and Osmotic Fragility of Red Blood Cells in Hyperglycemic Conditions*. UK Journal of Pharmaceutical Biosciences, 2018. **6**: p. 25.
54. M, S.A., et al., *Impact of Diabetes Mellitus on Human Erythrocytes: Atomic Force Microscopy and Spectral Investigations*. Int J Environ Res Public Health, 2018. **15**(11).
55. Ambad, R.S. and R. Jha, *CORRELATION OF PLASMA SUGAR, HBA1C AND REACTIVE OXYGEN SPECIES IN TYPE- II DM*. Innovative Journal of Medical and Health Science, 2020. **10**.
56. Calderon-Salinas, J.V., et al., *Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease*. Mol Cell Biochem, 2011. **357**(1-2): p. 171-9.
57. Castegna, A., et al., *Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: implications for Alzheimer's disease*. Brain Res, 2004. **1004**(1-2): p. 193-7.
58. Murakami, K., et al., *Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus*. Metabolism, 1989. **38**(8): p. 753-758.
59. Gabreanu, G.R. and S. Angelescu, *Erythrocyte membrane in type 2 diabetes mellitus*. Discoveries (Craiova), 2016. **4**(2): p. e60.
60. Viskupicova, J., et al., *Effect of high glucose concentrations on human erythrocytes in vitro*. Redox Biol, 2015. **5**: p. 381-387.
61. Alamri, B., et al., *Hyperglycemia effect on red blood cells indices*. European review for medical and pharmacological sciences, 2019. **23**: p. 2139-2150.

62. Desouky, O., *Rheological and electrical behavior of erythrocytes in patients with diabetes mellitus*. August ROMANIAN J. BIOPHYS, 2009. **19**: p. 239-250.
63. Nordberg, M., Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M and Friberg LT (Eds.) (2007) *Handbook on the Toxicology of Metals, 3rd edition*, Elsevier 1-992. 2007.
64. Huang, H., et al., *An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25518.
65. Chi, Z., et al., *In vitro assessment of the toxicity of small silver nanoparticles and silver ions to the red blood cells*. Environ Sci Pollut Res Int, 2018. **25**(32): p. 32373-32380.
66. Sen, I.K., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using glucan from mushroom and study of antibacterial activity*. Int J Biol Macromol, 2013. **62**: p. 439-49.
67. Halbandge, S.D., S.P. Mortale, and S.M. Karuppaiyil, *Biofabricated Silver Nanoparticles Synergistically Activate Amphotericin B Against Mature Biofilm Forms of Candida Albicans*. The Open Nanomedicine Journal, 2017. **4**(1): p. 1-16.
68. Qasim Nasar, M., et al., *Seripheidium quettense mediated green synthesis of biogenic silver nanoparticles and their theranostic applications*. Green Chemistry Letters and Reviews, 2019. **12**(3): p. 310-322.
69. Laloy, J., et al., *Impact of Silver Nanoparticles on Haemolysis, Platelet Function and Coagulation*. Nanobiomedicine (Rij), 2014. **1**: p. 4.
70. Hamouda, R.A., et al., *Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium Oscillatoria limnetica*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 13071.
71. Katva, S., et al., *Antibacterial Synergy of Silver Nanoparticles with Gentamicin and Chloramphenicol against Enterococcus faecalis*. Pharmacogn Mag, 2018. **13**(Suppl 4): p. S828-S833.
72. Hossain, M.M., et al., *Investigation of the Antibacterial Activity and in vivo Cytotoxicity of Biogenic Silver Nanoparticles as Potent Therapeutics*. Front Bioeng Biotechnol, 2019. **7**: p. 239.
73. Shah, A., et al., *Daphne mucronata-mediated phytosynthesis of silver nanoparticles and their novel biological applications, compatibility and toxicity studies*. Green Chemistry Letters and Reviews, 2018. **11**(3): p. 318-333.
74. Parthiban, E., et al., *Green synthesis of silver-nanoparticles from Annona reticulata leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens*. Biotechnol Rep (Amst), 2019. **21**: p. e00297.
75. Asharani, P.V., et al., *Investigations on the Structural Damage in Human Erythrocytes Exposed to Silver, Gold, and Platinum Nanoparticles*. Advanced Functional Materials, 2010. **20**(8): p. 1233-1242.
76. Siritongsuk, P., et al., *Two-Phase Bactericidal Mechanism of Silver Nanoparticles against Burkholderia pseudomallei*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0168098.
77. Bian, Y., et al., *Silver nanoparticles promote procoagulant activity of red blood cells: a potential risk of thrombosis in susceptible population*. Part Fibre Toxicol, 2019. **16**(1): p. 9.
78. Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI). *Pruebas de toxicología-pruebas de hemocompatibilidad*. 2020, November 12; Available from: <https://www.ivami.com/es/evaluacion-biologica-de-dispositivos-medicos/2075-pruebas-de-toxicologia-ha-pruebas-de-hemocompatibilidad-une-en-iso-10993-4-evaluacion-biologica-de-dispositivos-medicos-parte-4-seleccion-de-los-ensayos-para-las-interacciones-con-la-sangre-biological-evaluation-of-medica-devices-part-4>.
79. Howe, P., et al., *Silver and Silver Compounds: Environmental Aspects*. 2002: World Health Organization.
80. Cameron, S.J., F. Hosseinian, and W.G. Willmore, *A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(7).

81. Nallanthighal, S., et al., *Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model*. *NanoImpact*, 2017. **5**: p. 92-100.
82. Sopjani, M., et al., *Silver ion-induced suicidal erythrocyte death*. *J Appl Toxicol*, 2009. **29**(6): p. 531-6.
83. Quigg, A., et al., *Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(7).
84. Akter, M., et al., *A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives*. *J Adv Res*, 2018. **9**: p. 1-16.
85. Kyrychenko, A., et al., *Atomistic Simulations of Coating of Silver Nanoparticles with Poly(vinylpyrrolidone) Oligomers: Effect of Oligomer Chain Length*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2015. **119**(14): p. 7888-7899.
86. Sharma, R. and s. Sharma, *Physiology, Blood Volume*. 2018.

## 9. Anexos

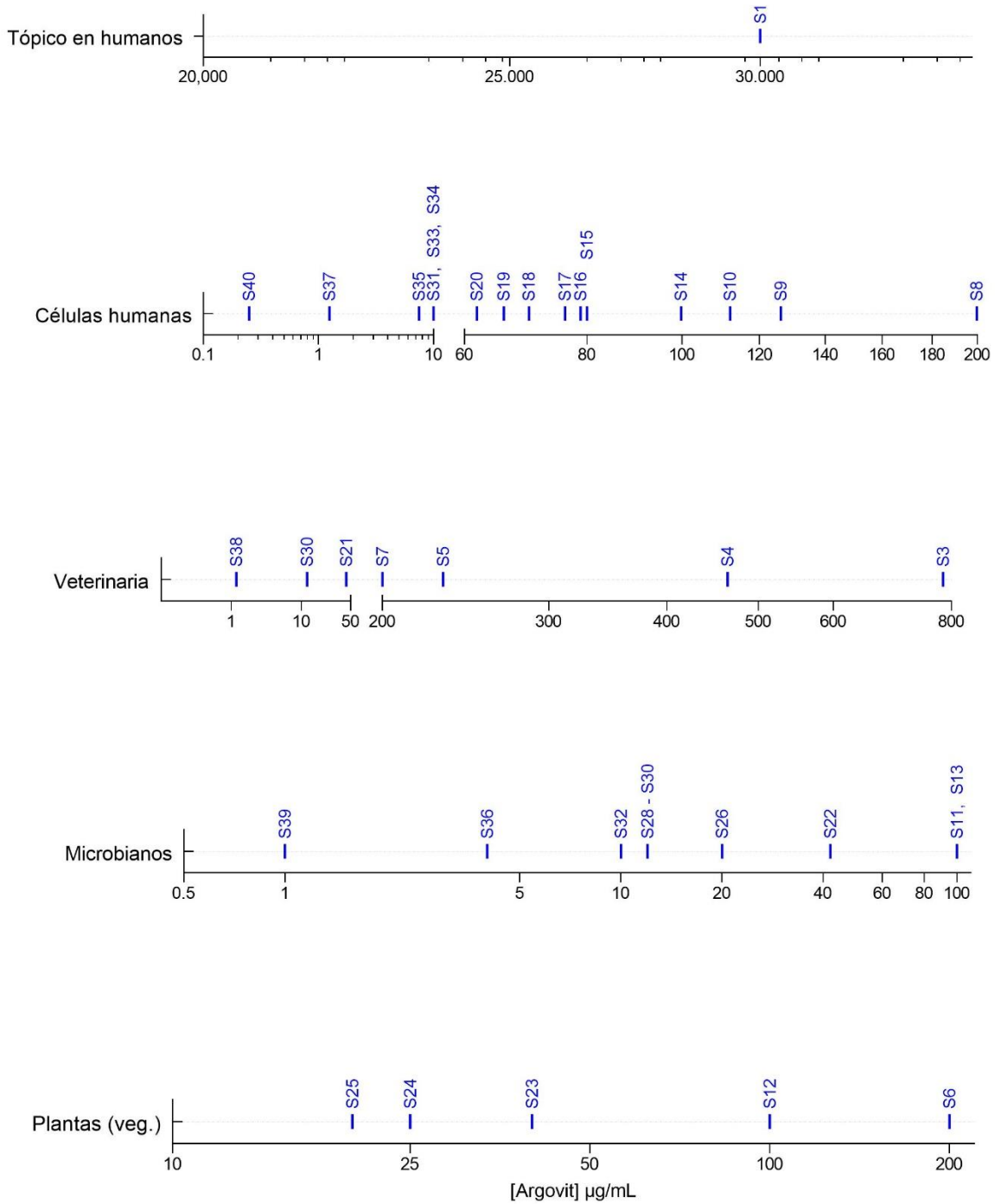


Fig. anexa 1. Bioefectos estudiados para AgNPs Argovit. Cada gráfico representa estudios llevados a cabo en modelos biológicos similares (ver Tabla anexa 1). Tópico humano; S1. Células humanas; S8, S9, S10, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S31, S33, S34, S35, S37 y S40. Veterinaria; S3, S4, S5,

S7, S21, S27, S30 y S38. Microbianos; S11, S13, S22, S26, S28, S29, S30, S32, S36 y S39. Plantas; S2, S6, S12, S23, S24 y S25. Se muestra la concentración a la que se encontró el bioefecto.

Tabla anexa 2. Detalles de los estudios con Argovit presentados en la Fig. 1 y en la Fig. anexa 1.

Número del estudio	Investigación	Modelo biológico	Tipo de estudio	Efecto	Referencia
S1	Úlcera de pie diabético	Pie humano	<i>in vivo</i>	Curación de úlcera	[19], [20], [21]
S2	Genotóxico ( <i>Allium cepa</i> )	<i>Allium cepa</i>	<i>in vivo</i>	Genotoxicidad	[27]
S3	Antiviral WSSV	Camarón (inyección)	<i>in vitro</i>	Curación de mancha blanca	[28]
S4	Anti-melanoma	Melanoma B16-F10 en ratones C57BL/6JNHsd	<i>in vivo</i>	Antitumoral, antiproliferativo	[30]
S0	Citotoxicidad (hemólisis)	Eritrocitos humanos	<i>in vitro</i>	Concentración hemolítica	Este trabajo
S5	No genotoxicidad	Reticulocitos en ratones Balb-c	<i>in vivo</i>	genotoxicidad	[31]
S6	Anti-Huanglongbing	Árboles de limón mexicano <i>C. aurantifolia Swingle</i>	<i>in vivo</i>	Cura contra Huanglongbing (foliar)	[32]
S7	Antiinfectivo RVFV	Células Vero	<i>in vivo</i>	Concentración antiinfectiva	[33]
S8	Genotóxico (linfocitos humanos)	Linfocitos humanos	<i>in vitro</i>	Genotoxicidad	[5]
S9	Anticáncer DU-145	Líneas celulares de cáncer	<i>in vitro</i>	Anticáncer	[29]
S10	Anticáncer MDA-MB -231	Líneas celulares de cáncer	<i>in vitro</i>	Anticáncer	[29]
S11	Antimicrobiano	<i>Vanilla plantifolia</i>	<i>in vitro</i>	Hormético antimicrobiano	[34]
S12	Multiplicación de brotes	Caña de azúcar	<i>in vivo</i>	Respuesta hormética	[35]
S13	Sinergia con antibióticos	<i>Candida albicans</i> (ATCC SC5614)	<i>in vitro</i>	Sinergia con anfotericina B	[36]
S14	Anticáncer H1437	Líneas celulares de cáncer	<i>in vitro</i>	Anticáncer	[29]

S15	Viabilidad de células Vero	Células Vero	<i>in vitro</i>	viabilidad	[37]
S16	Anticáncer HeLa	Línea celular de cáncer	<i>in vitro</i>	Anticáncer	[29]
S17	Anticáncer MCF7	Línea celular de cáncer	<i>in vitro</i>	Anticáncer	[29]
S18	Anticáncer DLD-1	Línea celular de cáncer	<i>in vitro</i>	Anticáncer	[29]
S19	Anticáncer HT-29	Línea celular de cáncer	<i>in vitro</i>	Anticáncer	[29]
S20	Anticáncer H1299	Línea celular de cáncer	<i>in vitro</i>	Anticáncer	[29]
S21	Anti-Distemper (moquillo)	perros	<i>in vivo</i>	Antiviral, anti-Distemper	[38]
S22	Anti- <i>C. albicans</i>	Cultivo microbiano	<i>in vitro</i>	MIC	[37]
S23	Anti-Huanglongbing	Árboles de limón mexicano <i>C. aurantifolia Swingle</i>	<i>in vivo</i>	Cura contra Huanglongbing (Quikjet)	[32]
S24	Citotoxicidad ( <i>Vanilla planifolia</i> )	<i>Vanilla planifolia</i>	<i>in vivo</i>	Citotóxico, genotóxico y polimorfismo	[39]
S25	Anti-Huanglongbing	Árboles de limón mexicano <i>C. aurantifolia Swingle</i>	<i>in vivo</i>	Cura contra Huanglongbing (Xyllakill)	[32]
S26	Anti- <i>F. oxysporum</i>	Cultivo microbiano	<i>in vitro</i>	MIC	[37]
S27	Citotoxicidad en Médula ósea de ratón	Células de médula ósea de ratón	<i>in vivo</i>	Citotoxicidad	[25]
S28	Anti- <i>S. aureus</i>	Cultivo microbiano	<i>in vitro</i>	MIC	[37]
S29	Anti- <i>E. coli</i>	Cultivo microbiano	<i>in vitro</i>	MIC	[37]
S30	Anti-Viral RVFV	Cultivo	<i>in vitro</i>	Antiviral	[33]
S31	MDA-MB-231 LD100	Células humanas de cáncer de mama	<i>in vitro</i>	LD100	[29]
S32	Antiparasítico	<i>Perkinsus marinus</i>	<i>in vitro</i>	Antiparasítico	[40]
S33	Viabilidad celular	Células HeLa	<i>in vitro</i>	LD100	[37]
S34	Viabilidad de células dendríticas	Células dendríticas murinas	<i>in vitro</i>	LD100	[37]
S35	Viabilidad celular	Células Vero	<i>in vitro</i>	LD90	[37]

S36	Anti- <i>Rhodomonas</i> sp.	Cultivo microbiano	<i>in vitro</i>	MIC	[37]
S37	Viabilidad HeLa 24 hrs.	Células HeLa	<i>in vitro</i>	Viabilidad 24 hrs.	[29]
S38	Antiviral WSSV	Camarón (alimento)	<i>in vitro</i>	Antiviral	[41]
S39	Antifúngico y sinergia	Cultivo microbiano	<i>in vitro</i>	Sinergia con la actividad antimicrobiana	[42]
S40	Viabilidad celular 24 hrs MDA-MB -231	Células de cáncer de mama	<i>in vitro</i>	LD100	[29]

### Lista de abreviaturas

%Hem.=%H: porcentaje de hemólisis

Ac (-)ind: absorbancia del control negativo individual

Ac (+): absorbancia del control positivo

Ac(-): absorbancia del control negativo general

AgNP: nanopartículas de plata

ALM: recubrimiento de almidón en la nanopartícula

Ap: absorbancia de la muestra

ASTM: American Society for Testing and Materials. Sociedad Americana para Pruebas y Materiales

BIO: recubrimiento biogénico de nanopartículas

c (-)ind: control negativo individual

c (+): control positivo

c(-): control negativo general

CIT: recubrimiento de citrato en la nanopartícula

COVID-19: enfermedad del coronavirus de 2019

DLD-1: línea celular de cáncer

DU-145: línea celular de cáncer

EDD: eritrocitos de donante diabético

EDS: eritrocitos de donante sano

ENAC: Entidad Nacional de Acreditación en España del Parlamento Europeo

EPA: Environmental Protection Agency. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.

GR: glóbulo rojo o eritrocito

H1299: línea celular de cáncer

H1437: línea celular de cáncer

Hb: hemoglobina

HC50: concentración de antimicrobiano que hemoliza al 50% de los glóbulos rojos

HCT-116: línea celular de cáncer de colon

HeLa: línea celular de cáncer

HT-29: línea celular de cáncer

IVAMI: Instituto Valenciano de Microbiología

LD100: dosis letal a la que muere el 100% de los sujetos probados

LD50: dosis letal a la que muere el 50% de sujetos probados

LD90: dosis letal a la que muere el 90% de los sujetos probados

LOAEL: el nivel más bajo de efecto adverso observado

LOEC: concentración más baja para un efecto observado

MCF: línea celular de cáncer de mama

MCF7: línea celular de cáncer

MDA-MB -231: línea celular de cáncer

MDA-MB-231: línea celular de cáncer

MIC: concentración mínima inhibitoria

NOAEL: nivel de efecto adverso no observado

NOEC: concentración a la que no se observa efecto de un agente probado

NP: nanopartícula

NP-0: formulación o nanopartículas de Argovit

NP-X: nanopartícula con el número X asignado en este trabajo

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Phosphate-Buffered Saline. Solución Salina amortiguada con fosfatos

PVA: recubrimiento de alcohol polivinílico de una nanopartícula

PVP: recubrimiento de polivinilpirrolidona

RfD: dosis de referencia se acuerdo a la EPA

RVFV: virus de la fiebre del Valle del Rift

S#: estudio o investigación realizada con Argovit™ con el número (#) asignado en este trabajo

SARS-CoV2: virus causante de la COVID-19. Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo y severo

SCCS: Comité Científico para la Seguridad del Consumidor de la Unión Europea

SSF: solución salina fisiológica

TEM: microscopía de transmisión electrónica

WSSV: virus del síndrome de la mancha blanca en camarones