



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO DE LA TOXICIDAD SUB-CRÓNICA DE LA NANO
PLATA EN RATAS WISTAR”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

BOLÍVAR SAÚL OCAÑA PALACIOS

RIOBAMBA – ECUADOR

2009

DEDICATORIA

*A Dios, fuente de amor por guiar
e iluminar mi vida.*

*A mis padres y hermanos, con todo
cariño, por apoyarme tanto moral
y económicamente, sin cuya ayuda
no hubiese logrado culminar una
de mis metas.*

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Al Dr. Francisco Portero por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis

A la Dra. Lourdes Cuadrado y Dr. Oswaldo Duque Miembros del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Edmundo Caluña
DECANO FAC. CIENCIAS

.....

.....

Dr. Luis Guevara
**DIRECTOR ESCUELA (E)
BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

.....

.....

Dr. Francisco Portero
DIRECTOR DE TESIS

.....

....._

Dra. Lourdes Cuadrado
MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

Dr. Oswaldo Duque
MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

Sr. Carlos Rodríguez
**DIRECTOR DEL CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN**

.....

.....

NOTA DE TESIS ESCRITA

.....

Yo, Bolívar Saúl Ocaña Palacios, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

BOLÍVAR SAÚL OCAÑA PALACIOS

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una ciencia que produce y manipula la materia en la escala de los átomos y las moléculas, donde el tamaño se mide en nanómetros. Un nano material que está teniendo un impacto temprano en productos del Healthcare es nano plata (1).

Los estudios de nano plata que se están realizando en beneficio de la salud no tienen un sustento científico que garantice la seguridad en el uso de este producto. Los testimonios, informes de eventos particulares y las experiencias personales no son pruebas suficientes que garanticen su uso, existiendo el riesgo de efectos secundarios indeseables cuando se utiliza un medicamento y peor aun medicamentos provenientes de otro tipo de formulación como lo es nano plata. Sin embargo, Lancet y The Environmental Protection Agency's Poison menciona no reportar toxicidad para el uso de las suspensiones de nano plata (52).

Por el contrario, existen varios investigadores que afirman que la plata a largo plazo y a altas concentraciones, tiende a acumularse en los órganos, piel y tejidos internos y puede producir argyria, una tonalidad grisácea o azulada de la piel que al ser expuesta a la luz solar intensa hace que la piel se oscurezca (51).

La plata se ha utilizado para el tratamiento de las dolencias médicas por más de 100 años debido a su propiedad antimicrobiana natural.

La introducción de un nuevo medicamento o aplicación de una nueva tecnología en su obtención, lleva implícito la realización de un conjunto de investigaciones previas que incluyen las relacionadas con aspectos de química farmacéutica, farmacología experimental (Farmacocinética y Farmacodinamia) y estudios toxicológicos, siendo estos últimos los que cumplen la finalidad de determinar la seguridad de su uso (7).

Debido a estos antecedentes se ha visto la necesidad de evaluar la toxicidad sub-crónica de nano plata en ratas Wistar para que esta opción terapéutica tenga un sustento científico sobre su inocuidad que nos servirán para evaluar el riesgo o peligro potencial que la nano plata puede ocasionar sobre la salud humana.

Los objetivos trazados en esta investigación son: Determinar los valores de los parámetros bioquímicos clínicos y hematológicos antes y después de la administración de nano plata e identificar posibles variaciones histopatológicas renal y hepática inducido por su administración.

Se planteó la hipótesis: La administración de 100 ppm de nano plata vía oral no causa toxicidad sub-crónica en ratas Wistar.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

\bar{X}	Media
μL	Microlitro
ALAT	Alanín-amino transferasa
ASAT	Aspartato amino transferasa
DL	Dosis letal
DL ₅₀	Dosis Letal 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dosis alta	Concentración de nano plata de 0.1 mg/kg/día
Dosis baja	Concentración de nano plata de 0.2 mg/kg/día
Dosis media	Concentración de nano plata de 0.4 mg/kg/día
EMEA	Agencia europea para la evaluación de productos medicinales
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
ETC Group	Grupo de acción sobre erosión, tecnología y concentración
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
GAMMA GT	Gamma-Glutamil Transferasa
GCP	Good Clinical Practice
h	Hora
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
ICH	Congreso Internacional de Armonización
IND	Nueva Droga de Investigación
ISO	International Organisation for Standardization
Kg	Kilogramo
L	Litro
mg	miligramo
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
NSF	Fundación Nacional para la Ciencia
°C	Grados Celsius
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París, Francia.
ppm	Partes por millón
s.c.	Subcutánea
SD	Desviación estándar

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO	1
1.1	Nanotecnología.....	1
1.1.1	Nanotecnología y nanomedicina.....	4
1.1.2	Fármacos a nanoescala.....	8
1.1.3	Plata, plata coloidal y nano plata.....	10
1.2	Nano plata.....	12
1.2.1	Características de la nano plata.....	12
1.2.2	Actividad antimicrobiana.....	13
1.2.3	Mecanismo de acción.....	13
1.2.4	Farmacocinética y farmacodinamia.....	14
1.2.5	Posibles efectos adversos.....	15
1.2.6	Nano plata y el medio ambiente.....	15
1.3	Desarrollo de nuevos medicamentos.....	16
1.3.1	Fases para el desarrollo de nuevos medicamentos.....	17
1.3.1.1	Estudios pre-clínicos.....	17
1.3.1.2	Estudios clínicos.....	18
1.3.1.2.1	Estudios clínicos Fase I.....	18
1.3.1.2.2	Estudios clínicos Fase II.....	19
1.3.1.2.3	Estudios clínicos Fase III.....	19
1.3.1.2.4	Estudios clínicos Fase IV.....	20
1.4	Toxicidad.....	20
1.4.1	Definición.....	21
1.4.2	Clasificación de los tóxicos.....	22
1.4.2.1	En función de su naturaleza.....	22
1.4.2.2	Según los usos y aplicaciones del tóxico.....	23
1.4.2.3	En función de la vía de entrada.....	23
1.4.3	Factores implicados en la toxicidad.....	24
1.4.3.1	Carácter tóxico del agente xenobiótico.....	24
1.4.3.2	Sistema biológico.....	24

1.4.3.3	Vía o ruta de absorción.....	25
1.4.3.4	Tiempo de interacción del agente tóxico.....	26
1.4.3.5	Excreción del agente tóxico.....	27
1.4.4	Estudios de toxicidad.....	27
1.4.4.1	Toxicidad aguda.....	27
1.4.4.2	Toxicidad Sub-aguda.....	28
1.4.4.3	Toxicidad sub-crónica y crónica.....	29
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	30
2.1	Lugar de la investigación.....	30
2.2	Materiales, Equipos y Reactivos.....	30
2.2.1	Materiales.....	30
2.2.2	Equipos.....	31
2.2.3	Reactivos.....	31
2.3	Metodología.....	31
2.3.1	Sustancia de ensayo.....	31
2.3.2	Animales.....	32
2.3.3	Diseño experimental.....	32
2.3.4	Análisis estadístico.....	33
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.	CONCLUSIONES.....	45
5.	RECOMENDACIONES.....	46
6.	RESUMEN.....	47
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	49
8.	ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Media y desviación estándar ($\bar{X} \pm SD$) de peso corporal (g) de ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) tratadas durante 90 días con nano plata. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo-Septiembre 2008.....	34
CUADRO No. 2	Medias y desviaciones estándar ($\bar{X} \pm SD$) del peso corporal (g) de ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) tratadas con nano plata del (lote satélite). Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo-Octubre 2008.....	35
CUADRO No. 3	Medias y desviaciones estándar ($\bar{X} \pm SD$) de hematología y plaquetas de ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) tratadas durante 90 días con nano plata. Laboratorio de Análisis Clínico. Unidad Oncológica Provincial Solca Riobamba. Mayo-Septiembre 2008.....	36
CUADRO No. 4	Tukey (HSD) / análisis de las diferencias entre grupos. Parámetros hematológicos.....	36
CUADRO No. 5	Medias y desviaciones estándar ($\bar{X} \pm SD$) de hematología en ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) tratadas con nano plata (lote satélite). Laboratorio de Análisis Clínico. Unidad Oncológica Provincial Solca Riobamba. Mayo-Octubre 2008.....	38
CUADRO No. 6	Tukey (HSD) / análisis de las diferencias entre grupos Parámetros hematológicos.....	38
CUADRO No. 7	Medias y desviaciones estándar ($\bar{X} \pm SD$) de química sanguínea en ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) tratadas con nano plata durante 90 días. Laboratorio de Análisis Clínico. Unidad Oncológica Provincial Solca Riobamba. Mayo-Septiembre 2008.....	40
CUADRO No. 8	Tukey (HSD) / análisis de las diferencias entre grupo. Párametros de química sanguínea.....	41
CUADRO No. 9	Medias y desviación estándar ($\bar{X} \pm SD$ de química sanguínea en ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) tratadas con nano plata (lote satélite). Laboratorio de Análisis Clínico. Unidad Oncológica Provincial Solca Riobamba. Mayo-Septiembre 2008.....	42

CUADRO No. 10	Tukey (HSD) / análisis de las diferencias entre grupos. Parámetros de química sanguínea.....	43
CUADRO No. 11	Resultado histopatológico de ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) del estudio de toxicidad sub-crónica de nana plata. Laboratorio histopatológico Dr. Oswaldo Duque A. Riobamba. Noviembre 2008.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Multinacionales pioneras en investigación y desarrollo de nanotecnologías productivas en el mundo.....	2
TABLA No. 2	Drogas, productos médicos nanológicos aprobados por la FDA	9
TABLA No. 3	Clasificación de grados de toxicidad aguda.....	22

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Tamaño de algunas estructuras a escala nanométrica.....	1
GRÁFICO No. 2	Previsión del mercado nanotecnológico en diferentes áreas.....	3
GRÁFICO No. 3	Las nanopartículas transportan fármacos hasta las células diana.....	6
GRÁFICO No. 4	Simulación de respirocitos (izquierda) y fagocitos (derecha) navegando por el torrente sanguíneo.....	8
GRÁFICO No. 5	Proceso de desarrollo de medicamentos nuevos y principales actividades de la farmacoepidemiología en la Fase IV.....	17
GRÁFICO No. 6	Principales barreras biológicas que presenta el organismo humano como protección hacia los agentes físicos y químicos.....	25

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

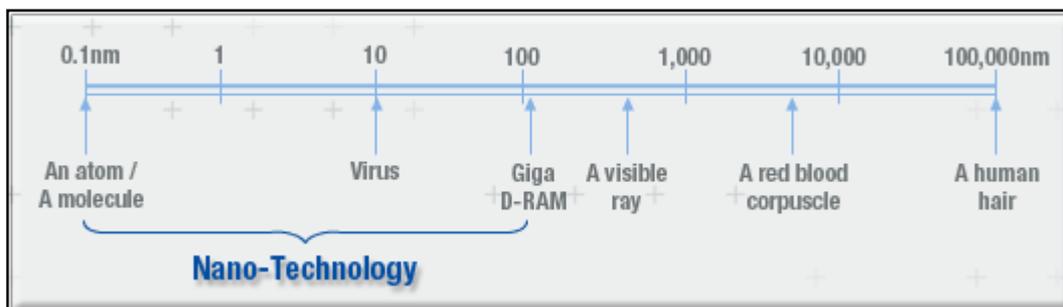
FOTOGRAFÍA No. 1	Ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) usado en el estudio de toxicidad sub-crónica de la suspensión de nano plata. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo-septiembre 2008.....	57
FOTOGRAFÍA No. 2	Material usado para extracción de muestras de sangre. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo-octubre 2008.....	58
FOTOGRAFÍA No. 3	Procedimiento para la obtención de muestra sanguínea. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo-octubre 2008.....	59
FOTOGRAFÍA No. 4	Material usado en la administración de nano plata. Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo-septiembre 2008.....	60
FOTOGRAFÍA No. 5	Inmovilización y administración de la suspensión de nano plata en ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>). Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Mayo-septiembre 2008.....	61
FOTOGRAFÍA No. 6	Diseción de ratas Wistar. (<i>Rattus norvegicus</i>) Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Octubre 2008.....	62
FOTOGRAFÍA No. 7	Extirpación de los órganos (riñón, hígado y estómago) de ratas Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>). Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. ESPOCH. Octubre 2008.....	63

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 NANOTECNOLOGÍA

El término nanotecnología se refiere a la manipulación de la materia en la escala de los átomos y las moléculas, donde el tamaño se mide en millonésimas de un milímetro. Un nanómetro equivale a la mil millonésima parte de un metro. En la escala nanométrica (entre uno y cien nanómetros), los materiales pueden exhibir muy diferentes propiedades que los mismos materiales de la misma composición pero de escala mayor. Propiedades tales como fuerza, conductividad, color y toxicidad pueden cambiar en la escala nanométrica y las propiedades pueden cambiar dentro de dicha escala también. Al explotar los cambios nanoescalares de dichas características, los investigadores intentan crear materiales novedosos que cuenten con mayor funcionalidad (18)(30)(45).



FUENTE: SAMSUNG ELECTRONICS Co., 2005

GRÁFICO No 1: TAMAÑO DE ALGUNAS ESTRUCTURAS A ESCALA NANOMÉTRICA

La nanotecnología es descrita por algunos como la “tecnología transformadora del siglo XXI”. Los expertos predicen que la nanotecnología revolucionará la manufactura en todos los sectores de la industria y eventualmente impactará la producción de virtualmente todos los objetos fabricados por humanos. La medicina es justamente un

sector que será profundamente influido por los materiales y dispositivos nanoescalares (18).

En 2005, Samsung Electronics aporta sus conocimientos sobre nanotecnología a su última generación de productos electrodomésticos, con la presentación de la Silver Nano Technology (Tecnología de nano plata). Esta novedosa aplicación de las nanoinvestigaciones incorpora un compuesto de plata al producto, diseñado para impedir la proliferación de bacterias (11).

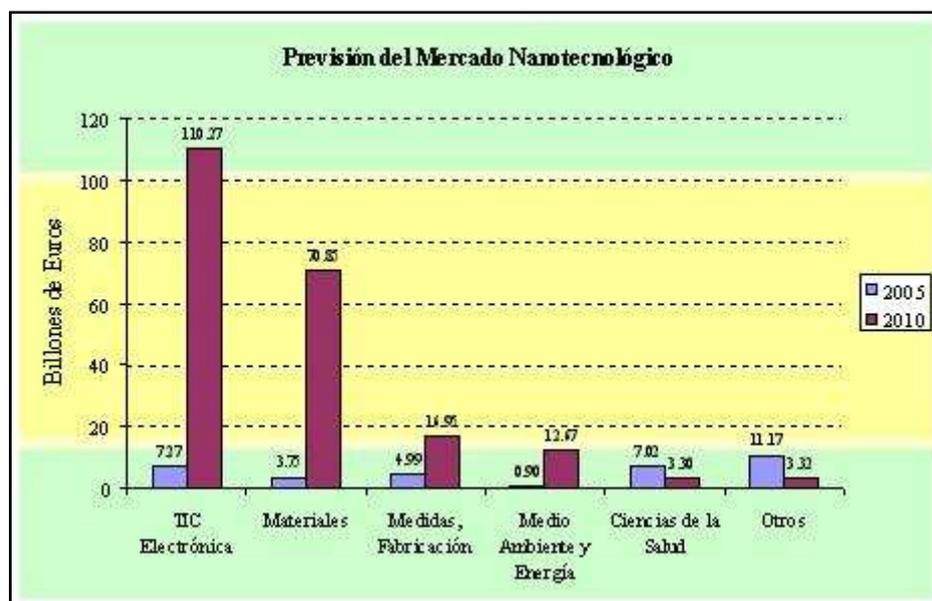
TABLA No 1: MULTINACIONALES PIONERAS EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE NANOTECNOLOGÍAS PRODUCTIVAS EN EL MUNDO.

SECTOR DE LA INDUSTRIA	MULTINACIONALES PIONERAS EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE NANOTECNOLOGÍAS
Computadores/electrónica	IBM, NEC, Fujitsu, Hitachi, Phillips, Hewlett Packard, Samsung, Motorola, Mitsubishi, General Electric, <u>Microsoft</u>
Alimentos	Kraft/Altria, Unilever, Nestle, Heinz, Sara Lee
Farmacéutica/cuidado salud	GlaxoSmithKline, Smith and Nephew, Merck
Producción/Almacenamiento de energía	BP, Exxon, Chevron/Texaco, Shell, Halliburton
Textiles/vestuario	Burlington Industries, Nike, Gap
Defensa/Aeroespacial	Sandia/Lockheed Martin, Boeing, Qinetiq, Raytheon
Cosméticos	L'Oreal, Body Shop, Boots
Químicos	DuPont, Degussa, Dow, Henkel, ICI
Automóviles	BMW, Renault, GM, Ford, Caterpillar
Agricultura	Syngenta, Monsanto, Bayer

FUENTE: CORPORATE WATCH, 2007.

En las primeras épocas de la nanotecnología (2001), la Fundación Nacional de Ciencia (NSF por sus siglas en inglés) de Estados Unidos predijo que la nanotecnología “ayudará a prolongar la vida, mejorar su calidad y expandir las capacidades físicas humanas”, y que para 2010 o 2015 la mitad de toda la producción farmacéutica -más de 180 mil millones de dólares por año- dependería de la nanotecnología. Más recientemente, Lux Research calculó que el mercado para los sistemas de suministro de medicamentos habilitados nanológicamente crecerá de 980 millones de dólares en 2005 a cerca de 8 600

millones en 2010. La terapéutica nanoscópica como la nano-plata para cubrir heridas representaba 28 millones de dólares en 2005 y alcanzará los 310 millones en 2010. El mercado para el diagnóstico habilitado con nanotecnología crecerá de 56 millones en 2005 a más de mil millones en 2010 (8)(12)(17)(49).



FUENTE: ETC GROUP, 2006

GRAFICO No 2: PREVISIÓN DEL MERCADO NANOTECNOLÓGICO EN DIFERENTES ÁREAS

La convergencia de las tecnologías de nano-escala se predice permitirán la creación de organismos artificiales totalmente nuevos, los cuales serán usados en el procesamiento de alimentos, agricultura y agro combustibles, así como en otras aplicaciones (20).

En 2005, se emprendió el proyecto ISO, el cual pretende respaldar las nanotecnologías y arrojar nuevos estándares internacionales de términos y definiciones relacionados con las nanopartículas. Su fin es promover y facilitar la comunicación entre las organizaciones vinculadas a esta ciencia (33).

En 2008, ISO/TS 27687:2008, “Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate” es la primera parte de una serie proyectada sobre documentos de definiciones y terminología que tratan los diversos aspectos de las nanotecnologías (33).

1.1.1 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

"El enfermo, el anciano y el herido sufren una desorganización de los átomos provocada por un virus, el paso del tiempo o un accidente de coche", escribía Eric Drexler en su obra *Engines of Creation* en 1986. "En el futuro habrá aparatos capaces de reorganizar los átomos y colocarlos en su lugar". Con estas palabras preconizaba la revolución que ha supuesto la aplicación de los conocimientos y las tecnologías del nanocosmos a la medicina. Hoy por hoy, la nanomedicina es ya una realidad que está produciendo avances en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de las enfermedades (18).

Investigadores del Instituto de Bionanotecnología de la Northwestern University, Illinois, EE.UU, han logrado regenerar tejido nervioso en ratones mediante la inyección de moléculas que se asocian para formar nanofibras al llegar a los nervios (32).

Científicos-investigadores japoneses de la Universidad de Sanidad e Higiene, han logrado desarrollar un tratamiento que es capaz de eliminar las células cancerígenas en tan solo diez días. El proceso parte con la ingesta de un fármaco perfeccionado con tecnología láser, al que le precede un nanotubo de carbono mejorando su rendimiento. La idea es que este nanotubo de carbono, sea de ayuda para el fármaco a llegar segura y eficazmente hasta las células infectadas (31).

La Fundación Europea de la Ciencia (European Science Foundation) define la nanomedicina como "la ciencia y la tecnología para diagnosticar, tratar y prevenir las enfermedades y las heridas traumáticas, para aliviar el dolor y para conservar y mejorar la salud humana utilizando los instrumentos moleculares, los conocimientos moleculares del cuerpo humano". A grandes rasgos, los institutos canadienses de investigación en salud definen la nanomedicina como la medición o intervención biomédica especializada a escala molecular- que se requiere para lidiar con las enfermedades o restaurar las funciones (18).

En la administración de medicamentos, las nuevas técnicas son ya un hecho. "Los nanosistemas de liberación de fármacos actúan como transportadores de fármacos a

través del organismo, aportando a estos una mayor estabilidad frente a la degradación, y facilitando su difusión a través de las barreras biológicas y, por lo tanto el acceso a las células diana", explica María José Alonso, investigadora de la Universidad de Santiago de Compostela, que trabaja en esta línea desde 1987. En el tratamiento del cáncer, asegura, "estos nanosistemas facilitan el acceso a las células tumorales y reducen la acumulación del fármaco en las células sanas y, por tanto, reducen los efectos tóxicos de los antitumorales" (18).

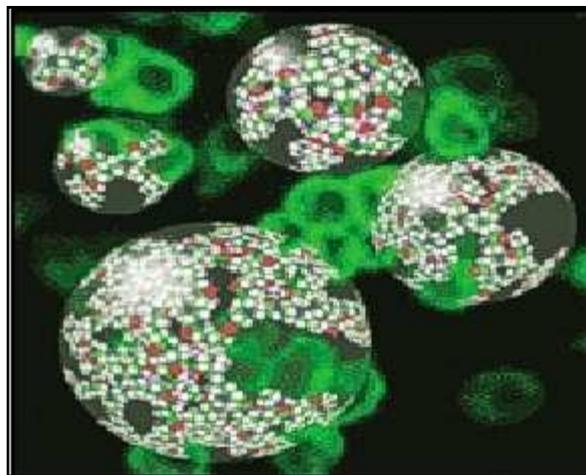
Las enfermedades infecciosas son otro de los grandes objetivos de la medicina actual. Por eso, la profesora Alonso y su equipo han desarrollado también nanopartículas que permiten administrar, en forma de simples gotas nasales, algunas vacunas que hasta ahora debían inyectarse. Su eficacia ha sido demostrada, hasta el momento, para las vacunas anti-tetánica y anti-diftérica. "Recientemente, hemos propuesto estas tecnologías al concurso de ideas promovido por la Fundación Bill & Melinda Gates para resolver los grandes problemas de salud del tercer mundo", añade la investigadora. "Nuestra idea para administrar de esta forma la vacuna de la Hepatitis B fue una de las seleccionadas de un total de 1 500 presentadas" (18).

No menos importante es la batalla que en estos momentos se libra en todo el mundo contra la diabetes, y en la que la nanotecnología tiene mucho que decir. Las nanopartículas desarrolladas por Alonso y su equipo están siendo utilizadas en experimentos en la clínica para estudiar su uso como vehículos para administrar insulina por vía oral, nasal o pulmonar. Por su parte, la doctora Tejal Desai, profesora de bioingeniería en Boston, ha creado un dispositivo que puede ser inyectado en el torrente sanguíneo y actuar como páncreas artificial, liberando insulina. La técnica desarrollada por esta investigadora consiste en encapsular células que producen la insulina en contenedores con paredes con nanoporos, que por su tamaño sólo pueden ser atravesados por moléculas como el oxígeno, la glucosa o la insulina. De esta forma, las paredes de la cápsula impiden que estas células productoras de insulina sean reconocidas como extrañas por los anticuerpos, mientras que los poros permiten la liberación de la insulina y la entrada de nutrientes como azúcares. La innovadora técnica tiene potencial para la

cura de otras enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson, por medio de la liberación de dopamina en el cerebro, o el Alzheimer (18).

Si las terapias están experimentando cambios drásticos, el diagnóstico no se queda atrás.

De la mano de la nanotecnología nos adentramos en la era del diagnóstico molecular, sofisticado y preciso, que hace posible identificar enfermedades genéticas, infecciosas o incluso pequeñas alteraciones de proteínas de forma precoz (18).



FUENTE: ETC GROUP, 2006

**GRÁFICO No 3: LAS NANOPARTÍCULAS TRANSPORTAN FÁRMACOS
HASTA LAS CÉLULAS DIANA**

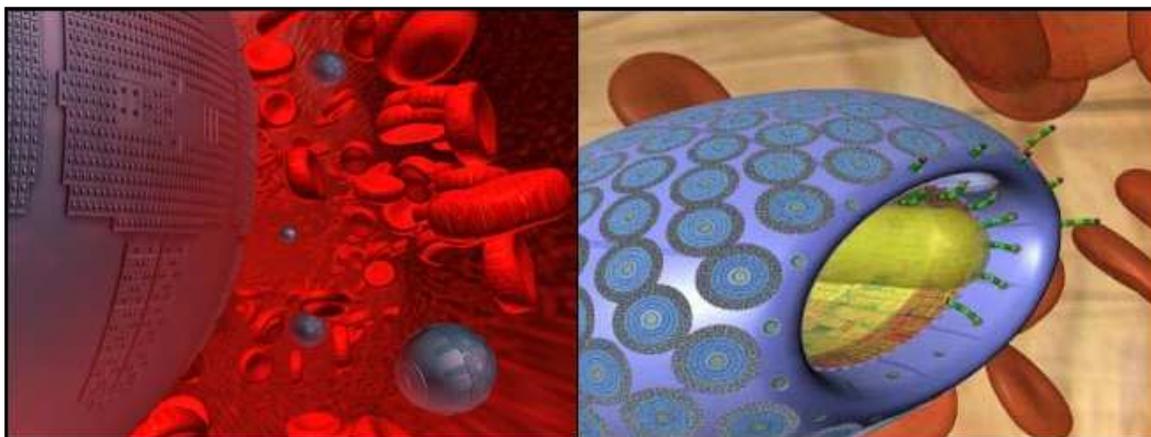
No en vano, esta disciplina ha contribuido a la creación de biochips, que permiten la obtención de grandes cantidades de información trabajando a una escala muy pequeña. Con los biochips a nanoescala es posible conseguir en poco tiempo abundante información genética, tanto del individuo como del agente patógeno; que permitirá elaborar vacunas, medir las resistencias de las cepas de la tuberculosis a los antibióticos o identificar las mutaciones que experimentan algunos genes y que desempeñan un papel destacado en ciertas enfermedades tumorales, como el gen p53 en los cánceres de colon y de mama (18).

El desarrollo de sensores a escala molecular parece no tener límites. Hace poco, un equipo de científicos de la Universidad de Harvard descubría que se pueden utilizar hilos ultrafinos de silicio para detectar la presencia de virus individuales, en tiempo real y con

una gran precisión. Charles M. Lieber, profesor de Química en Harvard y coautor del descubrimiento, asegura que las posibilidades de estos detectores, que pueden ser ordenados en matrices capaces de detectar literalmente miles de virus diferentes, "podrían introducirnos en una nueva era en materia de diagnósticos, seguridad biológica y respuestas a brotes víricos". En el ambiente clínico, la extremada sensibilidad de las matrices de nanohilos permitiría detectar infecciones virales en sus primeros estadios, cuando el sistema inmunológico aún es incapaz de actuar (18)

Más lejos quedan, de momento, las máquinas moleculares de reparación que viajarán a través del torrente sanguíneo, con capacidad de actuar sobre el DNA (enfermedades genéticas), modificar proteínas o incluso destruir células completas, en el caso de tumores. Sin embargo, algunos expertos se han atrevido ya a adelantar cómo serán esos futuros nano-robots (18).

Es el caso de Robert Freitas, investigador del Instituto de Fabricación Molecular de California, que ha creado una especie de glóbulo rojo artificial bautizado como respirocito. Con una sola micra de diámetro, este robot esférico imita la acción de la hemoglobina natural que se encuentra en el interior de los hematíes, aunque con la capacidad de liberar hasta 236 veces más oxígeno por unidad de volumen que un glóbulo rojo natural. Los respirocitos incorporarán sensores químicos, así como sensores de presión. De esta forma estarán preparados para recibir señales acústicas del médico, que utilizará un aparato transmisor de ultrasonidos para darles órdenes con el fin de que modifiquen su comportamiento mientras están en el interior del cuerpo del paciente (18).



FUENTE: ETC GROUP, 2006

GRÁFICO 4: SIMULACIÓN DE RESPIROCITOS (IZQUIERDA) Y FAGOCITOS (DERECHA) NAVEGANDO POR EL TORRENTE SANGUÍNEO

1.1.2 FÁRMACOS A NANOESCALA

La nanotecnología ya cambió el modo de formular algunos medicamentos y, en ciertos casos, reformularlos. Cuando un compuesto farmacéutico es formulado como nanopartícula, aumenta su nivel de disponibilidad biológica. En otras palabras, el cuerpo puede absorber un compuesto, así formulado, más pronto y fácil -y como tal utilizarlo más eficazmente- si el compuesto existe en una escala más cercana a la escala en que ocurren los procesos biológicos. El nivel de disponibilidad biológica de una droga es uno de los elementos importantes para determinar su eficacia. Una firma de investigación de mercados calcula que 65 mil millones de dólares de los ingresos anuales procedentes del mercado de medicamentos (casi 16 % de las ventas totales de la industria farmacéutica) provienen de fármacos que cuentan con poca disponibilidad biológica, lo que propicia más altos costos para los pacientes, tratamientos ineficaces y un mayor riesgo de toxicidad (23).

Elan Corporation, con sede en Dublín, Irlanda, ha desarrollado un proceso patentado para “moler” compuestos farmacéuticos y producir pequeñas partículas (comúnmente menores a 100 nm) que cuentan con una biodisponibilidad mayor y tasas de absorción más veloces, según informes de la propia compañía (12). Elan afirma también que las drogas nanológicas recién formuladas eliminan la “variabilidad ayuno/saciedad” es decir, que importa menos si la droga se toma junto con los alimentos. Las grandes compañías

farmacéuticas como Wyeth, Merck y Abbot ya le entregaron sus compuestos patentados a Elan para que los “muela”. En la mayor parte de los casos, las drogas ya contaban con la aprobación de la FDA estadounidense en sus formulaciones de mayor tamaño, y mientras las compañías puedan demostrar su “bioequivalencia” (5), la nueva versión nano-lógica no es sometida a un más escrutinios regulatorios, como lo sería si se pidieran más pruebas clínicas (38).

TABLA No 2: DROGAS, PRODUCTOS MÉDICOS NANOLÓGICOS APROBADOS POR LA FDA.

Producto/fabricante	Aprobación de la FDA	Propósito
<i>Abraxane</i> American BioScience, Inc	Enero de 2005	Nano-partículas que contienen <i>paclitaxel</i> , que aumenta la cantidad de droga anticancerosa disponible, para matar células cancerígenas en mama
<i>Doxil</i> Ortho Biotech Products (el sistema de suministro basado en liposomas desarrollado por ALZA)	1999	Sistema de suministro de nano-partículas basado en liposomas recubiertos con polímeros, conocido como “Stealth” [“el furtivo”]. <i>Doxil</i> es el primer producto que incorpora esta tecnología para el tratamiento de cáncer en ovarios.
<i>Emend</i> Merck. Tecnología bajo licencia de Elan	Aprobado	Versión nano-particulada del medicamento <i>Aprepitant</i> , un antiemético, utilizado para prevenir la náusea en los pacientes de cáncer que reciben quimioterapia
<i>Rapamune</i> Wyeth. Tecnología bajo licencia de Elan	2000	Formulación nano-particulada de Sirolimus (<i>Rapamune</i>) para prevenir el rechazo en pacientes que reciben transplantes de órganos.
<i>Silcryst</i> Nucrust Pharmaceuticals/ producto distribuido por Smith&Nephew como <i>Asticoat</i>	Disponible comercialmente desde 1998. La FDA lo aprobó para su uso sin prescripción en 2001.	Plata nano-cristalina incorporada en los recubrimientos de las heridas por sus propiedades antimicrobianas.
<i>SilvaGard</i> AcryMed, Inc.	Diciembre de 2005	Catéter recubierto con nano-partículas antimicrobianas de plata para el uso interno en el cuerpo.
<i>TriCor</i> Abbott Laboratories tecnología bajo licencia de Elan	FDA lo aprobó en noviembre de 2004	Formulación nano-particulada del <i>TriCor</i> (una droga para tratar el colesterol alto).
<i>Verigene</i> Nanosphere, Inc.	Pendiente de aprobación (a mediados de 2006)	Plataforma <i>In vitro</i> para probar muestras de sangre o saliva en la detección de ácidos nucleicos y proteínas que tengan concentraciones extremadamente bajas.

FUENTE: ETC GROUP, 2006

Las farmacéuticas confían en sus formulaciones nanoparticuladas para mejorar el valor terapéutico de drogas de bajo desempeño, pero también buscan mejorar sus ganancias. Es

posible que viejos medicamentos, que ya no están en el mercado por su baja eficacia o por sus efectos colaterales potencialmente adversos en ciertas poblaciones de pacientes, puedan hacerse más eficaces o más seguros si se reformulan nanoscópicamente, lo que reduciría significativamente el costo del proceso de desarrollo de medicamentos. Las compañías farmacéuticas ya sacan ventaja de la expansión de la protección de sus patentes, algo que es posible mediante sus formulaciones nano-particuladas (25). Incluso en los casos en que no pueda demostrarse una bioequivalencia entre un medicamento y su contraparte nanoescalar y se hagan necesarias más pruebas clínicas, existe en Estados Unidos una ventaja estratégica: al poseionario de una patente se le concede un periodo de tres o cinco años de “exclusividad sin patente”, mientras se somete el medicamento a nuevos ensayos clínicos. Este periodo es independiente de los derechos de patente y beneficia a las grandes farmacéuticas porque mantiene a raya a las compañías que producen medicamentos genéricos más baratos (23).

1.1.3 PLATA, PLATA COLOIDAL Y NANO PLATA

La plata estaba en uso común hasta 1938. Muchos recuerdan a sus abuelos poner monedas de plata en leche, para prolongar su frescura a temperatura ambiente, así como introducir medallas de plata en los tanques de agua de consumo, para evitar infecciones (2).

En 1869, Raulin registró la primera descripción del efecto de limpiamiento del agua por la plata, él observó que el *aspergillus niger* no podría crecer en recipientes de plata (29).

Al final del siglo, los científicos habían descubierto que los líquidos más importantes del cuerpo son coloidales en naturaleza. Esto condujo a los estudios con plata coloidal y su variación y más eficiente nano plata. Antes de 1938, la plata coloidal fue utilizada por los médicos como tratamiento antibiótico de uso corriente y considerado absolutamente “de alta tecnología”. Los métodos de producción, sin embargo, eran costosos. La industria farmacéutica introdujo, haciendo que la investigación sobre coloides fuera puesta a un lado, en favor de drogas financieramente lucrativas (2).

Desde 1884 se utilizó el nitrato de plata al 1% en los ojos de niños recién nacidos eliminando las enfermedades que causaban ceguera. Han demostrado ser efectivas contra las verrugas. Los iones de plata han sido utilizados para tratar cistitis e infecciones del tracto urinario en niños. Un compuesto de plata conocido como sulfadiazina de plata se usa actualmente en el 70% de todos los centros para quemados en los Estados Unidos (47).

La Administración de Alimentos y de Drogas (FDA) clasifica hoy a la plata coloidal como droga pre-1938. Una carta del FDA fechada en Septiembre 13 de 1991, menciona: “Estos productos pueden continuar siendo comercializados mientras se anuncien y etiqueten para igual uso que en 1938 y mientras se fabriquen de la manera original.” Algunos de los métodos de fabricación usados antes de 1938 todavía se utilizan hoy. El proceso electro-coloidal, conocido como el mejor método, es el más utilizado (2).

Dentro de este contexto, siendo la nano plata partículas muy pequeñas, necesita de procedimientos sofisticados para su obtención. El Dr. Robert O. Becker, autor de “El Cuerpo Eléctrico”, descubrió que los iones de plata promueven el crecimiento del hueso y matan a las bacterias circundantes. En Marzo de 1978, la revista Science Digest de los Estados Unidos, en su artículo, “Nuestro Combatiente más Poderoso Contra los Gérmenes”, menciona: “Gracias a la investigación de mente abierta, la plata está emergiendo como una maravilla de la medicina moderna. Un antibiótico mata, quizás, a una docena de diversos organismos patógenos, pero la plata mata alrededor de 650. Las mutaciones resistentes no pueden generarse. Por otra parte, la plata es virtualmente no tóxica”. El artículo termina con un comentario del Dr. Harry Margraf, bioquímico e investigador pionero de la plata, que trabajó con el Dr. Carl Moyer, presidente del Departamento de Cirugía de la Universidad de Washington en los años 70: “La plata es el mejor y más versátil combatiente de gérmenes que tenemos” (2).

Los efectos nocivos de la exposición crónica a la plata son una descoloración gris azulada permanente de la piel (argyria) u ojos (argyrosis). La mayoría de los estudios discuten los casos del argyria y del argyrosis que han resultado sobre todo de la exposición a las formas solubles de plata. Además de argyria y argyrosis, la exposición a

los compuestos de plata solubles puede producir otros efectos tóxicos, incluyendo daño del hígado y del riñón, la irritación de los ojos, la piel, respiratorias, y zona intestinal, y los cambios en células de sangre. La plata metálica aparece plantear riesgo mínimo a la salud. Los límites de exposición ocupacional actuales no reflejan la diferencia evidente en toxicidades entre la plata soluble y metálica (10).

1.2 NANO PLATA

El esfuerzo extenso por desarrollar agentes antimicrobianos y germicidas inocuos a los seres humanos esta en lo más alto de la cumbre. Las experiencias largas y extensas y los experimentos han revelado que la plata mata a casi todos los microorganismos patógenos en el mundo. Su actividad antimicrobiana radica en inhibir determinadas reacciones enzimáticas esenciales para el metabolismo (2).

La plata es un metal antimicrobiano seguro y eficaz. Particularmente, producto de la nanotecnología, la nano plata exhibe actividad antimicrobiana germicida potente debido al aumento en el área superficial. Numerosas investigaciones dan resultados que la nano-plata mata aproximadamente a 650 tipos de microorganismos incluyendo hongos (2)(54)(55)(56).

Según datos experimentales, nano plata es antibacteriano en un 99.9% (54).

1.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA NANO PLATA

Las partículas de la nano plata están aproximadamente entre 1nm y 100nm de diámetro. Tienen área superficial relativa extremadamente grande, aumentando su contacto con las bacterias o los hongos, y mejorando sumamente su eficacia bactericida y fungicida (26).

- Es tan clara como el agua.
- Puede ser mantenido en botella clara porque no puede ser dañada por la luz.
- No necesita de agitación, porque las partículas de plata son tan pequeñas que siguen siendo una suspensión permanente perfecta.

- La nano-plata es tan pequeña que puede incluso ser absorbida directamente a través de la piel (26).

1.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La suspensión coloidal de nano plata tiene actividad antimicrobiana, particularmente para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y clamidias. Ejemplos de estos microorganismos son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a methicillin, *Chlamydia trachomatis*, *Providencia stuartii*, *Vibrio vulnificus*, *Pneumobacillus*, *Bacillus* nitrato negativo, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, Morgan's *bacillus*, *Pseudomonas maltophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus subtilis*, *alkaligenes*, *Streptococcus hemolyticus* β , *Citrobacter*, *Salmonella paratyphi C*, entre otros microorganismos (55).

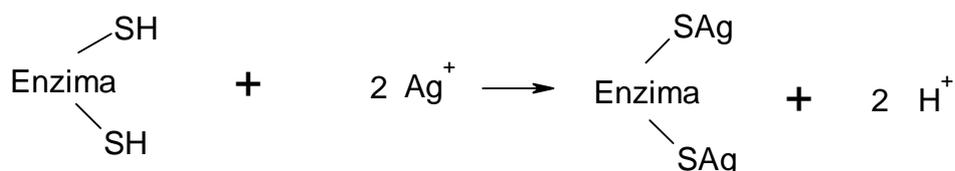
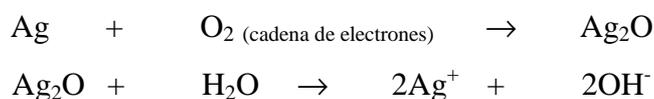
1.2.3 MECANISMO DE ACCIÓN

A diferencia de los antibióticos farmacéuticos, que destruyen también a las enzimas benéficas, la nano plata deja estas enzimas de las células de tejido intactas, pues son radicalmente diferentes de las enzimas de los organismos unicelulares más primitivos.

Los iones de plata matan rápidamente a microbiorganismos bloqueando el camino de la respiración de la célula, así como la alteración del DNA y la pared celular del microorganismo, la velocidad de acción es casi instantánea una vez que la plata alcanza al microorganismo (2)(6)(9) .

Así, la nano plata es absolutamente segura para los seres humanos, reptiles, plantas y toda la materia viva multicelular. Es importante también, recalcar que la nano-plata no ha demostrado interactuar o interferir con otras medicinas ingeridas. Dentro del cuerpo, la plata no forma compuestos tóxicos ni reacciona con otra cosa que con la enzima metabolizadora de oxígeno (2).

Su mecanismo se puede explicar con las siguientes reacciones químicas:



Cuando la plata metálica está en contacto con la enzima metabólica de oxígeno de un microorganismo esta puede ionizarse o formar óxido de plata, este óxido interactúa con el agua, se ioniza para producir plata iónica. Finalmente cuando la plata iónica interactúa con los grupos sulfhidrilos (-SH) de la enzima de los microorganismos útil para su mecanismo de respiración, esto forma un enlace -SAg, lo cual bloquea la actividad enzimática e impide su respiración y por lo tanto provoca la muerte del microorganismo (54).

Las altas concentraciones de plata no matan a los gérmenes de la enfermedad con más eficacia que la gama extra segura de 3 a 5 ppm (2).

1.2.4 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

Tomada en forma oral, la suspensión de nano-plata se absorbe desde la boca y penetra en la circulación sanguínea, siendo después transportada rápidamente a las células del cuerpo. Retener la solución debajo de la lengua antes de tragarla, puede dar lugar a una absorción más rápida. En tres a cuatro días, la plata puede acumularse en los tejidos en forma suficiente para que los beneficios comiencen a producirse. La nano-plata es eliminada por los riñones, el sistema linfático y el intestino, después de varias semanas. Si está expuesto rutinariamente a gérmenes patógenos peligrosos o su sistema inmunológico está deprimido por cualquier motivo, es recomendable un consumo diario regular, como protección preventiva (36).

1.2.5 POSIBLES EFECTOS ADVERSOS

Algunas personas pueden sentirse doloridas, agotadas o pueden experimentar dolores de cabeza los primeros días después de comenzar la ingesta de nano plata. Pero, esto es una crisis curativa normal; cuando el cuerpo elimina muchas toxinas en forma abrupta, los órganos primarios de excreción pueden sobrecargarse (36).

1.2.6 NANO PLATA Y EL MEDIO AMBIENTE

Un aspecto particularmente perturbador es que las nanopartículas construidas muestran importante toxicidad en plantas, animales y humanos, debido justamente a su tamaño, que aumenta su reactividad pero impide que sean detectadas por el sistema inmunológico. Por sus propiedades antimicrobianas, las nanopartículas de plata se están usando en productos farmacéuticos y quirúrgicos, en ropa interior, guantes, medias y calzados deportivos, en productos para bebés, contenedores para alimentos, productos de higiene personal, cubiertos, refrigeradores y lavarropas (46).

En 2008, estudios realizados por Zhiqiang Hu demostraron que el lavado de prendas que tienen nanopartículas de plata, o el uso de lavarropas con nano plata, desecha parte de estas nanopartículas sintéticas a los desagües, con fuerte toxicidad para la vida acuática, matando también bacterias benignas en los sistemas de drenaje que sirven para eliminar el amoníaco de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, según un artículo publicado en la Web de la Universidad de Missouri, estudio, financiado por la National Science Foundation (46).

Según Zhiqiang Hu, las nanopartículas de plata generan más sustancias químicas únicas, conocidas como especies reactivas del oxígeno, que producen formas más grandes de plata. Estas sustancias probablemente inhiben el crecimiento bacteriano. Por ejemplo, el uso del lodo de depuración de las aguas residuales como fertilizante para la tierra es una práctica habitual. Si en el sedimento hay una elevada presencia de nanopartículas de plata, la tierra utilizada para cultivar las cosechas de alimentos podría estar contaminada. (46).

Basados en estos estudios, el Centro Internacional de Evaluación Tecnológica de Estados Unidos, con apoyo de trece organizaciones ambientalistas y de consumidores, (Grupo ETC, Greenpeace, Amigos de la Tierra, Consumers Union y otros) presentó una demanda a la Agenda de Protección Ambiental de Estados Unidos, por haber permitido la liberación al ambiente y al consumo de un tóxico de alta potencia presente en más de 260 productos de venta libre (46).

1.3 DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS

El proceso de investigación y desarrollo es largo y complejo, involucra grandes costos y pocas posibilidades de éxito. De las muchas moléculas identificadas y ensayadas muy pocas llegan a los estantes de las farmacias, siendo desechadas la mayoría en distintas etapas del proceso. La complejidad del proceso es manejada por una diversidad de disciplinas científicas que incluye químicos orgánicos, biólogos moleculares, toxicólogos, médicos, farmacólogos, bioquímicos y científicos de la computación. Todos participan en alguna etapa del proceso, lo que en parte explica los enormes costos involucrados. En promedio, el proceso de estudiar y ensayar una nueva droga dura 12-15 años y significa una inversión cercana a los US\$ 600 millones antes que ésta sea aprobada para su comercialización. ¡Y sólo una de 5.000 drogas que entren a la etapa de ensayos pre-clínicos será aprobada para uso terapéutico!. La mayoría de las moléculas (90%) son desarrolladas por las grandes casas farmacéuticas internacionales y no por las universidades u otros organismos. En 1999, en los EEUU las compañías farmacéuticas invirtieron US\$ 24 mil millones en investigación, 14% más que el año anterior (PhRMA Industry Profile & Annual Survey, 2000) (43).

1.3.1 FASES PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS

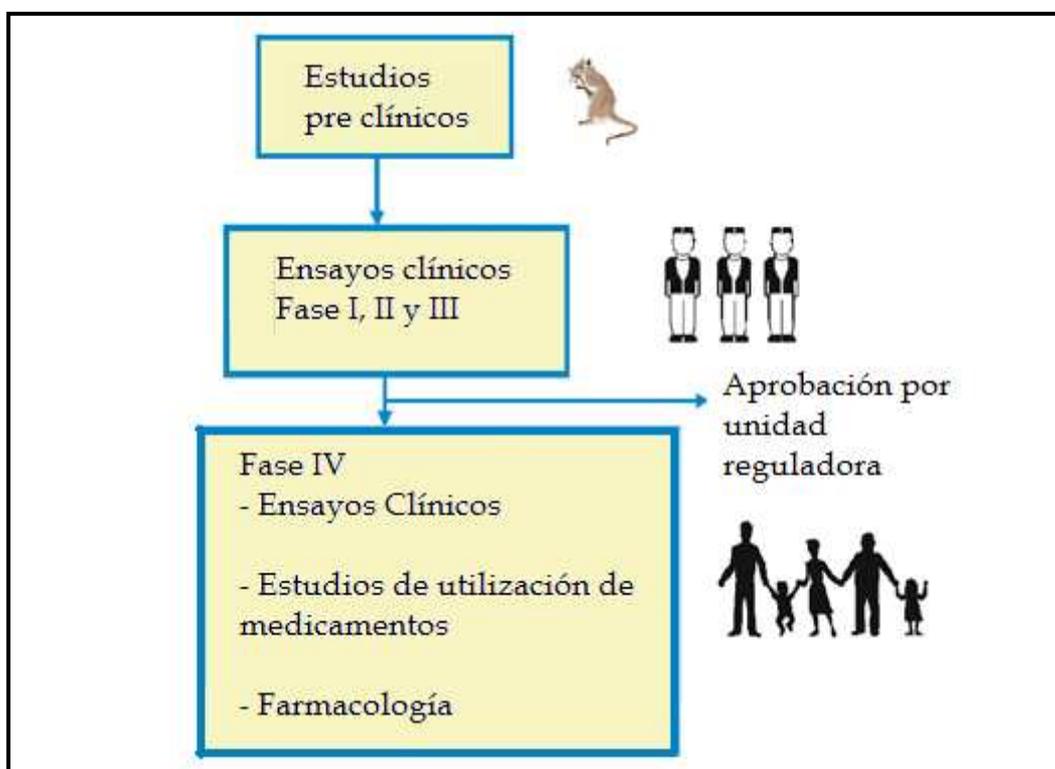


GRÁFICO No 5: PROCESO DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS NUEVOS Y PRINCIPALES ACTIVIDADES DE LA FARMACOEPIDEMIOLÓGIA EN LA FASE IV.

1.3.1.1 ESTUDIOS PRE-CLÍNICOS

Los estudios pre-clínicos se realizan en animales y modelos fisiológicos en el laboratorio, analizando las propiedades físico-químicas y el comportamiento del compuesto “*in vivo*” e “*in vitro*”. El propósito primario sigue siendo la evaluación de la actividad biológica. En esta etapa, las moléculas se ensayan en dos o más especies de animales, debido a que una droga puede afectarlas en forma diferente. Estos estudios pre-clínicos evalúan un gran rango de parámetros de la molécula, e incluyen estabilidad, niveles plasmáticos, tisulares y propiedades farmacocinéticas. Se realizan estudios de toxicidad aguda y crónica y sobre el efecto en la reproducción y su progenia, los efectos a largo plazo (toxicidad crónica) son siempre los que implican más esfuerzo de investigación: los animales deberán ser mantenidos por más tiempo, se consumirá más droga, se requerirá más trabajo de técnicos y profesionales especializados, etc. Es interesante saber que estos estudios son de crucial importancia para los pacientes y la sociedad, se analizan posibles

efectos teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos y otros de largo plazo, es inusual que los estudios crónicos en animales se extiendan por más de 6 meses de exposición a la droga. Y los humanos los recibirán por toda la vida (35).

Basado en los resultados de esta etapa, se evalúa el desarrollo de formulaciones para estudios clínicos y se proponen evaluaciones farmacológicas más extensas. Estos estudios duran un promedio de 3,5 años para un compuesto exitoso, pero sólo 1 de 1 000 compuestos avanza a la siguiente etapa, que comprende a los estudios clínicos en seres humanos. Si estos complejos estudios preliminares son prometedores, normalmente el propietario solicita la patente del compuesto. En este momento se decide si se solicita un permiso al FDA (EEUU) o EMEA (Europa) para desarrollar la droga y comenzar con los estudios en seres humanos, solicitando el correspondiente IND (43).

1.3.1.2 ESTUDIOS CLÍNICOS.

Estos estudios tienen que ser realizados de acuerdo con las llamadas Buenas Prácticas Clínicas (Good Clinical Practice o GCP en inglés), respetando los principios de la Declaración de Helsinki elaborada durante la Asamblea del Congreso Médico Mundial, Helsinki, Finlandia en 1964, y reactualizada periódicamente con el objetivo básico de proteger a los pacientes. Estos principios reconocidos y exigidos por el Congreso Internacional de Armonización (ICH) que permite que estudios realizados en Europa sean válidos para el registro de productos en EEUU o Japón. En general, los estudios clínicos son randomizados (pacientes asignados en forma aleatoria al grupo de tratamiento o al de control), eliminando la posibilidad de sesgo. El diseño doble ciego (donde ni el investigador ni el paciente saben en que grupo están) permite obviar la subjetividad en la evaluación de la respuesta (43).

1.3.1.2.1 ESTUDIOS CLÍNICOS FASE I.

Denominada farmacología clínica, corresponde a la primera administración de la droga en el ser humano. Las pruebas son realizadas en voluntarios sanos, a través de estudios controlados de farmacocinética y farmacodinamia que utilizan dosis únicas progresivas o

dosis múltiples, en un corto plazo. El número de voluntarios en esta etapa varía de 20 a 100 y depende de la droga en estudio. El objetivo es determinar el perfil de seguridad, toxicidad y rango de dosis potencialmente eficaz. Generalmente son realizados en hospitales o unidades de investigación especializadas y tienen una duración de 1-2 años. Se establece la dosis máxima tolerada y se empieza a formar un perfil de reacciones adversas comunes. En esta etapa también se definen las rutas de administración, sólo 1 de cada 3 compuestos pasan a la siguiente etapa (43).

1.3.1.2.2 ESTUDIOS CLÍNICOS FASE II.

Éstos son los primeros estudios que se llevan a cabo en poblaciones homogéneas y restringidas de pacientes que padecen la enfermedad y requieren entre 100 a 500 sujetos. Los pacientes son monitorizados, muy estrechamente, a través de varios parámetros de seguridad. El objetivo de esta etapa es establecer la eficacia, a través de la relación dosis-respuesta, definir la dosis mínima efectiva y la dosis máxima tolerada y determinar los efectos adversos. Los ensayos son controlados con placebo o con el medicamento comparador de referencia, cuando no es ético usar placebo; son randomizados y doble ciego. Esta fase transcurre en 2 a 5 años y un tercio de las moléculas no la supera, deteniendo ahí su desarrollo (43)

1.3.1.2.3 ESTUDIOS CLÍNICOS FASE III

Los estudios clínicos en esta fase son de acceso expandido, multicéntricos y emplean investigadores menos especializados una población más general y son de más larga duración. Básicamente la efectividad del fármaco ha sido establecida en los estudios anteriores y los de ahora están diseñados para recolectar evidencia adicional sobre efectividad en indicaciones específicas y con una definición más precisa de los efectos adversos relacionados a la droga. Se hacen estudios comparativos con un medicamento estándar establecido para el tratamiento de la enfermedad (placebo cuando no hay) e implican la medición de múltiples variables y resultados. Estos estudios emplean entre 1.000 a 5.000 pacientes de elección más heterogénea, para tratar de semejar la población real que utilizará el fármaco y duran 2 a 4 años. Con estos ensayos la compañía podrá

disponer de la base para la información regulatoria (etiquetas, indicaciones, efectos adversos, etc.) que requiere la preparación de la NDA. Sólo 2 de cada 3 moléculas aprueban esta fase final (42).

Los estudios IIIB se realizan cuando la droga está aprobada, pero la indicación, formulación o dosis ha cambiado. Debido a que estos estudios no permiten detectar o identificar eventos adversos raros, de ocurrencia en 1 de 10.000 pacientes o menos, muchas autoridades exigen que la farmacovigilancia continúe en la siguiente etapa: estudios de fase IV (43).

1.3.1.2.4 ESTUDIOS CLÍNICOS FASE IV

Los estudios fase IV (investigación pos mercadeo) son ensayos con drogas aprobadas que incluyen estudios de calidad de vida y farmacoeconomía que verifiquen una relación costo-beneficio adecuada. Además, son usados para extensión de líneas, para acceder a poblaciones más amplias, cambiar una formulación existente o cambiar la dosis. A veces, se usan para apoyar una aprobación condicional, cuando los organismos regulatorias dan la aprobación de comercialización, pero quieren que la compañía recolecte más datos para comprobar su efectividad o seguridad; también pueden ser usados para evaluar interacciones medicamentosas. Esta etapa, en que el medicamento está en uso generalizado en varios países permite que realmente se puedan apreciar los eventos adversos raros, los derivados de uso prolongado y los factores de riesgo adicionales no conocidos (43).

1.4 TOXICIDAD

Los estudios de toxicidad constituyen hoy en día una parte importante dentro del desarrollo de nuevos medicamentos. El objetivo de los mismos es "evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas", y no se limitan sólo a los fármacos sino que la mayor parte de las sustancias químicas industriales (pesticidas, agroquímicos,

cosméticos, plásticos, etc.) son objeto de estudios de toxicidad iguales o más complejos que los realizados con los nuevos fármacos (13).

1.4.1 DEFINICIÓN

La Toxicología se puede definir como: La ciencia que estudia los efectos adversos de las sustancias y productos químicos sobre los organismos vivos así como los mecanismos de acción, diagnóstico, prevención y tratamiento de las intoxicaciones (24)(40).

Los tóxicos son sustancias capaces de producir en un órgano o sistema de órganos lesiones estructurales o funcionales e incluso provocar la muerte (26).

Sin embargo, potencialmente casi todas las sustancias conocidas pueden provocar daño y/o la muerte si están presentes en el organismo en una cantidad suficiente.

En el siglo XVI, Paracelso afirmaba que "ninguna sustancia es tóxica, sólo su dosis determina su toxicidad", es decir la dosis correcta es la que diferencia a un veneno de un remedio; un ejemplo típico es el caso oxígeno, que al estar al 100% se convierte en letal a los 4 días (4)(24)(50).

No es posible, por tanto, clasificar a las sustancias químicas como inocuas y tóxicas, sin embargo, se han creado grados de toxicidad, basados en la DL, DL 50, que poseen un cierto valor práctico (24)(40).

- DL es aquella cuya administración causa la muerte.
- DL 50 es la dosis que causa la muerte al 50% de los individuos que la reciben.

Existen varias clasificaciones de los grados de toxicidad; una de las más frecuentemente utilizadas es la que aparece en la Tabla 3, estas clasificaciones se refieren exclusivamente a toxicidad aguda (22).

TABLA No 3: CLASIFICACIÓN DE GRADOS DE TOXICIDAD AGUDA.

Rango de Toxicidad	Dosis letal oral probable en humanos
1. Relativamente inocuo	15 g/Kg
2. Levemente tóxico	5 g – 15 g/Kg
3. Moderadamente tóxico	500 mg – 5 g/Kg
4. Muy tóxico	50 mg – 500 mg/kg
5. Extremadamente tóxico	5mg – 50 mg/kg
6. Súper tóxico	<5mg/kg

FUENTE: CLINICAL TOXICOLOGY, 1984

En situaciones prácticas, lo importante es el riesgo o peligro asociado con el uso de la sustancia y no su toxicidad intrínseca.

Definimos como peligro, la posibilidad de que una sustancia produzca efectos dañinos a causa de sus propiedades específicas y a las circunstancias y grado de la exposición (41).

El término opuesto es la seguridad, o probabilidad de que no exista daño bajo condiciones específicas. Por esto, dependiendo de las condiciones en las que se utilice, un compuesto muy tóxico puede ser menos peligroso que uno relativamente no tóxico (40).

1.4.2 CLASIFICACIÓN DE LOS TÓXICOS

La clasificación de tóxicos de forma precisa no es una tarea fácil y se puede realizar siguiendo varios caminos: en función de sus efectos, de su naturaleza, de los usos del tóxico, de su estructura química, de su grado de toxicidad, etc. Citaremos algunas de estas clasificaciones (22).

1.4.2.1 EN FUNCIÓN DE SU NATURALEZA

Se pueden clasificar como tóxicos químicos y físicos. Los tóxicos químicos pueden ser de origen animal, mineral, vegetal y sintético. Casi siempre se tiende a limitar el concepto de tóxico al efecto de sustancias químicas sin tener en cuenta los efectos

tóxicos de elementos físicos, tales como los Rayos X, ultravioleta, el efecto nocivo del ruido, etc. (22).

1.4.2.2 SEGÚN LOS USOS Y APLICACIONES DEL TÓXICO

- Medicamentos: medicamentos propiamente dichos, desinfectantes, etc.
- Productos domésticos: detergentes, disolventes, pulimentos, etc.
- Productos industriales: gases, sustancias volátiles, metales, aniones.
- Productos agrícolas: plaguicidas, pesticidas, insecticidas, fertilizantes.
- Rodenticidas, herbicidas.
- Productos alimenticios.

1.4.2.3 EN FUNCIÓN DE LA VÍA DE ENTRADA

Los efectos sistémicos de los tóxicos requieren que éstos se absorban y distribuyan por el organismo hasta los lugares donde ejercerán su acción. Para que ésta tenga lugar habrá de pasar por varias fases, así, como cualquier otra sustancia química medicamentosa, deberá absorberse, distribuirse, fijarse y eliminarse (40).

Las principales vías de absorción del tóxico son:

- Por ingestión, a través del tracto gastrointestinal. En la mayoría de las intoxicaciones agudas es la principal vía de absorción.
- Por inhalación, a través de la vía respiratoria. Esta vía es la principal en las intoxicaciones por gases.
- Por vía tópica, a través de la piel. Esta vía, junto con la inhalatoria, son las que con más frecuencia se implican en intoxicaciones industriales, mientras que las intoxicaciones accidentales y suicidas suceden con mayor frecuencia por la vía oral.
- Por vía ocular, no son frecuentes. Constituyen un porcentaje menor de intoxicaciones que el resto de las vías de absorción.
- Por vía parenteral. Es la más peligrosa, dada su rapidez de acción.

- Vía rectal. Es muy infrecuente y generalmente se debe a errores de medicación, intra y extra-hospitalaria. En ocasiones, en el tráfico de drogas.
- Vía vaginal. Es más infrecuente aún que la rectal y también puede darse en el tráfico de drogas (40).

En los casos de muertes por intoxicaciones, las vías de exposición predominantes son:

- Ingestión
- Inhalación
- Vía parenteral.

1.4.3 FACTORES IMPLICADOS EN LA TOXICIDAD

La acción de un agente tóxico sobre un organismo vivo denominado como intoxicación, es un proceso relativamente complejo, en el cual están involucrados muchos factores. Sin embargo, hay por lo menos cinco factores que están íntimamente ligados al fenómeno de la intoxicación (53).

1.4.3.1 CARÁCTER TÓXICO DEL AGENTE XENOBIÓTICO

Un término muy usado en el área farmacológica para definir cualquier sustancia extraña al organismo en cuestión, es la de agente xenobiótico. No obstante como Paracelso mencionó: “no hay sustancia que no sea venenosa”, incluso el oxígeno que es esencial para mantener la vida de cualquier organismo aerobio, se sabe que una atmósfera de oxígeno puro es dañina para cualquier mamífero, ya que se consume rápidamente el ácido-aminobutírico, moderador de la transmisión nerviosa cerebral, y como consecuencia, se producen graves alteraciones nerviosas que llevan a convulsiones y a la muerte (53).

1.4.3.2 SISTEMA BIOLÓGICO

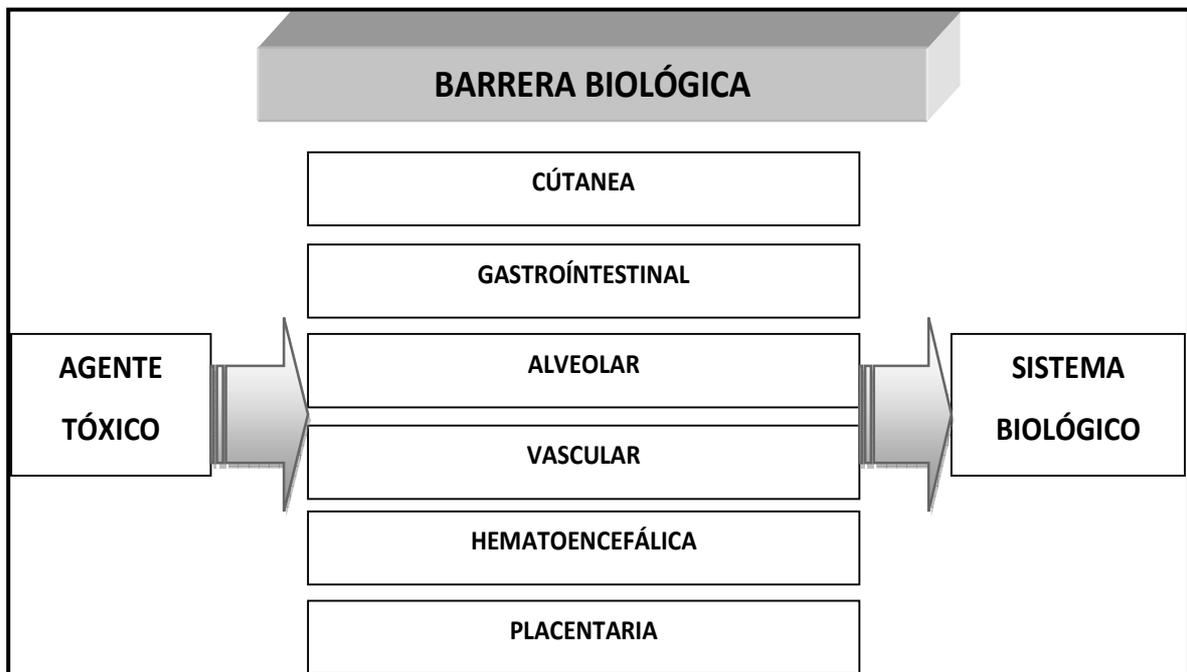
El sistema biológico sobre el cual actúa el agente tóxico es de suma importancia, ya que el efecto variará notablemente según el organismo. Dicho factor debe ser tomado en

cuenta, ya que es bien conocido que entre las diferentes especies de animales y el hombre hay una gran variación en la sensibilidad hacia los agentes tóxicos.

Se ha observado que ratas machos metabolizan más rápidamente los agentes xenobióticos; sin embargo, cuando esta comparación se realiza en experimentos in vitro, esta diferenciación es menos pronunciada o ausente en otras especies, entre las cuales se incluye el hombre. Experiencias que confirman lo anterior y que indican que la actividad hormonal juega un papel importante en el proceso de detoxificación (53).

1.4.3.3 VÍA O RUTA DE ABSORCIÓN

Es bien conocido que un mismo agente tóxico puede producir efectos muy diferentes, dependiendo de la ruta por la cual el sistema biológico lo absorba, esto se debe a que para que un agente xenobiótico produzca su efecto tóxico debe llegar a los receptores específicos, atravesando una o varias membranas tisulares (53).



FUENTE: FABRE Y TRUHAUT, 1976

GRAFICO 6: PRINCIPALES BARRERAS BIOLÓGICAS QUE PRESENTA EL ORGANISMO HUMANO COMO PROTECCIÓN HACIA LOS AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS.

1.4.3.4 TIEMPO DE INTERACCIÓN DEL AGENTE TÓXICO

El efecto de un agente tóxico sobre un sistema biológico se traduce en una alteración del equilibrio fisiológico (homeóstasis), por lo que una intoxicación es una enfermedad y como tal debe considerarse bajo un criterio patocrónico, o sea se debe observar la evolución en función del tiempo y así podemos clasificarla como intoxicación aguda, crónica o sub-aguda (53).

La intoxicación aguda se define como la exposición hacia un agente xenobiótico que produce una manifestación casi inmediata, en ocasiones en minutos con una sola administración del tóxico, que puede llevar al intoxicado a la muerte, o a una recuperación total o parcial, de la cual pueden quedar o no secuelas o lesiones persistentes. En muchos de los casos de una intoxicación aguda se presenta un fenómeno de reversibilidad con excepción de la muerte (53).

En general la intoxicación sub-aguda, no implica un menor grado de gravedad de la intoxicación aguda, sino que se presenta una evolución de la intoxicación con trastornos sub-clínicos. Aunque este tipo de intoxicación requiere la administración repetitiva del tóxico, al inicio no se presentan trastornos visibles; sin embargo, a corto plazo se pueden presentar evidencias de la intoxicación y algunos toxicólogos consideran que para que se presente ésta, se debe exponer el sistema biológico al tóxico en un lapso que puede variar de un mes a tres meses (53).

La intoxicación crónica se presenta como consecuencia a la repetida exposición hacia el agente tóxico. Esta absorción se produce con cantidades relativamente pequeñas del tóxico, que por sí mismo no producen trastornos visibles en un inicio, pero la acumulación del agente xenobiótico en el organismo normalmente en un órgano o tejido específico y con el transcurso del tiempo, se presentan estados patológicos, y en la mayoría de los casos son de carácter irreversible. En este tipo de intoxicación, los trastornos iniciales permanecen latentes y son generalmente reversibles; hasta que por alguna causa, como podría ser una disminución de las condiciones fisiológicas normales (enfermedad), se puede poner en evidencia la intoxicación. Un ejemplo clásico de

intoxicación crónica, es el efecto de las sustancias carcinogénicas, ya que en dosis sub-letales, este tipo de compuestos no se evidencian a corto plazo. La intoxicación requiere de tres meses a uno o varios años y cuando se manifiesta en forma clínica, es muy difícil de revertir el daño producido (53).

Actualmente la intoxicación crónica es bastante frecuente, como consecuencia entre otros factores, del mal uso de medicamentos, del ambiente contaminado, mayor contacto con productos industriales y plaguicidas. Este tipo de intoxicación suele presentar cuadros clínicos difusos, que con frecuencia inducen a confusión con otro tipo de enfermedades, lo cual en ocasiones obstaculiza una terapia adecuada (53).

1.4.3.5 EXCRECIÓN DEL AGENTE TÓXICO

La excreción de los tóxicos se efectúa por medio de la orina, bilis, heces y una alta proporción de los compuestos volátiles, por el aire expirado. Menores cantidades se eliminan por la leche, el sudor y la saliva, y que aunque cuantitativamente no sean relevantes, en algunos casos cobra importancia, como es el caso de madres en lactancia que sean fumadoras, bebedoras o drogadictas (53).

El mejor sistema de excreción es la vía urinaria; ya que en un adulto, las arteriolas precedentes de la arteria renal aportan un flujo de 1.2 a 1.3 L/min (aproximadamente el 25% del gasto cardíaco) así, la excreción urinaria es la más importante para eliminar del organismo las sustancias tóxicas ingeridas en la dieta (53).

1.4.4 ESTUDIOS DE TOXICIDAD

1.4.4.1 TOXICIDAD AGUDA

La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50 % de los animales (13).

La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados.

En general, el test se realiza con 5 grupos de 10 animales de cada sexo, aunque existen algunos métodos abreviados que intentan reducir el número de animales a sacrificar (13).

La determinación de la DL50 se suele llevar a cabo en rata y ratón por al menos dos vías de administración entre las cinco posibles (i.v., i.m. ip. s.c. y oral). En el perro y otros animales de tamaño parecido, el punto final del estudio no suele ser la muerte del animal, sino la determinación de la dosis que produce unos severos efectos adversos (13).

1.4.4.2 TOXICIDAD SUB-AGUDA

En estos test, la administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Las principales Administraciones Sanitarias requieren, antes de autorizar la administración de una dosis única de la sustancia al ser humano, que se hayan realizado estudios de toxicidad sub-aguda en dos especies animales, una de las cuales deberá ser no roedora. En ambas especies, se suelen utilizar entre 4 y 5 dosis de sustancia, vehículo, dosis baja, media, alta, dosis media baja, dosis media alta (13).

Frecuentemente, se añaden dos grupos satélite de animales (uno tratado con vehículo y otro con la dosis más alta) que no son sacrificados al final del estudio, sino que se les deja una o dos semanas para recuperarse las posibles lesiones inducidas por el producto.

Durante el estudio se controlan un buen número de parámetros (aspecto, comportamiento, peso, consumo de agua, alimento, etc) y al final los animales son sacrificados y autopsiados. Al inicio del estudio y antes de la autopsia, se toman muestras de sangre para ser analizadas. La autopsia consiste en el examen macroscópico de las vísceras y tejidos y en la toma de especímenes para su examen anatomopatológico (13).

1.4.4.3 TOXICIDAD SUB-CRÓNICA Y CRÓNICA

Básicamente, estos estudios tienen características similares a los anteriores en cuanto al número de animales, número de dosis, observaciones, etc. Los estudios de toxicidad subcrónica suelen durar 3 meses, mientras que los de toxicidad crónica suelen durar 6 meses o un año, según el uso terapéutico que vaya a tener la sustancia. Si, por ejemplo, la sustancia es un antihipertensivo o antidiabético oral, cuya administración en el hombre se prevea dure años, la toxicidad crónica durará un año. En el caso de un antibiótico, usado en el hombre durante periodos de 8-10 días, bastará con estudios de 6 meses (13).

Es importante decidir la forma de administrar la sustancia a los animales durante estos períodos tan largos. Si la administración con una sonda gástrica no suele ocasionar problemas en tratamientos cortos, el estrés o la posibilidad de accidentes con el sondaje deben ser considerados frente a la mayor imprecisión y otros problemas que conlleva el administrar el fármaco mezclado con el alimento (rechazo del alimento, dilución de la dosis en el tiempo, absorción diferente, etc.) (13).

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH, Unidad Oncológica Provincial “Solca” Riobamba.

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIALES

- Jeringuillas de 3mL
- Cánula orogástrica en punta de oliva
- Pipetas semiautomáticas 100 μ L
- Tubos pediátricos con y sin EDTA
- Vaselina sólida
- Papel toalla
- Pizetas
- Alfileres estériles
- Placas porta objetos
- Placas cubre objetos
- Gradilla
- Mandil
- Mascarillas
- Guantes
- Puntas amarillas

2.2.2 EQUIPOS

- Refrigeradora (Hotpoint)
- Balanza técnica (Ohaus)
- Equipo de disección
- Contador hematológico (Diatron)
- Espectrofotómetro (Chem Well.)
- Centrifuga
- Tubos capilares

2.2.3 REACTIVOS

- Suero fisiológico
- Agua destilada
- Suspensión de nano plata 25 µg/mL.
- Acido úrico (Kits diagnósticos de Human)
- Albumina (Kits diagnósticos de Human)
- ALAT (Kits diagnósticos de Human)
- ASAT (Kits diagnósticos de Human)
- Creatinina (Kits diagnósticos de Human)
- Colesterol (Kits diagnósticos de Human)
- Fosfatasa alcalina(Kits diagnósticos de Human)
- Proteínas totales (Kits diagnósticos de Human)
- Gamma GT (Kits diagnósticos de Human)

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 SUSTANCIA DE ENSAYO

Se utilizo una suspensión de nano plata de 25 ppm

2.3.2 REACTIVO BIOLÓGICO

Se utilizaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 12 semanas de edad, con peso corporal de 239 ± 42 g, todas procedentes del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Los animales fueron alojados en jaulas individuales con su respectiva identificación, manteniéndose a una temperatura aproximada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y con foto periodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Los animales de experimentación se mantuvieron en ambientación por un período de 7 días previo al inicio del estudio. Se suministró una dieta estándar peletizada para ratas y agua a voluntad. Las condiciones del estudio y los procedimientos de rutina estuvieron de acuerdo a las Buenas Prácticas de Laboratorio.

2.3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales de experimentación se distribuyeron al azar en 5 grupos (4 animales/grupo): un grupo considerado testigo que no recibió tratamiento alguno, grupo control que se administró 2 mL de agua y 3 grupos tratadas con 0.1 mg/Kg/día, 0.2 mg/kg/día y 0.4 mg/Kg/día de la suspensión de nano plata de 25 ppm, estableciéndose como dosis mínima, media y alta respectivamente. También se conformó un grupo satélite que se distribuyeron en 5 grupos (3 animales/grupo) con las mismas características anteriormente descritas.

Antes de comenzar el ensayo se realizó extracción de sangre del plexo ocular, para determinar valores basales de hematología y de química sanguínea.

Las ratas de experimentación fueron tratadas diariamente durante 13 semanas con la suspensión de nano plata. La administración se realizó por vía oral mediante cánula orogástrica en punta de oliva.

Los animales fueron observados diariamente para detectar signos clínicos de toxicidad o muerte. El peso corporal de los animales en estudio se determinó semanalmente.

A los 45 días del ensayo se realizó la extracción de sangre del plexo ocular, para determinar valores de hematología y de química sanguínea.

Al finalizar los 90 días de administración se efectuó la obtención de muestra de sangre del plexo ocular, empleando tubos capilares; con el objetivo de realizar el examen hematológico y los análisis de bioquímica clínica. Posteriormente se procedió al sacrificio de los animales por dislocación cervical para efectuar la extracción del hígado, riñones y estómago, y se determinó su peso relativo. Los órganos fueron colocados en formol buferado para su estudio histopatológico.

El lote satélite permaneció 28 días más que los grupos anteriores, pero estos no recibieron administración alguna durante ese periodo, al cabo de los cuales se procedió de igual forma que los grupos experimentales anteriores.

2.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media y su desviación estándar mediante el programa estadístico Microsoft Excel. Se realizó la prueba ANOVA, y el test de Tukey tomando un nivel de significancia $p < 0.05$, mediante el paquete estadístico XLSTAT for Windows, versión 7.5.2.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CUADRO No 1: MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR ($\bar{X} \pm SD$) DE PESO CORPORAL (g) DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) TRATADAS DURANTE 90 DÍAS CON NANO PLATA. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. MAYO-SEPTIEMBRE 2008.

Semana	Testigo	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta
1	198.5 ± 18.2	229.9 ± 28.2	250.1 ± 41.3	256.2 ± 37.2	272.6 ± 57.5
2	197.8 ± 23.7	237.0 ± 29.0	258.9 ± 35.1	257.5 ± 34.5	281.4 ± 64.9
3	208.4 ± 15.5	243.0 ± 25.6	259.3 ± 35.6	267.6 ± 37.6	279.5 ± 64.4
4	210.4 ± 15.8	241.4 ± 20.3	261.2 ± 32.1	265.9 ± 33.7	283.4 ± 64.7
5	211.8 ± 15.1	245.2 ± 22.2	263.5 ± 35.5	267.5 ± 35.1	283.1 ± 63.8
6	214.7 ± 16.3	249.6 ± 25.5	264.1 ± 35.8	269.4 ± 36.2	283.4 ± 64.9
7	215.3 ± 18.9	252.4 ± 26.6	271.2 ± 36.5	275.6 ± 41.5	287.1 ± 61.8
8	216.5 ± 17.6	251.6 ± 29.0	265.2 ± 36.6	275.7 ± 41.6	284.3 ± 62.7
9	216.6 ± 14.0	255.7 ± 33.1	272.9 ± 34.2	279.9 ± 36.8	293.1 ± 66.1
10	221.2 ± 17.3	262.3 ± 28.2	276.7 ± 34.5	281.3 ± 39.8	298.6 ± 68.1
11	222.4 ± 21.3	262.8 ± 30.0	272.9 ± 36.8	280.2 ± 41.0	296.1 ± 68.7
12	220.9 ± 16.3	261.6 ± 32.6	276.7 ± 41.2	277.9 ± 43.3	301.4 ± 14.7
13	225.9 ± 16.6	260.6 ± 32.6	279.4 ± 39.5	284.3 ± 41.0	302.6 ± 69.0
\bar{X}	261.9 ± 17.4	251.0 ± 27.9	256.8 ± 6.5	271.4 ± 38.4	271.2 ± 60.9

Al analizar los valores del peso corporal de los animales en estudio estos no muestran diferencia significativa entre los grupos, observándose un incremento similar tanto en el grupo testigo, blanco y los grupos que fueron tratados con las diferentes concentraciones de nano plata. La prueba de Tukey realizada al 0.05% de significancia no muestra diferencia estadísticamente significativa, lo que ratifica los resultados expuestos.

CUADRO No 2: MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR ($\bar{X} \pm SD$) DEL PESO CORPORAL (g) DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) TRATADAS CON NANO PLATA DEL (lote satélite). BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. MAYO-OCTUBRE 2008

Semana	Testigo	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta
1	215.7 ± 52.8	225.6 ± 12.2	235.9 ± 21.9	246.2 ± 34.5	254.8 ± 53.4
2	216.4 ± 47.3	233.6 ± 20.8	238.1 ± 20.5	250.6 ± 36.3	257.7 ± 52.2
3	228.6 ± 55.6	237.9 ± 21.2	246.8 ± 25.8	260.3 ± 42.4	262.2 ± 49.9
4	227.2 ± 45.4	241.0 ± 25.4	246.7 ± 27.7	260.4 ± 47.0	263.8 ± 47.5
5	236.7 ± 43.0	243.4 ± 23.9	247.6 ± 29.2	261.8 ± 47.2	264.5 ± 46.7
6	245.8 ± 48.2	244.6 ± 18.4	249.9 ± 29.0	263.7 ± 47.8	264.0 ± 48.2
7	246.5 ± 50.0	248.7 ± 19.0	254.0 ± 30.9	270.0 ± 47.4	266.3 ± 51.1
8	265.3 ± 66.4	245.4 ± 16.6	252.5 ± 33.5	269.4 ± 50.0	266.3 ± 52.1
9	276.7 ± 61.3	259.4 ± 21.9	259.3 ± 34.1	278.7 ± 49.8	275.7 ± 52.3
10	281.9 ± 61.1	261.2 ± 24.4	264.7 ± 32.7	279.8 ± 55.7	277.5 ± 52.1
11	284.2 ± 73.5	257.7 ± 27.0	262.9 ± 36.0	278.1 ± 50.2	273.5 ± 48.4
12	282.6 ± 78.3	257.1 ± 25.3	261.3 ± 35.6	277.3 ± 49.5	272.1 ± 47.0
13	284.8 ± 76.5	259.2 ± 18.5	266.1 ± 36.7	278.9 ± 53.9	273.7 ± 46.0
14	288.2 ± 63.8	257.9 ± 20.3	267.4 ± 30.8	280.1 ± 49.7	278.3 ± 44.3
15	284.4 ± 64.5	256.0 ± 15.1	264.6 ± 28.6	279.7 ± 46.5	276.1 ± 46.1
16	287.3 ± 68.9	258.3 ± 17.9	268.3 ± 27.8	282.4 ± 50.5	282.2 ± 45.3
17	286.7 ± 69.2	263.4 ± 13.7	269.7 ± 30.7	284.2 ± 49.5	285.9 ± 45.1
18	289.2 ± 70.0	267.4 ± 24.7	266.9 ± 35.0	283.2 ± 49.7	287.2 ± 48.9
\bar{X}	261.9 ± 59.4	251.0 ± 20.4	256.8 ± 30.4	271.4 ± 47.7	271.2 ± 48.7

Al analizar los valores del peso corporal de los animales en estudio estos no muestran diferencia significativa entre los grupos, observándose un incremento similar tanto en el grupo testigo, blanco y los grupos que fueron tratados con las diferentes concentraciones de nano plata. La prueba de Tukey realizada al 0.05% de significancia no muestra diferencia estadísticamente significativa, lo que ratifica los resultados expuestos.

CUADRO No 3: MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR ($\bar{X} \pm SD$) DE HEMATOLOGÍA Y PLAQUETAS DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) TRATADAS DURANTE 90 DÍAS CON NANO PLATA. LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICO. UNIDAD ONCOLÓGICA PROVINCIAL SOLCA RIOBAMBA. MAYO-SEPTIEMBRE 2008

Parámetros	Día	Testigo	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta
Hemoglobina (10.8 – 17.5) g/dL	0	18.1 ± 0.5	18.5 ± 0.9	18.0 ± 0.7	18.3 ± 0.7	19.0 ± 0.8
	45	17.7 ± 0.9	18.4 ± 0.5	18.1 ± 0.9	19.0 ± 0.7	18.0 ± 0.7
	90	18.8 ± 0.7	18.6 ± 0.6	19.1 ± 0.6	19.4 ± 1.3	18.9 ± 0.8
Hematocrito (35 – 51) %	0	46.1 ± 2.2	47.3 ± 2.4	49.6 ± 7.5	48.2 ± 4.1	51.5 ± 4.1
	45	43.5 ± 1.4	45.5 ± 1.2	48.8 ± 6.6	47.5 ± 3.6	47.5 ± 4.4
	90	58.9 ± 3.9	56.0 ± 4.4	59.6 ± 4.2	60.7 ± 6.1	58.9 ± 5.7
Leucocitos (6.4 – 26.2) $\times 10^3/\text{mm}^3$	0	7.17 ± 0.52	7.70 ± 0.50	6.35 ± 0.81	7.55 ± 1.50	7.07 ± 2.03
	45	6.50 ± 2.67	7.06 ± 2.17	4.81 ± 0.48	6.75 ± 1.21	6.64 ± 1.23
	90	6.17 ± 1.25	7.54 ± 1.83	6.08 ± 0.81	7.86 ± 1.75	7.84 ± 0.87
Eritrocitos (7 – 10) $\times 10^6/\text{mm}^3$	0	7.20 ± 0.32	7.72 ± 0.50	8.45 ± 1.67	8.01 ± 0.82	8.79 ± 0.93
	45	7.62 ± 0.23	8.14 ± 0.20	8.98 ± 1.50	8.52 ± 0.87	8.61 ± 0.84
	90	9.37 ± 0.63	8.88 ± 0.78	9.59 ± 1.50	9.79 ± 0.96	9.39 ± 0.90
Plaquetas (190 – 1000) $\times 10^3/\text{mm}^3$	0	615 ± 34	661 ± 42	772 ± 106	614 ± 25	667 ± 83
	45	597 ± 114	644 ± 68	712 ± 18	745 ± 92	631 ± 82c
	90	661 ± 62	656 ± 53	721 ± 68	704 ± 67	709 ± 35

CUADRO No 4: TUKEY (HSD) / ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.

Días	Eritrocitos	Leucocitos	Hemoglobina	Hematocrito	Plaquetas
0 ~ 45	No significativo				
0 ~ 90	Significativo	No significativo	Significativo	Significativo	No significativo
45 ~ 90	Significativo	No significativo	Significativo	Significativo	No significativo

Al realizar el análisis de los valores de hematología y plaquetas se aprecia que no existe diferencia significativa entre los grupos tratados con las diferentes concentraciones de nano plata; así, como también con los diferentes períodos de toma de muestra. La prueba

de Tukey realizada al 0.05% de significancia muestra diferencia estadísticamente significativa en parámetros como hemoglobina, hematocrito y eritrocitos el día 90 con respecto al día cero y con el día 45; sin embargo, estos valores permanecen dentro de los valores de referencia. Cabe mencionar que el valor de hemoglobina no estuvo dentro de los valores de referencia expuestos desde el primer día de la toma, lo que significa que no produce efecto a nivel de la médula ósea hematopoyética.

CUADRO No 5: MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR ($\bar{X} \pm SD$) DE HEMATOLOGÍA EN RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) TRATADAS CON NANO PLATA (lote satélite). LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICO. UNIDAD ONCOLÓGICA PROVINCIAL SOLCA RIOBAMBA. MAYO-OCTUBRE 2008.

Parámetros	Día	Testigo	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta
Hemoglobina (10.8 – 17.5) g/dL	0	18.6 ± 0.1	17.8 ± 1.1	18.9 ± 0.6	18.3 ± 0.8	17.8 ± 0.8
	45	17.4 ± 0.4	18.2 ± 0.1	18.4 ± 0.8	17.6 ± 1.3	18.8 ± 0.7
	90	18.8 ± 0.8	18.6 ± 0.7	19.1 ± 0.4	18.8 ± 0.2	19.0 ± 0.4
	118	19.2 ± 0.3	19.0 ± 0.5	19.3 ± 0.4	18.5 ± 0.2	19.4 ± 0.5
Hematocrito (35 – 51) %	0	48.6 ± 5.4	45.6 ± 1.7	48.9 ± 2.0	49.8 ± 3.7	46.5 ± 1.4
	45	45.9 ± 3.7	47.7 ± 1.5	47.4 ± 0.4	48.6 ± 6.6	49.1 ± 3.4
	90	52.9 ± 9.0	55.6 ± 1.9	56.7 ± 0.9	56.7 ± 4.4	58.2 ± 5.0
	118	61.1 ± 0.1	57.8 ± 1.9	59.8 ± 2.0	56.4 ± 1.5	61.6 ± 5.0
Leucocitos (6.4 – 26.2) $\times 10^3/\text{mm}^3$	0	6.58 ± 0.33	8.06 ± 1.68	7.48 ± 0.84	7.48 ± 1.69	8.05 ± 1.01
	45	5.79 ± 0.02	5.67 ± 0.58	5.08 ± 1.02	5.94 ± 1.53	6.25 ± 0.70
	90	7.12 ± 0.19	5.63 ± 0.70	6.57 ± 1.45	7.24 ± 0.48	6.79 ± 0.29
	118	7.58 ± 2.45	6.27 ± 1.03	6.07 ± 2.14	6.34 ± 1.00	6.59 ± 0.29
Eritrocitos (7 – 10) $\times 10^6/\text{mm}^3$	0	7.61 ± 0.74	7.57 ± 0.33	8.24 ± 0.19	8.34 ± 0.77	7.55 ± 0.33
	45	8.13 ± 0.77	8.48 ± 0.24	8.61 ± 0.20	8.63 ± 1.17	8.74 ± 0.74
	90	8.30 ± 1.42	8.73 ± 0.47	9.03 ± 0.16	8.90 ± 0.67	9.14 ± 0.77
	118	9.40 ± 0.25	8.87 ± 0.35	9.35 ± 0.64	8.69 ± 0.26	9.43 ± 0.04
Plaquetas (190 – 1000) $\times 10^3/\text{mm}^3$	0	714 ± 2	708 ± 20	640 ± 70	669 ± 103	642 ± 79
	45	626 ± 144	624 ± 43	677 ± 53	635 ± 15	682 ± 58
	90	566 ± 63	586 ± 35	645 ± 93	659 ± 88	681 ± 64
	118	662 ± 78	635 ± 102	640 ± 98	633 ± 69	652 ± 66

CUADRO No 6: TUKEY (HSD) / ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS. PARÁMETROS DE HEMATOLÓGICOS.

Días	Eritrocitos	Leucocitos	Hematología	Hematocrito	Plaquetas
0 ~ 45	Significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo
0 ~ 90	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo
0 ~ 118	Significativo	No significativo	Significativo	Significativo	No significativo
45 ~ 90	No significativo	No significativo	Significativo	Significativo	No significativo
45 ~ 118	No significativo	No significativo	Significativo	Significativo	No significativo
90 ~ 118	No significativo				

Al realizar el análisis de los valores de hematología y plaquetas se aprecia que no existe diferencia significativa entre los grupos tratados con las diferentes concentraciones de nano plata; así, como también con los diferentes períodos de toma de la muestra. La prueba de Tukey realizada al 0.05% de significancia muestra diferencia estadísticamente significativa en los eritrocitos con respecto al día cero; sin embargo, estos valores permanecen dentro de los valores de referencia. Los valores de leucocitos varían significativamente a los 45 días con respecto al día cero. En los valores de hemoglobina y hematocrito hubo diferencia significativa a los 118 días con respecto al día cero, día 90 y 118 en los valores de hemoglobina y hematocrito varía significativamente con respecto al día 45 del estudio de toxicidad. Adviértase que la diferencia significativa encontrada es similar tanto en el grupo testigo como en el resto de los grupos. Esta diferencia se atribuye al mismo proceso de crecimiento de los animales en experimentación.

CUADRO No 7: MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR ($\bar{X} \pm SD$) DE QUÍMICA SANGUÍNEA EN RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) TRATADAS CON NANO PLATA DURANTE 90 DÍAS. LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICO. UNIDAD ONCOLÓGICA PROVINCIAL SOLCA RIOBAMBA. MAYO-SEPTIEMBRE 2008.

Parámetros	Día	Testigo	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta
Acido úrico mg/dL	0	0.43 ± 0.28	0.27 ± 0.18	0.30 ± 0.29	0.48 ± 0.42	0.37 ± 0.37
	45	1.07 ± 0.50	1.65 ± 0.31	1.19 ± 0.38	1.36 ± 0.38	1.30 ± 0.29
	90	0.63 ± 0.39	0.61 ± 0.23	0.45 ± 0.41	0.42 ± 0.31	0.42 ± 0.23
Albumina (2.9 – 5.9) g/dL	0	3.3 ± 0.7	3.2 ± 0.7	2.9 ± 0.4	2.8 ± 1.0	3.0 ± 0.7
	45	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.5 ± 0.3
	90	4.4 ± 1.4	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.3
Colesterol (50 – 100) mg/dL	0	69.2 ± 20.4	70.0 ± 29.8	80.3 ± 10.4	72.4 ± 18.3	90.1 ± 59.2
	45	85.2 ± 21.9	80.5 ± 23.6	99.9 ± 21.8	86.6 ± 30.3	112 ± 55.2
	90	80.2 ± 26.3	83.4 ± 39.1	82.1 ± 13.7	75.8 ± 28.4	104.9 ± 62.2
Creatinina (0.4 – 1.4) mg/dL	0	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
	45	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.6	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1
	90	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2
Proteínas Totales (4.5 – 8.4) g/dL	0	5.7 ± 0.4	5.7 ± 0.3	5.4 ± 0.3	6.0 ± 0.2	5.9 ± 0.3
	45	8.1 ± 0.4	8.0 ± 0.5	7.9 ± 0.5	8.3 ± 0.3	8.3 ± 0.5
	90	7.4 ± 0.4	7.3 ± 0.3	7.0 ± 0.3	7.2 ± 0.2	7.0 ± 0.2
ALAT (52 – 224) U/L	0	36 ± 35	48 ± 42	54 ± 59	58 ± 48	45 ± 40
	45	51 ± 10	54 ± 7	68 ± 14	52 ± 4	52 ± 6
	90	42 ± 9	48 ± 11	60 ± 9	49 ± 9	55 ± 7
ASAT U/L	0	93 ± 27	106 ± 10	122 ± 15	120 ± 34	118 ± 26
	45	112 ± 9	102 ± 17	141 ± 22	118 ± 31	120 ± 20
	90	93 ± 6	79 ± 28	120 ± 17	104 ± 16	103 ± 8
Fosfatasa Alcalina U/L	0	252 ± 18	236 ± 52	303 ± 148	279 ± 121	221 ± 74
	45	120 ± 16	140 ± 44	144 ± 47	136 ± 39	134 ± 29
	90	108 ± 8	96 ± 25	117 ± 22	110 ± 27	100 ± 25
Gamma GT U/L	0	1.5 ± 0.5	2.1 ± 0.5	2.3 ± 1.7	1.5 ± 0.8	2.9 ± 1.4
	45	2.1 ± 1.7	0.7 ± 0.4	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.7	1.8 ± 1.2
	90	2.7 ± 1.5	2.0 ± 1.1	2.1 ± 1.6	2.2 ± 1.5	1.4 ± 0.4

CUADRO No 8: TUKEY (HSD) / ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS. PARÁMETROS DE QUÍMICA SANGUÍNEA.

Día	Acido úrico	Creatinina	Proteínas totales	Gamma GT	Fosfatasa Alcalina	Colesterol	ASAT	ALAT	Albumina
0 ~ 45	Significativo	Significativo	Significativo	No significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo	Significativo
0 ~ 90	No significativo	No significativo	Significativo	No significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo	Significativo
45 ~ 90	Significativo	Significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo	Significativo	No significativo	Significativo

El análisis de química sanguínea no muestra diferencias estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

La prueba de Tukey realizada al 0.05% de significancia muestra diferencia estadísticamente significativa en los valores de ácido úrico y creatinina a los 45 días con respecto a día cero. Proteínas totales, albumina fosfatasa y alcalina muestra diferencia significativa del día 45 y 90 con respecto al día cero. Muestra diferencia significativa los valores de ácido úrico, creatinina, proteínas totales, ASAT, albumina del día 90 con respecto al día 45. Adviértase que la diferencia significativa encontrada es similar tanto en el grupo testigo como en el resto de los grupos. Esta diferencia se atribuye al mismo proceso de crecimiento de los animales en experimentación y no a algún proceso tóxico adjudicado a la administración de las diferentes concentraciones de la nano plata, lo que significa que no produce efectos a nivel hepático y renal.

CUADRO No 9. MEDIAS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR ($\bar{X} \pm SD$) DE QUÍMICA SANGUÍNEA EN RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) TRATADAS CON NANO PLATA (lote satélite). LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICO. UNIDAD ONCOLÓGICA PROVINCIAL SOLCA RIOBAMBA. MAYO-SEPTIEMBRE 2008.

Parámetro	Días	Testigo	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta
Acido úrico mg/dL	0	0.94 ± 0.27	1.09 ± 0.48	1.09 ± 0.08	1.35 ± 0.12	0.94 ± 0.28
	45	1.74 ± 0.16	1.54 ± 0.29	1.24 ± 0.57	1.27 ± 0.31	1.27 ± 0.58
	90	0.32 ± 0.00	0.21 ± 0.11	0.21 ± 0.11	0.42 ± 0.38	0.18 ± 0.12
	118	0.47 ± 0.40	0.28 ± 0.35	0.28 ± 0.00	0.28 ± 0.25	0.34 ± 0.19
Albumina (2.9 – 5.9) g/dL	0	3.5 ± 1.3	3.7 ± 1.3	3.7 ± 1.5	3.6 ± 1.5	3.5 ± 1.7
	45	4.0 ± 0.4	4.6 ± 0.1	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3
	90	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2
	118	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.4 ± 0.3	3.2 ± 0.1	3.5 ± 0.1
Colesterol (50 – 100) mg/dL	0	80.5 ± 18.8	71.1 ± 23.2	61.8 ± 3.7	70.3 ± 11.4	62.6 ± 6.6
	45	98.5 ± 31.5	101.6 ± 51.8	70.4 ± 10.3	82.0 ± 16.9	90.1 ± 29.6
	90	71.6 ± 13.4	85.4 ± 34.8	61.7 ± 11.8	73.9 ± 10.8	67.2 ± 17.6
	118	80.5 ± 25.6	94.8 ± 25.8	60.7 ± 6.4	66.1 ± 13.0	65.3 ± 20.3
Creatinina (0.4 – 1.4) mg/dL	0	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.3
	45	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2
	90	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	118	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Proteínas Totales (4.5 – 8.4) g/dL	0	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.4 ± 1.4	5.5 ± 0.8	5.3 ± 0.6
	45	8.3 ± 0.2	8.4 ± 0.9	8.3 ± 0.7	8.0 ± 1.2	8.6 ± 0.9
	90	7.1 ± 0.1	7.4 ± 0.5	7.1 ± 0.3	7.2 ± 0.2	7.2 ± 0.3
	118	6.6 ± 0.5	7.0 ± 0.3	6.8 ± 0.8	6.5 ± 0.3	6.9 ± 0.3
ALAT (52 – 224) U/L	0	67 ± 13	53 ± 12	71 ± 17	65 ± 21	54 ± 19
	45	52 ± 5	49 ± 9	55 ± 11	57 ± 18	54 ± 12
	90	51 ± 2	46 ± 8	46 ± 4	42 ± 2	48 ± 16
	118	57 ± 3	51 ± 10	60 ± 15	67 ± 24	72 ± 36
ASAT U/L	0	104 ± 3	111 ± 10	120 ± 12	114 ± 14	107 ± 17
	45	123 ± 13	122 ± 12	116 ± 21	123 ± 12	121 ± 28
	90	119 ± 44	112 ± 18	113 ± 22	105 ± 7	99 ± 7
	118	118 ± 28	102 ± 28	104 ± 26	115 ± 21	125 ± 27
Fosfatasa Alcalina U/L	0	195 ± 5	258 ± 100	218 ± 80	220 ± 89	236 ± 10
	45	165 ± 65	105 ± 24	128 ± 47	122 ± 54	125 ± 20
	90	120 ± 32	70 ± 14	108 ± 25	111 ± 26	109 ± 15
	118	122 ± 29	77 ± 17	120 ± 24	147 ± 67	149 ± 75
Gamma GT U/L	0	1.7 ± 0.7	3.4 ± 2.6	1.9 ± 1.1	2.3 ± 0.5	1.5 ± 0.6
	45	1.7 ± 1.3	2.3 ± 1.2	1.5 ± 1.1	0.8 ± 0.2	1.6 ± 0.7
	90	4.2 ± 2.5	2.2 ± 0.3	1.6 ± 0.7	3.1 ± 1.4	1.9 ± 1.2
	118	3.0 ± 1.9	1.7 ± 0.9	2.4 ± 2.0	5.7 ± 4.6	4.2 ± 0.1

CUADRO No 10: TUKEY (HSD) / ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS. PARÁMETROS DE QUÍMICA SANGUÍNEA

Día	Acido úrico	Proteínas totales	Fosfatasa Alcalina	Gamma GT	Albumina	ALAT	ASAT	Creatinina	Colesterol
0 ~ 45	Significativo	Significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo
0 ~ 90	Significativo	No significativo	Significativo	No significativo	No significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo
0 ~ 118	Significativo	No significativo	Significativo	No significativo	No significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo
45 ~ 90	Significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo
45 ~ 118	Significativo	Significativo	No significativo	Significativo	Significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo
90 ~ 118	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo

El análisis de química sanguínea no muestra diferencias estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. La prueba de Tukey realizada al 0.05% de significancia muestra diferencia estadísticamente significativa en los valores de ácido úrico y fosfatasa alcalina a los 45, 90 y 118 días con respecto a día cero y día 45. Proteínas totales muestra diferencia significativa el día 45 con respecto al día cero. Los valores de albumina y gamma GT en el día 90 hubo con respecto al día cero hubo una variación estadísticamente significativa. Los valores de ALAT en el día 90 hubo con respecto al día cero hubo una variación estadísticamente significativa.

Adviértase que la diferencia significativa encontrada es similar tanto en el grupo testigo como en el resto de los grupos. Esta diferencia se atribuye al mismo proceso de crecimiento de los animales en experimentación y no a algún proceso tóxico adjudicado a la administración de las diferentes concentraciones de la nano plata, lo que significa que no produce efectos a nivel hepático y renal.

CUADRO No 11. RESULTADO HISTOPATOLÓGICO DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) DEL ESTUDIO DE TOXICIDAD SUB-CRÓNICA DE NANO PLATA. LABORATORIO HISTOPATOLÓGICO DR. OSWALDO DUQUE A. RIOBAMBA. NOVIEMBRE 2008.

Grupo	Muestra	Estómago		Hígado			Riñón	
		Glándulas gástricas	Luz glandular	Lobulillos hepáticos	Canaliculos biliares	Espacios porta	Glomérulos	Túbulos renales
Testigo	01	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	06	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	11	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	16	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	21	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	26	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
Blanco	02	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	07	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	12	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	17	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	22	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	27	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
0.1 mg/Kg/día	32	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	03	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	08	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	13	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	18	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	23	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
0.2 mg/Kg/día	28	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	33	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	04	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	09	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	14	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	19	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
0.4 mg/Kg/día	24	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	29	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	34	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	05	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	10	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	15	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
0.4 mg/Kg/día	25	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	30	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	35	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal

El análisis histopatológico no muestra alteraciones histológicas y celulares en ningún animal de los diferentes grupos de tratamiento como testigo, control y las distintas concentraciones de nano plata.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Los parámetros analizados de peso corporal no presentaron alteraciones en el crecimiento normal del animal durante los 90 días de administración de la suspensión de nano plata, ni en el grupo satélite durante los 28 días de recuperación (Cuadro 1 y 2)
2. Los datos clínicos demuestran que, la nano plata al ser administrada durante 90 días no presenta toxicidad alguna. Debido a que los resultados obtenidos tanto de química sanguínea y hematológicos se encuentran dentro de los límites y condiciones normales de los animales de experimentación, lo que demuestra que la nano plata es un elemento seguro y eficaz que puede ser administrado sin temor a cualquier efecto toxico (Cuadro 3, 5, 7 y 9).
3. En el análisis histopatológico no se apreciaron alteraciones histológicas y citológicas, ni acumulación en hígado, riñón y estómago. No se presentaron signos de toxicidad ni mortalidad como consecuencia de la administración de la nano plata (Cuadro 11).
4. La administración por vía oral de la suspensión de nano plata no causa toxicidad subcrónica en ratas Wistar a una concentración de 100 ppm, lo que confirma la hipótesis (Cuadro 1, 3, 5, 7, 9, 11)

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

- Los procedimientos que pueden causar dolor o angustia momentánea o mínima a los animales de experimentación deben ser realizados con sedación, analgesia o anestesia, de acuerdo al código de ética y siguiendo la técnica de las 3'Rs diseñadas por Rusbell y Bruch.
- Los resultados del estudio se debe tratar de difundir hacia el equipo de salud y en especial a los médicos, pues como se ha visto la nano plata no causa toxicidad vía oral y puede ser una alternativa para la mayoría de microorganismos resistentes a los antimicrobianos convencionales que además de causar resistencia causan muchos efectos secundarios.
- Los estudios de toxicidad sub-crónica realizados demuestran que la suspensión de nano plata no presentan toxicidad alguna, pero esto no garantiza que este producto sea seguro cuando se administre por largos periodos de tiempo. Por lo cual se recomienda realizar estudios de toxicidad crónica de este producto para garantizar su uso por mayores periodos de tiempo.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

Los estudios de nano plata que se están realizando en beneficio de la salud no tienen un sustento científico que garantice la seguridad en el uso de este producto a largo plazo, por lo que se planteó el estudio de toxicidad sub-crónica a 90 días en ratas Wistar de ambos sexos del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH. Los métodos empleados fueron los descritos por las normas OECD, distribuyendo aleatoriamente en 5 grupos: grupo testigo al que no se administró ninguna sustancia, grupo control al que se administro agua como vehículo y 3 grupos tratados con la suspensión de nano plata en dosis de 1, 2 y 4 mL de 25 ppm, que corresponde a una dosis acumulada de 9, 18 y 36 mg/Kg respectivamente. Se determinaron los signos tóxicos y peso corporal semanalmente. Se evaluó los indicadores hematológicos (hemoglobina, hematocrito, plaquetas, recuento total de leucocitos y recuento total de eritrocitos), química sanguínea (ácido úrico, albumina, colesterol, creatinina, proteínas totales, ALAT, ASAT, fosfatasa alcalina y gamma GT). También se realizó el examen histopatológico de órganos y tejidos (hígado, estómago y riñones). El comportamiento de los animales, signos tóxicos, mortalidad no fueron afectados por la administración de la suspensión de nano plata en ninguno de los ensayos. Los parámetros analizados de peso corporal, hematología, química sanguínea y análisis histopatológicos de órganos y tejidos no evidenciaron toxicidad significativa atribuible a la sustancia de prueba.

SUMMARY

The nano-silver studies carried out for the health benefit do not have a scientific background guaranteeing the use safety of this product at a long range. This is why the sub-chronic toxicity study was stated over a 90-day period in Wistar rats of both sexes from the Biotechnology of the Pharmacy Biochemistry school of the ESPOCH. The methods were described by OECD norms distributing at random into 5 groups: control group which was not given any substance, control group which was given water as a vehicle and 3 groups treated with the nano-silver suspension in dosages of 1, 2 and 4 mL of 25 ppm, corresponding to an accumulated dosage of 9, 18 and 36 mg/kg respectively. The toxic signals and body weight were determined weekly. The hematological indicators (hemoglobin, hematocrit, blood platelets, total re-counting of leucocytes and total re-counting of erythrocytes), blood chemistry (uric acid, albumin, cholesterol, creatinin, total proteins, ASAT, ALAT, alkaline phosphatase and GT gamma) were determined. The histopathological exam of the organs and tissues (liver, stomach and kidneys) was also carried out. The animal behavior, toxic signals and mortality were not affected by the nano-silver suspension administration on any trial. The analyzed parameters of the body weight, hematology, blood chemistry and histopathological analyses of the organs and tissues did not show any significant toxicity of the test substance.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ANJOS, M. y otros. 2006. Pequeño glosario de nanotecnología: ciencia y tecnología. Brasil: s. ed. pp. 20 .
2. ARTÍCULO DE NANOPLATA
http://www.buenasiembra.com.ar/salud/articulos/plata_coloi.htm
20070512
3. AVANCES TECNOLÓGICOS: Nanopartículas de plata
http://www.euroresidentes.com/Blogs/avances_tecnologicos/avances.htm
20080606
4. ASTOLFI, E. 1988. Toxicología de Pregrado. Buenos Aires: Libreros López.
pp. 668 – 670
5. BIOEQUIVALENCIA
http://a257.g.akamaitech.net/7/257/2422/01apr20051500/edocket.access.gpo.gov/cfr_2005/aprqr/21cfr320.1.htm
20050401
6. BURNSURGERY.ORG
<http://www.burnsurgery.org/Modules/nano/toc.htm>
20060605

7. DANIEL, F. EDICIONES ESPECIALES.

[http://www.edicionesespeciales.elmercurio.com/destacadas/detalle/index.asp?
20060210](http://www.edicionesespeciales.elmercurio.com/destacadas/detalle/index.asp?20060210)

8. DA SILVA, C. Com ciência nanociência & nanotecnologia.

<http://comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano10.htm>.
20070609

9. DEMLING, R. BURREL. The beneficial effects of nanocrystalline silver as a typical antimicrobial agent

<http://www.cesil.com/leaderforchemist/chemist.htm>
20070606

10. DRAKE¹, P. HAZELWOOD¹, K: Efectos de salud Exposición-Relacionados de la plata y de los compuestos de la plata: Una revisión

www.oxfordjournals.org/&prev=/search
20051706

11. EL PORTAL DE TECNOLOGÍAS: La nano protección de plata de Samsung

[http://www.vnunet.es/Actualidad/Reportajes/Informática_personal/Mundodigit
al](http://www.vnunet.es/Actualidad/Reportajes/Informática_personal/Mundodigital)
20070622

12. ELAN

<http://www.elan.com/EDT/nanocrystal%5Ftechnology/>.
20070621

13. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD.

<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/toc05a.htm>
20070208

14. ETC GROUP. 2002. No es poca cosa: las partículas nanotecnológicas penetran las células vivas y se acumulan en los órganos animales. USA. pp. 10 .
www.etcgroup.org
20070822
15. ETC GROUP. 2003. El tamaño sí importa: nueva información provee mayor evidencia para implementar una moratoria sobre las nanopartículas sintéticas. USA. 8 p.
www.etcgroup.org
20070822
16. ETC GROUP. 2005. Manual de bolsillo en tecnologías nanoescalares y la “Teoría del Little BANG”. USA. pp. 16.
www.etcgroup.org
20071024
17. ETC GROUP. 2005. Potenciales repercusiones de las nanotecnologías en los mercados de productos básicos: consecuencias para los países en desarrollo dependientes de productos básicos. USA. pp. 12 .
www.etcgroup.org
20081013
18. ETC GROUP. 2006. Medicina nanológica: aplicaciones médicas de las nanotecnologías: ¿cuál es su impacto en las comunidades marginadas?. USA. pp. 10.
www.etcgroup.org
20081013
19. ETC GROUP. 2008. Organic pioneer says no to nano ETC group welcomes world’s first nano-free standard. USA. pp. 10.
www.etcgroup.org
20080314

20. FRIENDS OF THE EARTH: Del laboratorio a nuestros platos nanotecnología en la agricultura & Alimentación
<http://www.foeeurope.org/activities/nanotechnology/index.htm>
20080310
21. GARNETT, M. and KALLINTERI, P. 2006. Nanomedicines and Nanotoxicology: some physiological principles. Madrid: Island Press. pp. 307-311.
22. GOSSELIN, R.; SMITH, R and HODGE, H. 1984. Clinical Toxicology of Commercial Products. Baltimore: Williams & Wilkins. pp. 125 - 128
23. HAUSER, R. Tecnologías emergentes "BING" (Bio, Info, Nano, Gno) nanomedicina: fármacos de pequeña escala.
<http://www.tecnologiasemergentes.blogspot.com/>.
20070405
24. KLAASEN, C. AMDUR. M. DOULL, J. 1986. Casarett and Dull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. New York: Macmillan. pp. 15
25. MARY, C. et.al. 2005. Nanotech meets the FDA: a success story about the first nanoparticulate drugs approved by the FDA. Nanotechnology Law & Business. USA. (2): 2. Diciembre
26. MATEU, J. y LÓPEZ E. 1967. et al. Síntesis Toxicológica. Valencia: Departamento Laboratorio Substancia S.A. pp. 20
27. MELCHIZEDEK, D. Nanosilver.
<http://www.teohua.org/nanosilv.htm#top>.
20070403

28. MILLER, G. SENJEN, R: 2007. Nanotecnologías en la alimentación y agricultura.
http://www.science.doe.gov/bes/Scale_of_Things_26
20080420.
29. MOLLUSCUM.COM: Una historia corta del uso de la plata en medicina
<http://www.molluscum.com/order.php&prev>
20070222
30. NANOTEK: El diminuto mundo de los grandes desafíos
<http://www.nanoteksa.com/seccion.asp?IdSeccion=1&i=es>
20060920
31. NANO-TECNOLÓGICA: ¿Destruir células cancerígenas en 10 días?
<http://www.nanotecnologica.com/¿destruir-celulas-cancerigenas-en-10-dias/>
20081006
32. NANO-TECNOLÓGICA: Regeneración del tejido nervioso mediante nanofibras.
<http://www.nanotecnologica.com/regeneracion-del-tejido-nervioso-mediante-nanofibras>
20070424
33. ORTEGA, R: ISO y nuevos estándares en la definición de terminología nanotecnológica
<http://www.nanotecnologica.com/iso-y-nuevos-estandares-en-la-definicion-de-terminologia-nanotecnologica/>
20081112
34. ORTEGA, R. Nuevos recubrimientos protectores que se autoreparan
<http://www.nanotecnologica.com/nuevos-recubrimientos-protectores-que-se-autoreparan/>
20081219

35. POLITI, M. ISOLABELLA, D. 2007. Farmacología clínica. Desarrollo de nuevos medicamentos: desde la invención hasta la farmacia.
mailto:cteamwebmaster@yahoo.com.ar
20081006
36. PLATA COLOIDAL
http://www.mantra.com.ar/contenido/zona1/frame_coloide.html
20070512
37. QSI-Nano® silver.pdf.
www.qsinano.com
20071010
37. RAMACHANDRAN. Token gesture for nanoscience.
<http://www.flonnet.com/stories/20060714003911300.htm>.
20060726
39. RENTON, A. 2006. Welcome to the world of nanofoods. Guardian Unlimited.
Reino Unido. 13 de diciembre de 2006.
http://observer_guardian.co.uk/foodmonthly/futureoffood/story/0,1971266,00.html
20070117
40. REPETTO, M. 1997. Toxicología Fundamental. 3ª edición. Madrid: Díaz de Santos. pp. 50-56
41. REPETTO M, SANZ P. 1993. Glosario de términos usados en Toxicología. Recomendaciones de la IUPAC. Madrid: Díaz de Santos. pp. 90
42. REVISTAS DE SALUD. Es de plata la nueva contrabiótico?
<http://www.automaticbuilder.com/bt53692/silver/>
20081002

43. REVISTA MÉDICA DE CHILE: Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco.
<http://www.scielo.cl/cgi-bin/wxis.exe/iah/?IsisScript=iah/iah.xis&base=article^drmc&index=KW&format=iso.pft&lang=e&limit=0034-988720010115>
44. SCHAPIRO, M. 2003. Blowback in genetic engineering. In Lightman, A., Sarewitz, D., Desser, C. Living with the genie. Washington D.C.: Island Press.
45. SILVER NANO HEALTH SYSTEM
<http://www.samsung.com/ph/silvernano/aircon.html>
20051014
46. SILVIA R. Balas de plata tóxicas Grupo ETC
<http://www.ecoportal.net/content/advancedsearch/?SearchText=Ribeiro&SearchContentClassID%5B%5D=2&SearchContentClassAttributeID%5B%5D=193&SearchSectionID%5B%5D=1&SubTreeArray%5B%5D=211&SubTreeArray%5B%5D=231>
2008117
47. SOLÓRZANO, H. Un antibiótico universal; la plata coloidal.
<http://www.hector.solorzano.com/articulos/platacoloidal.html>.
20060625
48. TECNOLOGÍA DE NANO PLATA:
<http://www.nanobiosilver.com/applications.html>
20080810
49. TORIKAI, D. 2008. Ciência e tecnologia para o mundo das dimensões nanométricas. Brasil. pp. 50.

50. TOXICOLOGÍA: Definiciones básicas

http://www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/pagina_inici.htm
20020527

51. TOXICOLOGY OF COLLOIDAL SILVER.

<http://www.clspress.com/export2/colloidalsilver.exe>
20050206

52. UN ANTIBIÓTICO UNIVERSAL - Ir Ir microsilver la plata nanoporoso

<http://www.lr-espana.info/microsilver/lr-microsilver-antibiotico-universal.htm>
Health & Beauty Systems, 2006.
20080608

53. VALLE, P. LUCAS, B. 2000. Toxicología de alimentos. México- D.F. pp. 10-16

54. YAN, J. CHENG, J. 2002. Nanosilver containing antibacterial granules and methods for preparing and using the same. Pub. no: US 6,379,712 B1. USA. pp. 14 .

Abril
<http://www.freepatentsonline.com/6379712.html>.
20080606

55. YAN, J. CHENG, J. 2003. Antimicrobial yarn having nanosilver particles and methods for manufacturing the same. Pub. no: US 2003/0190851 A1. USA. pp. 14.

<http://www.freepatentsonline.com/20030190851.html>.
20080610

56. YAN, J. CHENG, J. 2003. Colloidal nanosilver solution and method for making the same. Pub. no.: US 2003/0185889 A1. USA. pp. 14 .

<http://www.freepatentsonline.com/20030185889.html>.
20070612

CAPÍTULO VII

8. ANEXOS

ANEXO No 1



FOTOGRAFÍA No 1: RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) USADAS EN EL ESTUDIO DE TOXICIDAD SUB-CRÓNICA DE LA SUSPENSIÓN DE NANO PLATA. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. MAYO-SEPTIEMBRE 2008.

ANEXO No. 2



FOTOGRAFÍA No 2: MATERIAL USADO PARA LA EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. MAYO-OCTUBRE 2008.

ANEXO No 3



FOTOGRAFÍA No 3: PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGÜÍNEAS. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. MAYO-OCTUBRE 2008.

ANEXO No 4



FOTOGRAFÍA No 4: MATERIAL USADO EN LA ADMINISTRACIÓN DE NANO PLATA. BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. MAYO-SEPTIEMBRE 2008.

ANEXO No 5



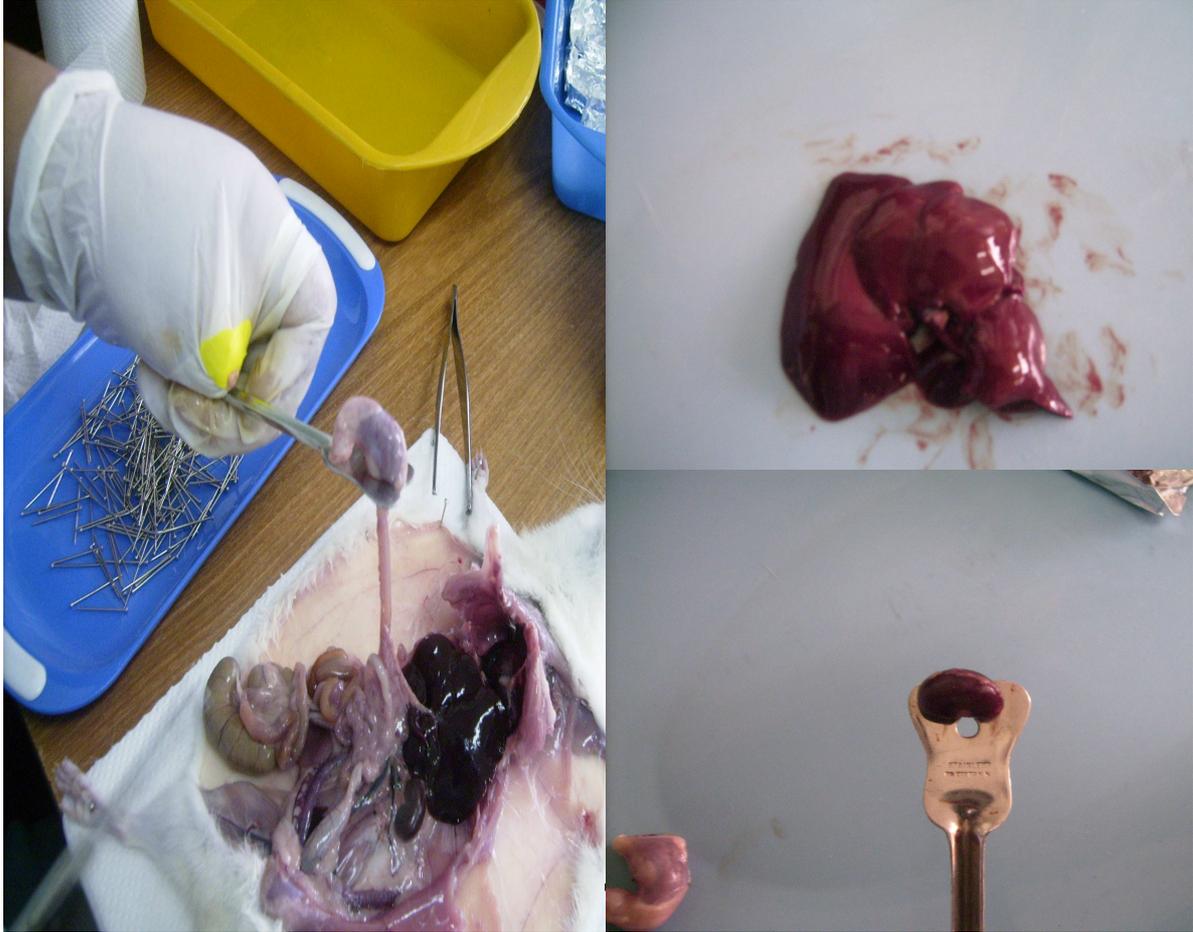
FOTOGRAFÍA No 5: INMOVILIZACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE NANO PLATA EN RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. MAYO-SEPTIEMBRE 2008.

ANEXO No 6



FOTOGRAFÍA No 6: DISECCIÓN DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. OCTUBRE 2008.

ANEXO No 7



FOTOGRAFÍA No 7: EXTIRPACIÓN DE LOS ÓRGANOS (RIÑONES, HÍGADO Y ESTÓMAGO) DE RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*). BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. ESPOCH. OCTUBRE 2008.

LABORATORIO HISTOPATOLÓGICO DR. OSWALDO DUQUE A.

Dirección: Orozco # 3013 y Juan Montalvo

Telf.: 2964262

Fax: 2968312

E-mail: oduque@esPOCH.edu.ec

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

HISTOPATÓLOGO: Dr. Oswaldo Duque A.

TESISTA: Bolívar Ocaña P.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Treinta y Cuatro (34) muestras histopatológicas provenientes de ratas Wistar (estómago, hígado y riñón).

FECHA DE ANÁLISIS: Riobamba 8 de noviembre de 2008

Grupo	Muestra	Estómago		Hígado			Riñón	
		Glándulas gástricas	Luz glandular	Lobulillos hepáticos	Canalículos biliares	Espacios porta	Glomérulos	Túbulos renales
Testigo	01	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	06	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	11	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	16	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	21	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	26	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
Blanco	02	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	07	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	12	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	17	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	22	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	27	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	32	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal

0,1 mg/Kg/día	03	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	08	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	13	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	18	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	23	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	28	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	33	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
0,2 mg/Kg/día	04	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	09	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	14	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	19	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	24	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	29	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	34	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
0,4 mg/Kg/día	05	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	10	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	15	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	25	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	30	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal
	35	Normal	No deposito	Sin depósito	Normal	Normal	Sin deposito	Normal

.....
Dr. Oswaldo Duque A.
Histopatólogo

