



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

García, Lorena R.

Estudios fisicoquímicos, microbiológicos y nanotoxicológicos de nanopartículas de plata



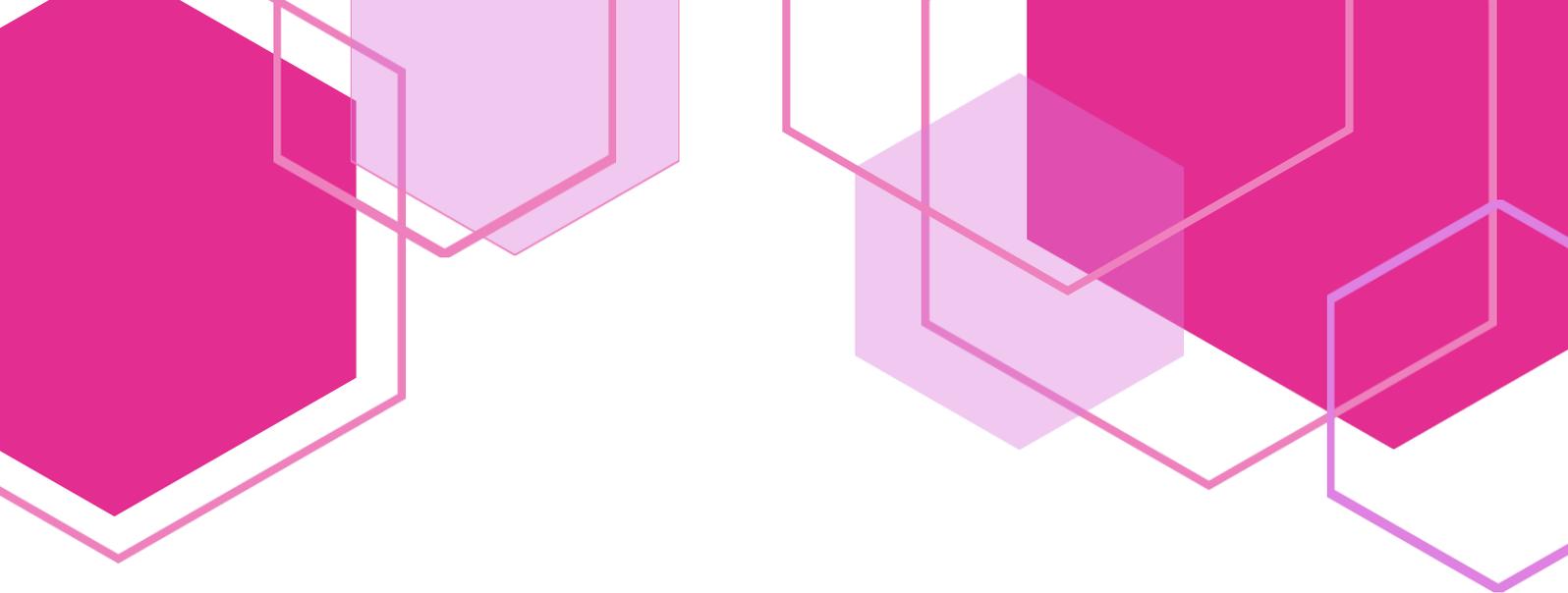
Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

García, L. R. (2023). *Estudios fisicoquímicos, microbiológicos y nanotoxicológicos de nanopartículas de plata. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4229>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
LABORATORIO DE BIO-NANOTECNOLOGÍA

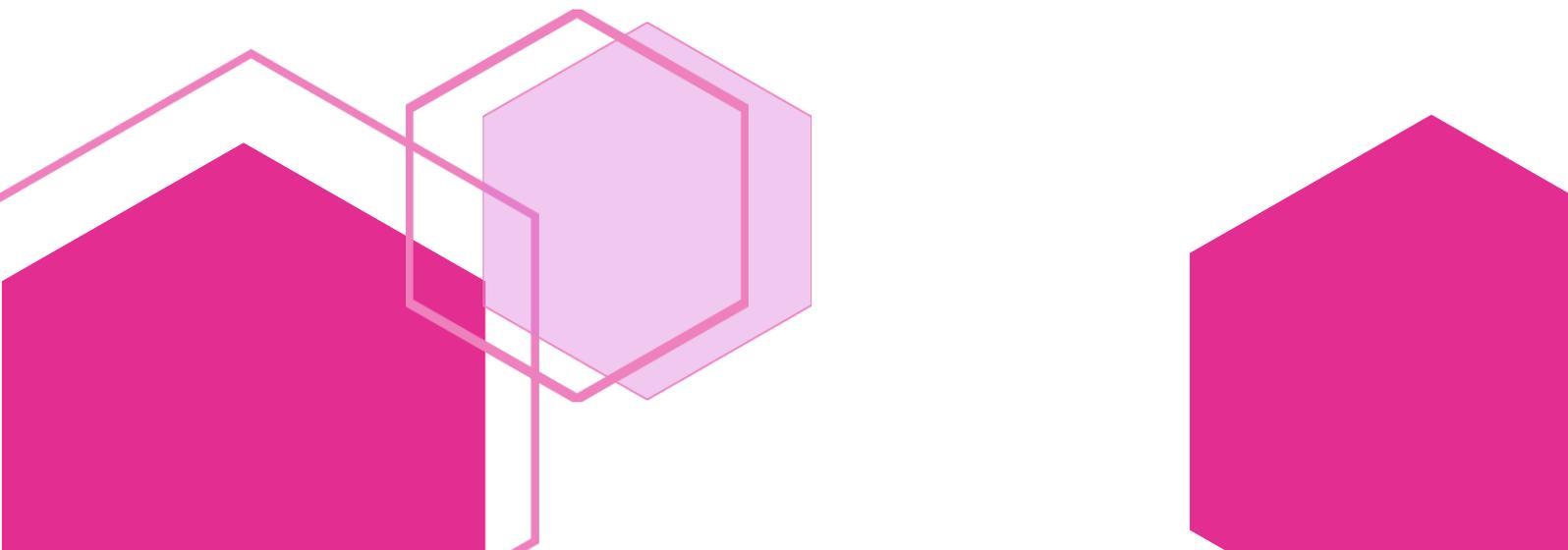
ESTUDIOS FÍSICOQUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS Y NANOTOXICOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

LORENA R. GARCÍA

DIRECCIÓN: DRA. M. JIMENA PRIETO
CO-DIRECCIÓN: LIC. AYELEN M. SOSA

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN DE LA LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

2022



BECAS RECIBIDAS

- ♥ **Becas de entrenamiento 2021 (BENTR2022)**, financiada por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). Período abril 2022 – abril 2023.
- ♥ **Becas de Formación en la Investigación para Estudiantes en etapa final de Carrera de Grado (BeFI)**, financiada por la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). Período junio 2021 – marzo 2022.
- ♥ **Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC)**, financiada por el Consejo Interuniversitario Nacional (CIN). Período agosto 2020 – mayo 2021.

PARTICIPACIÓN Y PRESENTACIÓN EN EVENTOS CYT

- ♥ **IV Jóvenes Bionanocientíficxs (JoBioN)**: 23 y 24 de noviembre de 2022.
- ♥ **II Reunión Científica Internacional, VII Reunión Científica Regional y VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACyTAL)**: 27, 28 y 29 de octubre de 2021.
- ♥ **IV Jornadas de Investigadores en Formación en Ciencia y Tecnología – UNQ**: 25, 26 y 27 de marzo de 2021.
- ♥ **II Jornadas de Jóvenes Bionanocientíficxs (JoBioN)**: 23 y 24 de junio de 2020.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| GLOSARIO | 6 |
| OBJETIVOS | 8 |
| RESUMEN | 10 |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | 14 |
| NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES | 14 |
| PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES | 15 |
| NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE COBRE Y DE PLATA | 17 |
| NANOPARTÍCULAS DE COBRE | 17 |
| NANOPARTÍCULAS DE PLATA | 17 |
| MICROBIOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS | 18 |
| CEPAS BACTERIANAS DE INTERÉS CLÍNICO | 18 |
| <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> | 18 |
| <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 18 |
| <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> | 19 |
| ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE COBRE Y DE PLATA | 19 |
| NANOTOXICOLOGÍA | 20 |
| EL MODELO ANIMAL ZEBRAFISH PARA ESTUDIOS NANOTOXICOLÓGICOS | 22 |
| TOXICIDAD EN EL DESARROLLO | 25 |
| NEUROTOXICIDAD | 25 |
| CARDIOTOXICIDAD | 25 |
| HEPATOTOXICIDAD | 26 |
| CAPÍTULO 2: ESTUDIOS FÍSICOQUÍMICOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS | 30 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| CONCLUSIONES PARCIALES | 34 |
| CAPÍTULO 3: ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS | 38 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 38 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 41 |

| | |
|---|-----------|
| CONCLUSIONES PARCIALES | 46 |
| CAPÍTULO 4: ESTUDIOS NANOTOXICOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LARVAS DE ZEBRAFISH | 50 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 50 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 56 |
| CONCLUSIONES PARCIALES | 60 |
| CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES FINALES | 64 |
| CAPÍTULO 6: PERSPECTIVAS A FUTURO | 68 |
| REFERENCIAS | 70 |
| AGRADECIMIENTOS | 76 |

GLOSARIO

- ♥ AgNPs: Nanopartículas de plata
- ♥ BRP: Banda de resonancia plasmónica superficial
- ♥ CBM: Concentración Bactericida Mínima
- ♥ CIM: Concentración Inhibitoria Mínima
- ♥ CuNPs: Nanopartículas de cobre
- ♥ DLS: Dispersión dinámica de la luz
- ♥ dpf: Día post fecundación
- ♥ hpi: Hora post incubación
- ♥ LBN: Laboratorio de Bio-Nanotecnología
- ♥ NH: Necrosis hepática
- ♥ NMs: Nanomateriales
- ♥ NPMs: Nanopartículas metálicas
- ♥ NPs: Nanopartículas
- ♥ NSV: Necrosis del saco vitelino
- ♥ PDI: Índice de polidispersidad
- ♥ TEM: Microscopía electrónica de transmisión
- ♥ VNC: Vitelo no consumido
- ♥ VND: Vejiga natatoria desinflada
- ♥ ZP: Potencial zeta

OBJETIVOS

El objetivo general del presente seminario de investigación es la caracterización fisicoquímica, microbiológica y nanotoxicológica de nanopartículas metálicas de cobre (CuNPs) y de plata (AgNPs) que a futuro se incorporarán en emulsiones de aceite en agua (o/w) para su aplicación como antimicrobianos en el tratamiento de lesiones cutáneas.

De manera específica, se propone:

- (i) Evaluar estabilidad, estado de aglomeración, tamaño y morfología de nanopartículas metálicas.
- (ii) Hallar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de nanopartículas metálicas en *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).
- (iii) Estudiar toxicidad generalizada (mortalidad y cambios morfológicos) y toxicidad tejido-específica (neurotoxicidad, cardiotoxicidad y hepatotoxicidad) de nanopartículas metálicas en larvas de *zebrafish*.

RESUMEN

En los últimos años, el uso excesivo e indiscriminado de los antibióticos junto con la adquisición y diseminación de genes de resistencia antibiótica, han resultado en la aparición de bacterias multirresistentes que vuelven ineficientes las opciones de tratamiento convencional y aumentan la morbilidad y mortalidad en enfermedades infecciosas. En este sentido, con la creciente investigación en el campo de la nanotecnología, se ha informado que varios nanomateriales poseen propiedades antimicrobianas excepcionales, pudiendo inhibir o eliminar el crecimiento de una gran parte de microorganismos. Entre los nanomateriales que poseen estas características, se encuentran las nanopartículas metálicas, como las de cobre (CuNPs) y las de plata (AgNPs), que ya han demostrado ser efectivas en cepas bacterianas multirresistentes. Sin embargo, como los nanomateriales exhiben propiedades distintivas en comparación con sus equivalentes en la macroescala, se pueden producir interacciones impredecibles con los sistemas biológicos, y es por ello que resulta esencial un estudio nanotoxicológico que asegure que estas nanopartículas sean capaces de generar una respuesta apropiada en el hospedador sin producir efectos adversos. Para ello, el modelo animal *zebrafish* se ha convertido en uno de los modelos más frecuentes para evaluar nanotoxicidad, ya que permite evidenciar eventos dinámicos, interactivos y de múltiples órganos.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica, microbiológica y nanotoxicológica de nanopartículas metálicas con el fin de incorporarlas en emulsiones de aceite en agua para su utilización como antimicrobianos en el tratamiento de lesiones cutáneas. Fisicoquímicamente, se caracterizó tamaño, morfología, estado de aglomeración y estabilidad de CuNPs y AgNPs por microscopía electrónica de transmisión, dispersión dinámica de la luz, espectroscopía UV-Visible y potencial zeta. Los resultados revelaron que la muestra de CuNPs posee nanopartículas disgregadas, y que la muestra de AgNPs cuenta con una población moderadamente polidispersa de nanopartículas poco electronegativas con un tamaño promedio de 904 nm y variedad de morfologías. Microbiológicamente, se realizaron estudios de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y de Concentración Bactericida Mínima (CBM) de CuNPs y AgNPs en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las CuNPs demostraron una CIM de 30 ppm para *Pseudomonas aeruginosa*; y con las AgNPs se encontró una CIM de 30 ppm para *Pseudomonas aeruginosa* y una CIM de 8 ppm para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En adición, las concentraciones de 60 y 100 ppm de AgNPs resultaron bacteriostáticas en las tres cepas bacterianas. Nanotoxicológicamente, se estudió mortalidad, morfología, neurotoxicidad, cardiotoxicidad y hepatotoxicidad de AgNPs en *zebrafish*. Se observó que estas nanopartículas metálicas no produjeron anomalías morfológicas ni hepatotoxicidad en el modelo *zebrafish*; por otro lado, sí resultaron cardiotóxicas en todas las concentraciones ensayadas, y letales y neurotóxicas en altas concentraciones y a largo plazo.



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES

La nanotecnología se define como el diseño, la caracterización, la producción y la aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas cuyas forma y tamaño tienen al menos una dimensión en la nanoescala^{[1][2]}. Si bien muchos autores limitan el tamaño de los nanomateriales (NMs) a 50 o a 100 nm, el umbral de tamaño varía con el tipo de material. Por consiguiente, la definición legítima extiende este límite superior a 1 μm ^[1]. Algunos ejemplos de bioestructuras y de materiales de tamaño nanométrico se presentan en la **Figura 1-1**.

La aplicación de la nanotecnología a la medicina, llamada nanomedicina, se refiere al uso de materiales diseñados en esta escala de longitud para desarrollar aplicaciones de diagnóstico, imágenes, tratamiento y prevención de enfermedades^{[3][4]}. La nanomedicina abarca cinco áreas de trabajo principales^{[2][5][6]}:

- (1) Diseño y desarrollo de nanosistemas de *delivery* de drogas: incluye el uso de los NMs para construir sistemas de transporte y liberación controlada de drogas, péptidos, ácidos nucleicos y agentes para imágenes;
- (2) Desarrollo de técnicas de nano-imágenes: comprende nuevas técnicas que permitan el monitoreo en tiempo real de los procesos celulares y moleculares *in vivo*, con mayor sensibilidad y resolución.
- (3) Puesta a punto de técnicas analíticas y desarrollo de herramientas de diagnóstico *ex vivo* o *in vitro*: incluye procedimientos que permiten analizar tejidos normales o patológicos para mejorar el estudio de las enfermedades.
- (4) Generación de NMs y nanodispositivos para bioingeniería: abarca el estudio de materiales con propiedades novedosas y el desarrollo de sistemas multifuncionales que se puedan utilizar como implantes activos.
- (5) Transferencia del laboratorio a la clínica: contiene el escalado industrial, la validación de métodos, la revisión de aspectos regulatorios y la evaluación de seguridad (nanotoxicología).

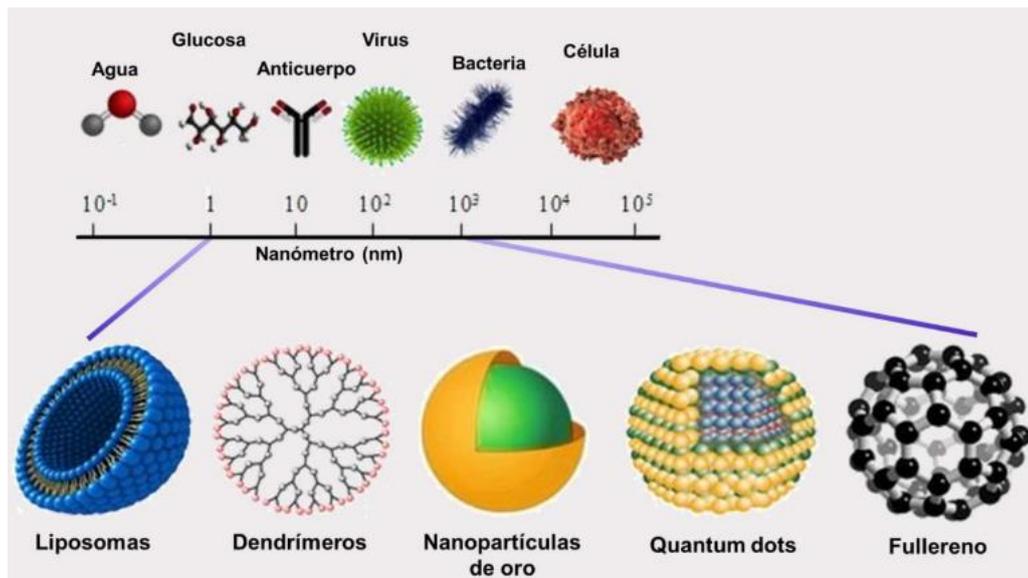


Figura 1-1. Escala nanométrica y ejemplos de nanoestructuras biológicas y nanotecnológicas. Ejemplos de nanomateriales, tales como liposomas, dendrímeros, nanopartículas de oro, *quantum dots* y fullerenos^[6].

1.1. PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES

Además del tamaño excepcionalmente pequeño que poseen los NMs, éstos presentan una elevada relación superficie-volumen, exhibiendo un número creciente de átomos individuales en su superficie en comparación con el número de átomos que quedan anclados en su interior^[7]. Estas características dan como resultado efectos de confinamiento cuántico y, en consecuencia, los materiales en la nanoescala presentan propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas, químicas, biológicas, fisicoquímicas, térmicas y magnéticas que son diferentes en comparación con sus equivalentes en la macroescala^{[7][8][9][10]}. En este contexto, los efectos de la gravedad y de la inercia se vuelven insignificantes en comparación con los de Van der Waals y las fuerzas electromagnéticas, haciendo que el comportamiento de los NMs quede controlado por las propiedades de la superficie (que son cercanas a la de los átomos libres) en lugar de las propiedades de volumen^[8].

Los NMs pueden clasificarse según su origen, sus dimensiones y su composición:

- ♥ Según su origen, los NMs pueden ser naturales o antropogénicos, y dentro de esta última categoría se pueden dividir en incidentales y de ingeniería, dependiendo de si su formación es intencional o no^[8].
- ♥ Según sus dimensiones, los NMs pueden tener una dimensión en la nanoescala (films, capas o superficies), dos dimensiones en la nanoescala (nanocables o nanotubos), o tres dimensiones en la nanoescala (nanopartículas (NPs), liposomas, dendrímeros, *quantum dots*, fullerenos, entre otros)^[10] (Véase **Figura 1-2**).
- ♥ Según su composición, los NMs pueden ser orgánicos (NPs lipídicas, liposomas, nanoemulsiones, nanogeles, dendrímeros, NPs poliméricas, micelas de polímeros,

ferritinas, fullerenos, cristales líquidos, entre otros) o inorgánicos (*quantum dots*, NPs metálicas (NPMs), NPs de óxidos metálicos, entre otras) (Véase **Figura 1-3**)^{[6][11][12]}.

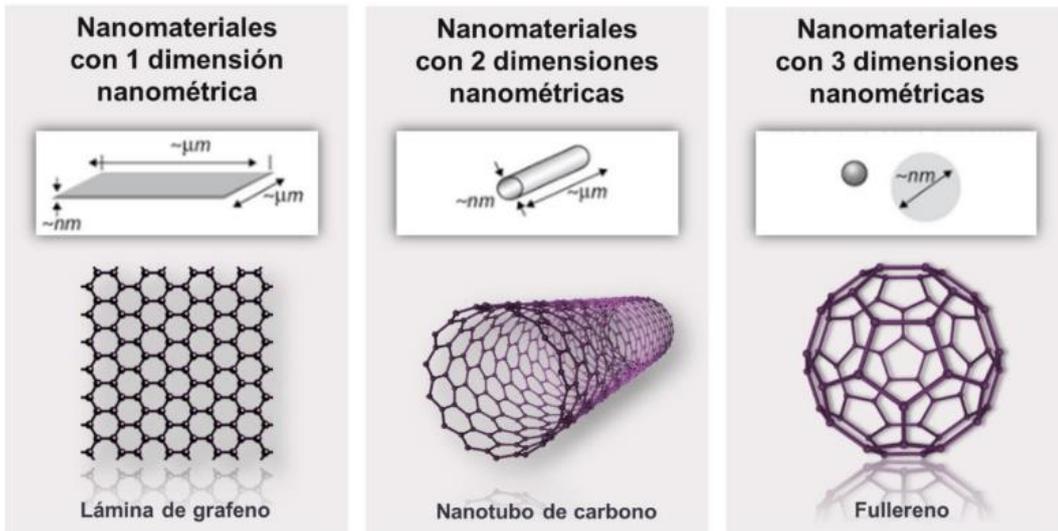


Figura 1-2. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones nanométricas. Imagen representativa de los NMs en las tres dimensiones^[6].

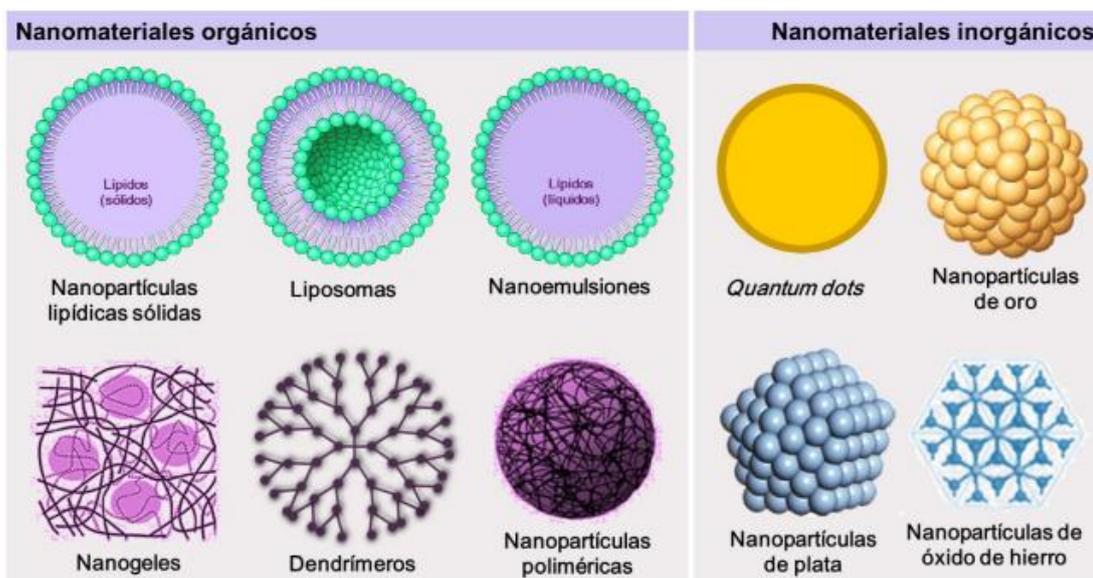


Figura 1-3. Clasificación de los nanomateriales según su composición^[6].

Las propiedades fisicoquímicas de las NPs pueden impactar significativamente en las propiedades biológicas de las mismas, tales como su comportamiento, biodistribución, seguridad y eficacia^[13]. Por lo tanto, la caracterización de las NPMs es esencial para evaluar los aspectos funcionales antes de la aplicación en seres humanos. Los rasgos característicos de los NMs como el tamaño, la forma, la distribución de tamaño, el área superficial, morfología superficial, la solubilidad y la agregación deben estudiarse antes de evaluar la toxicidad o la biocompatibilidad^{[14][15]}. Para evaluar a los NMs se han utilizado diversas técnicas analíticas. Las

técnicas espectroscópicas y difractográficas involucradas en la caracterización incluyeron espectroscopía ultravioleta visible (espectroscopía UV-Vis), difracción de rayos X (XRD), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía de dispersión de energía (EDS), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), espectroscopía Raman y dispersión dinámica de luz (DLS); estos métodos indirectos se utilizaron para analizar la composición, estructura y fase cristalina^{[13][15]}. Adicionalmente, se aplicaron técnicas directas como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM) para determinar el tamaño y las características morfológicas de las NPs^{[13][15]}.

1.2. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE COBRE Y DE PLATA

Las NPMs han sido foco de interés debido a sus notables propiedades y aplicaciones en diversos campos, como la medicina, la optoelectrónica, la catálisis, la detección química, la cosmética y, principalmente, en la industria de la salud como agentes antimicrobianos^[16]. Se ha demostrado que las NPMs de cobre (CuNPs) y de plata (AgNPs) exhiben propiedades antibacterianas, son efectivas en cepas bacterianas multirresistentes^{[17][18]} y poseen un perfil de baja toxicidad^[19].

1.2.1. Nanopartículas de cobre

El cobre es un mineral esencial para los organismos vivos ya que modula varios mecanismos de acción de citocinas y factores de crecimiento, posee potentes propiedades biocidas, inhibe eficazmente el crecimiento de bacterias, hongos, virus y algas y es metabolizable por el cuerpo humano^{[20][21]}. Las CuNPs se utilizan en el tratamiento de aguas, en el procesamiento de alimentos, en la industria eléctrica debido a su conductividad, en el campo de la química como lubricante y catalizador, como recubrimiento antimicrobiano en odontología, como aditivos en productos para la piel y en procesos de desinfección de virus^{[16][21]}.

1.2.2. Nanopartículas de plata

La plata se ha utilizado durante siglos debido a sus propiedades antibacterianas para fumigar agua potable, mejorar la cicatrización heridas y en el tratamiento de úlceras, infecciones cerebrales y oculares^[22]. Las AgNPs se usan ampliamente como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiinflamatorios, antitumorales, regenerativos, biosensores y catalizadores; se aplican en productos de la industria alimentaria, textil, perfumería, farmacéutica, agrícola, higiene, productos de limpieza, pinturas, electrónica y, más frecuentemente, en medicina para cubrir dispositivos médicos, preparar nanogeles y producir formulaciones para lesiones cutáneas^[23].

MICROBIOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

La falta de respuesta letal de microorganismos a fármacos con diferentes mecanismos de acción citotóxica se conoce como multirresistencia^[24], y es la razón del estado de enfermedad crónica y de la alta morbilidad y mortalidad^[25], por lo que se ha convertido en una preocupación primordial en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas^[24]. Dentro de los mecanismos que explican la resistencia a los antibióticos en las bacterias se pueden mencionar, la alteración de las proteínas diana de los fármacos, la degradación enzimática o inactivación del fármaco, la disminución de la permeabilidad de la membrana y el aumento del flujo de salida del fármaco^[24]. Aunque el uso excesivo de antibióticos es un factor importante en el desarrollo de la resistencia, la principal contribución se debe a la adquisición y diseminación de genes de resistencia a los medicamentos^[24], cuyo desarrollo ocurre en al menos tres pasos^[26]:

1. Adquisición de genes de resistencia, mediante transferencia horizontal de genes (transformación, conjugación y transducción), o mutaciones espontáneas de genes existentes.
2. Expresión de genes de resistencia, como respuesta a la exposición de fármacos antimicrobianos.
3. Selección de microorganismos que expresan genes de resistencia. La presión de selección a favor de la resistencia se produce cuando los microorganismos se exponen al fármaco, pero no se eliminan.

1.3. CEPAS BACTERIANAS DE INTERÉS CLÍNICO

1.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es un bacilo gramnegativo y uno de los patógenos oportunistas más comunes. Se suele encontrar en pacientes con infección pulmonar o heridas por quemaduras, y es un colonizador frecuente en dispositivos médicos como el catéter^[25]. La formación de *biofilms* y el sistema de *quorum sensing* durante el crecimiento bacteriano provocan un daño tisular significativo en el huésped y aumentan la competitividad de la bacteria, dando lugar a cepas multirresistentes^[27].

1.3.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo gramnegativo que forma parte de la microbiota normal del tracto intestinal del ser humano. Si bien la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas para el huésped, otras pueden causar infecciones intestinales y extraintestinales^[28], como diarreas, infecciones del aparato urinario y septicemia^[29]. *E. coli* es intrínsecamente susceptible a muchos agentes antimicrobianos; sin embargo, esta bacteria tiene una gran capacidad para acumular genes

de resistencia a través de la transferencia horizontal de genes, los cuales son los responsables de los fracasos del tratamiento en medicina humana^[28].

1.3.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un coco grampositivo que forma parte de la microbiota comensal humana^[30]. No obstante, es una de las causantes de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria, ya que debido a su capacidad de formación de *biofilms*, actúa como un colonizador temprano al evadir la acción de agentes antimicrobianos^[30]. Por consiguiente, puede causar una variedad de enfermedades que van desde infecciones menores en la piel y los tejidos blandos hasta enfermedades potencialmente mortales como sepsis, endocarditis infecciosa o síndrome del shock tóxico^[31]. *S. aureus* ha demostrado varios mecanismos de resistencia a los antibióticos, algunos de ellos transmitidos por plásmidos^[30].

1.4. ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE COBRE Y PLATA

Los recientes avances en medicamentos basados en nanotecnología han abierto nuevos horizontes para combatir la multiresistencia de los microorganismos a los fármacos convencionales^[32]: las NPMs pueden dirigirse a diversas biomoléculas y microbios que comprometen el desarrollo de cepas multiresistentes^[21]. Las NPMs poseen múltiples mecanismos antimicrobianos que actúan en simultáneo, por lo que para que las bacterias desarrollen resistencia contra éstos, deben actuar sobre todos estos mecanismos en conjunto^{[26][32]}. La acción antimicrobiana de las NPMs está vinculada a la especie del material y a sus características intrínsecas, tales como el tamaño nanométrico que les permite ser internalizadas con mayor facilidad por los microorganismos, y la elevada relación superficie-volumen que posibilitan un mayor contacto e interacción con los mismos^[18].

- ♥ Las características antimicrobianas de las CuNPs se deben a los iones que se liberan y a la tendencia que éstos poseen de alternar entre los estados de oxidación Cu[I] y Cu[II], los cuales provocan la desnaturalización del ADN, las proteínas y las enzimas bacterianas^[16], generando además estrés oxidativo a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el desmontaje de las membranas microbianas como consecuencia de la acumulación de las CuNPs en la superficie celular^{[21][33]}.
- ♥ El principal mecanismo antimicrobiano de las AgNPs se basa en la liberación de los iones Ag^+ , los cuales presentan una elevada afinidad por el azufre, el fósforo y el nitrógeno, por lo que se unen a los grupos tiol y amino^[16], adhiriéndose, atravesando y modificando la pared y membrana bacteriana, desnaturalizando a los ribosomas, y desactivando a la enzima respiratoria en la membrana plasmática, lo que interrumpe la producción de trifosfato de adenosina (ATP). Al romperse la cadena de transporte de electrones, se

producen ROS que destruyen la membrana. Tanto las ROS como los iones Ag^+ se unen al ADN impidiendo su replicación y, por consiguiente, la multiplicación celular. En adición, las AgNPs se acumulan en las fosas de la pared celular y producen la desnaturalización de la membrana; también pueden perforarla y liberar orgánulos intracelulares^[34] (Véase **Figura 1-4**). Se ha demostrado que las AgNPs presentan un efecto antibacteriano en bacterias gramnegativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* y grampositivas como *S. aureus*^[35].

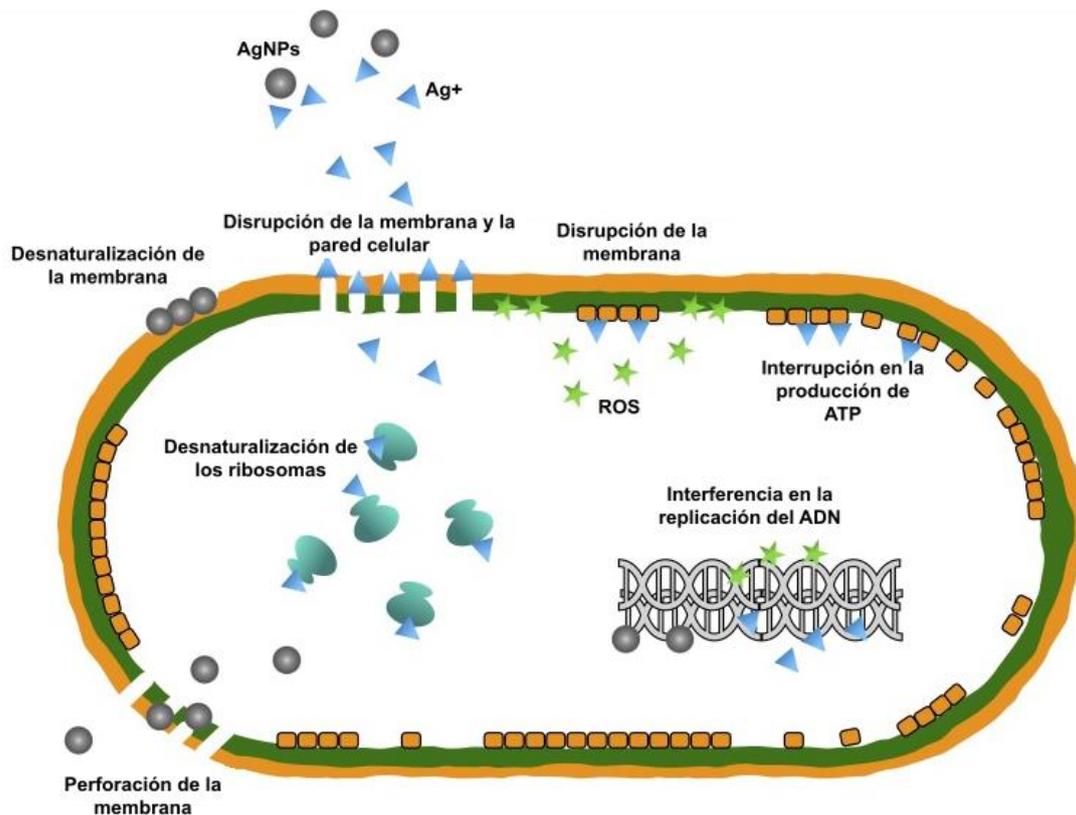


Figura 1-4. Mecanismos antimicrobianos de las AgNPs^[34].

NANOTOXICOLOGÍA

Aunque la nanotecnología ha estado evolucionando desde 1980, recién en el año 2004 Donaldson *et al.* mencionó la importancia de la nanotoxicología como una subcategoría de la toxicología, para permitir un mayor desarrollo de la nanotecnología segura y sostenible^[36]. Como se mencionó previamente, los NMs exhiben propiedades distintivas en comparación con sus equivalentes en la macroescala, con lo cual se puede dar lugar a interacciones impredecibles de los NMs con los sistemas biológicos^[23]. La nanotoxicología, una disciplina en la interfaz de la toxicología y los NMs, estudia estas interacciones, con un particular interés en establecer la posible relación entre las características fisicoquímicas de los NMs y sus efectos toxicológicos^[3].

Es fundamental que la nanotoxicología se considere una categoría distinta de la toxicología ya que los ensayos de toxicidad estándar —desarrollados inicialmente para evaluar sustancias

químicas—, suelen ser inadecuados para evaluar nanotoxicidad, debido a los mecanismos que conducen a la misma, el comportamiento de las NPs en los medios de cultivo y la posible interferencia de las NPs con varios ensayos de toxicidad^[3]. Mientras que la mayor parte de las sustancias químicas inducen daño celular a través de interacciones con biomoléculas específicas, las NPs pueden causar toxicidad a través de una combinación de mecanismos como la inducción de especies reactivas del oxígeno (ROS), genotoxicidad, modificaciones morfológicas, degradación de NPs y efectos inmunológicos^[3]. En general, se observan niveles más altos de toxicidad para las NPs en comparación con el material en la macroescala, debido a su tamaño, su gran relación superficie-volumen, la mayor reactividad superficial, la susceptibilidad a la degradación y lixiviación de iones que pueden afectar la forma en la que un organismo responde, distribuye y elimina estos NMs^{[3][9]}. En adición, la mayoría de las NPs son inestables en la dispersión, ya que son propensas a la aglomeración o agregación y a la sedimentación, que dependen en gran parte de la concentración del NM, el pH y la interacción con moléculas orgánicas que pueden ser adsorbidas en la superficie de las NPs^[37] y que también influyen en la absorción y toxicidad de las mismas^[3].

Existen numerosos factores que pueden afectar la nanotoxicidad de las NPs, como la composición química, el tamaño y la forma de la partícula, la carga, el recubrimiento o la modificación de superficie y los solutos iónicos^{[23][38]} (Véase **Figura 1-5**):

- ♥ Composición química: es fundamental para determinar los efectos tóxicos de las NPs. En las mismas condiciones experimentales, NPMs con diferentes metales han demostrado diferentes toxicidades.
- ♥ Tamaño de partícula: existe una toxicidad dependiente de tamaño para muchos tipos de NPs. Se ha demostrado que, en algunos casos, la toxicidad y la absorción por las células aumenta cuanto más pequeño es el NP, siendo las más grandes más tóxicas que las más pequeñas; y en otros casos, se demostró un efecto contrario.
- ♥ Forma de la partícula: se ha comprobado que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y, por tanto, son más reactivas.
- ♥ Carga de la partícula: las NPs con carga positiva tienen mayor toxicidad a causa del aumento de las interacciones con las superficies biológicas, las cuales están cargadas negativamente.
- ♥ Recubrimiento/modificación de superficie: las propiedades superficiales de las NPs son el determinante significativo de su potencial tóxico.
- ♥ Solutos iónicos: las NPMs liberan iones en fluidos fisiológicos que pueden influir en el potencial tóxico, ya que la exposición de estas NPs es en realidad una mezcla de NMs e iones metálicos.

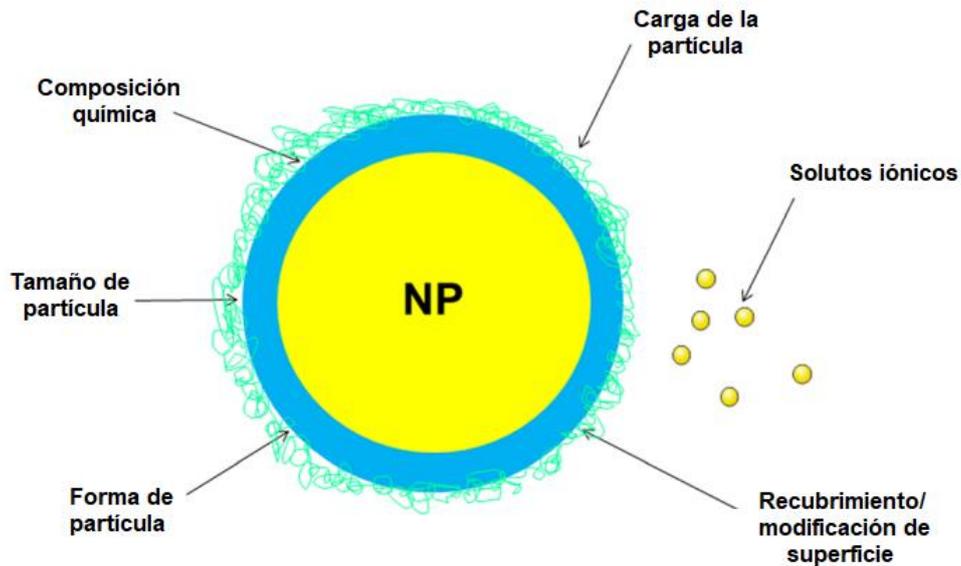


Figura 1-5. Diagrama esquemático de los factores que influyen en los efectos nanotoxicológicos de las nanopartículas. NP, nanopartícula^[38].

Con todo esto, la nanotoxicidad puede entenderse como un efecto adverso no específico que se da en células, órganos u organismos completos. Por otro lado, la biocompatibilidad se refiere a la habilidad de un nanomaterial de interactuar con un organismo completo sin producir efectos adversos y de generar una respuesta apropiada en el hospedador para una aplicación específica. Es por ello que en el campo de la nanotecnología farmacéutica es importante estudiar la biocompatibilidad de los NMs en sí mismos.

EL MODELO ANIMAL ZEBRAFISH PARA ESTUDIOS NANOTOXICOLÓGICOS

El *zebrafish* (*Danio rerio*) es un pequeño pez vertebrado de aguas tropicales^[39] originario del sureste de Asia, que fue introducido como organismo modelo por George Streisinger a fines de los años 80^[40]. Esta especie es ovípara y de fecundación externa, y presenta dimorfismo sexual, ya que en edad fértil la hembra es más robusta que el macho y su vientre es más voluminoso y plateado; el macho, por otro lado, es más estilizado y su vientre es más amarillento (Véase **Figura 1-6**).



Figura 1-6. Zebrafish (*Danio rerio*). Fotografía representativa de dos adultos *zebrafish*, en la parte superior de la imagen se observa al macho, y en la inferior, a la hembra.

A los 5 días post fecundación (dpf) son funcionales el corazón, el cerebro, el hígado, el páncreas, los riñones, el intestino, los músculos y los sistemas sensoriales de las larvas de *zebrafish*; mientras que al décimo dpf se completa y vuelve funcional la barrera hematoencefálica (BHE)^[41] (Véase **Figura 1-7**). Las larvas de *zebrafish* presentan la mayoría de las características de los adultos; sin embargo, se consideran adultos a partir de los 6 meses de edad, donde alcanzan la madurez sexual^{[42][43]}.

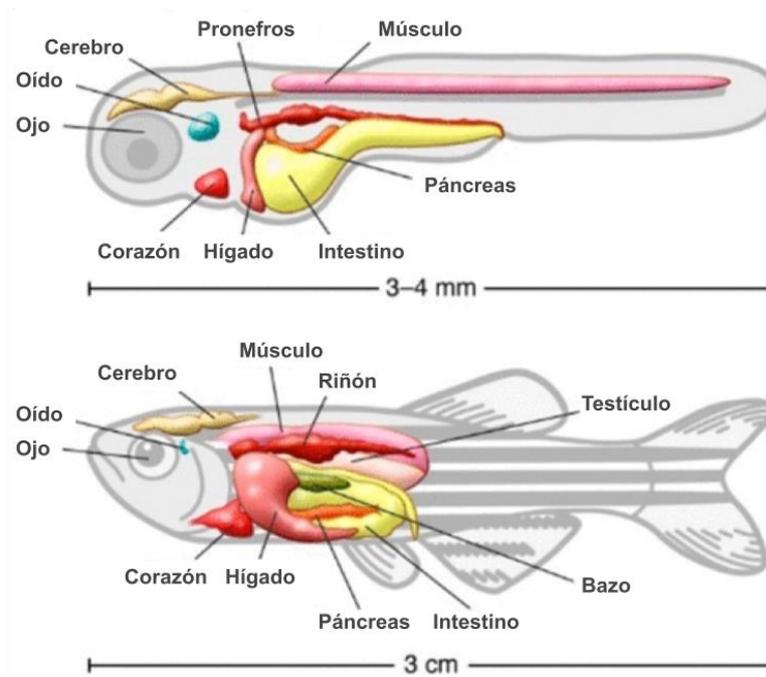


Figura 1-7. Esquema corporal general de una larva y un adulto *zebrafish*. Se indican la ubicación de los órganos tanto en la larva (superior) como en el adulto (inferior). La duración relativa de las dos etapas es de 3 a 5 dpf para la larva y a partir de 6 meses para el adulto^{[42][43]}.

Zebrafish es un modelo rápido, barato y fácil de manipular cuyos resultados podrían extrapolarse a los observados en humanos ya que presentan una homología genética de aproximadamente el 83,1% con los mismos^[44]. Su desarrollo del sistema nervioso central, cardiovascular y visual y los órganos internos tienen mucho en común con sus contrapartes humanas^[38], además de que posee respuestas inmunogénicas y fisiológicas a xenosustancias comunes como estrés oxidativo y cuerpos extraños^[44].

Muchas ventajas de la biología de *zebrafish* lo han vuelto un modelo atractivo para la investigación, dentro de las que se pueden mencionar (i) la alta tasa de fecundidad, ya que pueden poner de 200 a 300 huevos por semana; (ii) los embriones y las larvas son transparentes y se desarrollan fuera del cuerpo, lo que permite una visualización no invasiva de los sistemas de órganos, volviéndolos fáciles de estudiar (Véase **Figura 1-8**); (iii) el desarrollo es rápido, con órganos principales formados a las 24 horas post fecundación (hpf); (iv) son fáciles y económicos de criar y mantener, permitiendo el mantenimiento de miles de animales en un laboratorio a un

costo razonable^[39]. Este modelo ha emergido como un modelo poderoso y alternativo al uso de roedores^[45] que cumplen con el principio de las 3R para la investigación con animales: reducir, refinar y reemplazar los experimentos llevados a cabo con vertebrados superiores^{[42][46][47]}:

- ♥ **Reducir:** Las larvas de *zebrafish* pueden utilizarse para identificar candidatos a fármacos tóxicos, permitiendo así probar moléculas más seguras en modelos de mamíferos, y reduciendo entonces la cantidad de animales utilizados en las pruebas. Además, gracias a la elevada fecundidad, permiten la obtención de gran cantidad de material biológico para los estudios.
- ♥ **Refinar:** Los embriones y las larvas de *zebrafish* ofrecen un refinamiento al diseño de estudios con animales, porque los embriones se fertilizan externamente y, junto con las larvas, son transparentes durante los primeros días de vida, permitiendo una observación no invasiva.
- ♥ **Reemplazar:** Los ensayos en larvas de *zebrafish* pueden usarse para reemplazar algunos estudios en animales, teniendo en cuenta que constituye un modelo relevante para el sistema y se considera que desde el estadio embrionario hasta los 7 dpf —momento en donde la larva agota el saco vitelino, que le proporciona su alimentación, y necesita de alimentación exógena—, el *zebrafish* no tendría desarrollada una percepción del dolor como la del pez adulto.

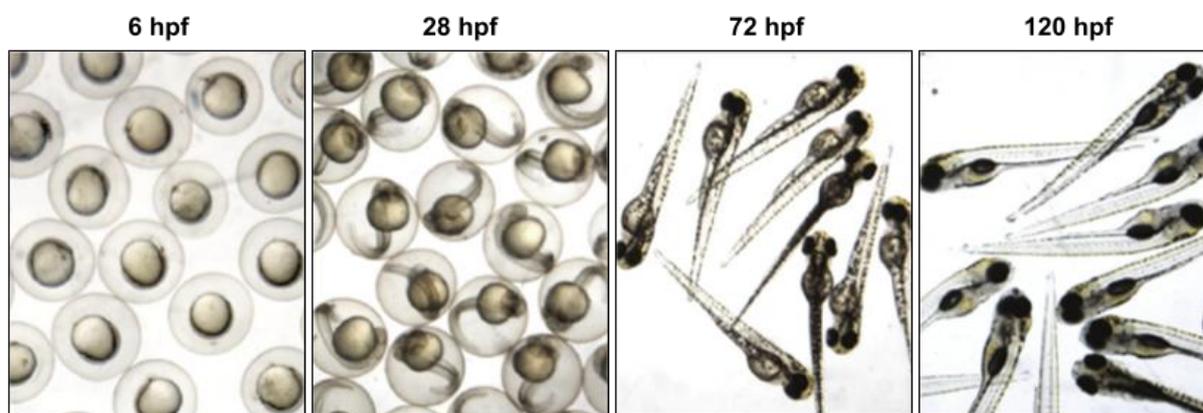


Figura 1-8. Embriones y larvas de *zebrafish* bajo estereomicroscopio. Desarrollo de embriones de *zebrafish* hasta el estadio larvario^[48].

Zebrafish se ha convertido en uno de los modelos más frecuentes y prometedores para evaluar la nanotoxicidad^[44], ya que ofrece la capacidad de evaluación directa de la toxicidad del desarrollo *in vivo*, así como mediciones de absorción, distribución, metabolismo y eliminación^[49] permitiendo la realización de un *screening* en distintas concentraciones y con distintos tiempos de exposición, en un lapso corto de tiempo y en un espacio reducido^[50]. Los métodos para exponer a *zebrafish* a las NPs incluyen exposiciones a través del agua y por microinyección. El método de exposición a escoger depende de las NPs a utilizar y la hipótesis a probar. Los NMs pueden ser absorbidos por

zebrafish a través de cuatro sitios principales de exposición: corion, branquias, piel y tracto digestivo^[44].

Las diferentes etapas en el desarrollo de *zebrafish* brindan una variedad de esquemas de detección que se enfocan en varias respuestas toxicológicas de NPMs, como la toxicidad generalizada en el desarrollo, la neurotoxicidad, la cardiotoxicidad y la hepatotoxicidad; los estudios toxicológicos en *zebrafish* suelen centrarse en estas tres últimas ya que se encuentran entre las más comunes observadas durante los ensayos clínicos en seres humanos, constituyendo la razón de retirada del mercado de muchos fármacos^[51].

1.1. Toxicidad en el desarrollo

La toxicidad generalizada en el desarrollo de los NMs en larvas de *zebrafish* incluye la mortalidad y la teratogenicidad. Gracias a la transparencia durante las etapas embrionarias, se puede realizar una detección basada en imágenes, registrando una gran variedad de indicadores teratogénicos. Se han reportado anomalías como notocorda torcida, flujo sanguíneo lento, edema pericardial, arritmia, deformidad de la cola, disminución de la longitud del cuerpo y retraso en el desarrollo de la elongación de los ojos, la cabeza y la cola, entre otros^[38].

1.2. Neurotoxicidad

El *zebrafish* es un modelo animal sensible y útil para evaluar neurotoxicidad inducida por NPs^[38]. La organización del sistema nervioso central y periférico, y su neuroquímica, se conservan entre este modelo y los mamíferos^[51]. Las larvas de *zebrafish* exhiben patrones de comportamiento que se basan en respuestas de sobresalto frente a diferentes estímulos como el tacto, los cambios bruscos de luz y el ruido, los cuales son utilizados como criterios de valoración neurobiológica en la evaluación de la neurotoxicidad del desarrollo^[51]. La locomoción es un comportamiento complejo que requiere una respuesta integrada de la función cerebral, el sistema nervioso y la vía visual^[42]; las larvas pueden nadar libremente después de 5 dpf, instancia en la cual los tejidos cerebrales se encuentran completamente diferenciados, lo que permite una evaluación conductual del movimiento^[38].

1.3. Cardiotoxicidad

El *zebrafish* tiene un sistema circulatorio cerrado, en el que la circulación comienza a las 24 hpf^[52], los latidos cardíacos regulares, a partir de las 36 hpf^[38] y el crecimiento de los vasos sanguíneos se completa en las 72 hpf^[52]. Si bien existen diferencias en la anatomía del corazón de *zebrafish* y el corazón humano, algunas similitudes fisiológicas le proporcionan ventajas respecto de otros modelos animales como el roedor; entre ellas: (i) la velocidad del latido del corazón de *zebrafish*, a diferencia de la observada en roedores, es comparable a la frecuencia cardíaca en reposo de los humanos sanos, y (ii) los mecanismos anatómicos y moleculares que subyacen a la formación de vasos en *zebrafish* son similares a los apreciados en humanos^[52]. La

transparencia óptica de las larvas de *zebrafish* permite una visualización directa de la forma y el ritmo del corazón utilizando un estereomicroscopio^{[38][52]}.

1.4. Hepatotoxicidad

El hígado de *zebrafish* realiza las mismas funciones que el hígado humano^[42], por lo que constituye el principal órgano metabólico, y es altamente susceptible a los efectos tóxicos de varias sustancias, causando un daño funcional y afectando el funcionamiento normal del organismo^[38]. El hígado de *zebrafish* se desarrolla rápidamente en una morfogénesis hepática completa a las 48 hpf, entra en crecimiento acelerado a las 50 hpf y tiene una función metabólica completamente desarrollada a las 72 hpf^[53]. La respuesta del hígado en las primeras etapas del desarrollo de *zebrafish* es similar a la de los humanos, lo que lo convierte en un modelo ideal para estudiar efectos hepatotóxicos^[38].



CAPÍTULO 2: ESTUDIOS FISICOQUÍMICOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

CAPÍTULO 2: ESTUDIOS FISCOQUÍMICOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Una caracterización adecuada de las NPs es sumamente importante para el desarrollo de nanoformulaciones de relevancia terapéutica. Es por ello que en este capítulo se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de CuNPs y AgNPs donadas por la empresa Nanotek S.A., cuyos lotes se encuentran en suspensión acuosa a una concentración final de 10.000 ppm. Se evaluó tamaño y heterogeneidad de las muestras de NPMs por la técnica de DLS; tamaño, morfología y estado de aglomeración por TEM; y finalmente, estabilidad por espectroscopía UV-Vis y Potencial zeta (ZP).

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

DLS es una técnica muy popular y no destructiva que se aplica para obtener el diámetro promedio y la distribución de tamaños de pequeñas partículas en soluciones acuosas o fisiológicas, en una escala que va de los submicrones hasta un nanómetro utilizando una fuente de luz monocromática, como un láser^[54]. DLS mide la luz dispersada por el láser que pasa a través del coloide, y a continuación analiza la modulación de la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo, determinando de esta forma el tamaño hidrodinámico de las partículas^[55]. Para analizar las muestras por DLS, se realizó una dilución 1/100 de los lotes de NPMs en agua destilada y se midió el diámetro hidrodinámico promedio (Z-average) y el índice de polidispersidad (PDI) de cada una en el Nano Z-sizer (Malvern). El PDI determina la heterogeneidad de la muestra ya que, al tratarse de poblaciones de partículas, resulta poco probable —salvo raras excepciones—, que todas ellas cuenten con un mismo tamaño. Distribuciones con PDI menores a 0,1 denotan poblaciones monodispersas, mientras que PDI mayores a 0,1 caracterizan a muestras polidispersas con polidispersidad moderada (0,1-0,4) y polidispersidad amplia (mayor a 0,4)^[56].

2.2. Espectroscopía UV-Visible (espectroscopía UV-Vis)

La espectroscopía UV-Vis es una técnica muy útil, rápida, simple, sensible y selectiva para controlar la síntesis y la estabilidad de las NPMs^[13]. Las NPMs tienen la particularidad de generar bandas de resonancia conocidas como plasmones superficiales localizados (SPR) cuando interactúan con una señal óptica^[57], que son consecuencia de las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de los metales^{[13][55]}. La longitud de onda a la cual se obtiene dicha resonancia se la conoce como banda de resonancia plasmónica superficial (BRP), que depende del tamaño y de la forma de las NPMs^[57], y que es específica y característica para cada nanopartícula metálica. Para evaluar la estabilidad de las NPMs por esta técnica, se llevaron a cabo diluciones del lote de cada NPM en agua destilada, cuyas concentraciones finales fueron 80,

150, 300, 500 y 1000 ppm (esta última sólo para las AgNPs) y se midió cada muestra por espectroscopia UV-Vis en el NanoDrop 1000 (Véase **Figura 2-1** y **Figura 2-3**).

2.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

TEM es una técnica valiosa, de uso frecuente e importante para la caracterización de NMs, que se utiliza para obtener medidas cuantitativas de partículas, distribución de tamaños y morfología^[13]. En la TEM, un haz de electrones incidente se transmite a través de una muestra de lámina muy delgada: estos electrones al interactuar con la muestra se transforman en electrones no dispersos, dispersos elásticamente o dispersos inelásticamente^[54]. La ampliación por TEM está determinada por la relación entre la distancia entre la lente del objetivo y la muestra y la distancia entre la lente del objetivo y su plano de imagen^[13]. Para obtener imágenes de las NPMs por TEM se diluyeron los lotes 1/10 y 1/100, para AgNPs y CuNPs respectivamente, en agua Milli-Q y se procedió a procesar y fotografiar cada muestra (Véase **Figura 2-2** y **Figura 2-4**).

2.4. Potencial zeta (ZP)

ZP se define como el potencial electrostático de la doble capa eléctrica que rodea a una nanopartícula en solución^[58] y, dado que informa el grado de repulsión entre NPs adyacentes, se puede utilizar como un indicador de estabilidad^[59]. Un elevado ZP le confiere estabilidad a los sistemas coloidales, es decir, que éstos se resisten a la aglomeración; mientras que cuando el ZP es bajo, la atracción entre las NPs supera a las fuerzas de repulsión, con lo cual el coloide se desestabiliza y forma aglomerados^[59]. NPs con un ZP entre -10 y +10 mV son consideradas neutras; mientras que aquellas que poseen un ZP inferior a -30 mV o superior a +30 mV se consideran electrostáticamente estables: fuertemente aniónicas o fuertemente catiónicas, respectivamente^[58]. Para evaluar la estabilidad de las NPMs mediante la medida de carga superficial, se llevó a cabo una dilución 1/10 del lote de AgNPs en agua destilada y se midió ZP por cuatuplicado con el caracterizador de partículas SZ-100 (HORIBA). No se midió el ZP de CuNPs por la disgregación de la muestra (Véase **Figura 2-1** y **Figura 2-2**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

NANOPARTÍCULAS DE COBRE

El análisis por DLS reveló CuNPs con un Z-average de 242 ± 11 nm y un PDI de 0,376, con lo cual la muestra es moderadamente polidispersa con NPs que poseen un tamaño promedio de 242nm. El espectro UV-Vis y la TEM de las CuNPs se aprecian en la **Figura 2-1** y en la **Figura 2-2**, respectivamente.

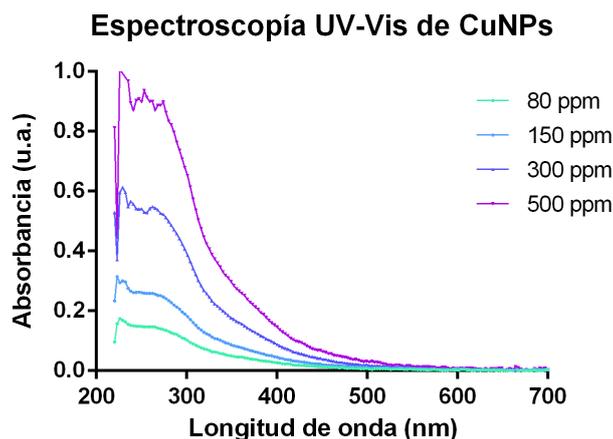


Figura 2-1. Espectroscopía UV-Vis de CuNPs. Resonancia plasmónica de superficie de las CuNPs.

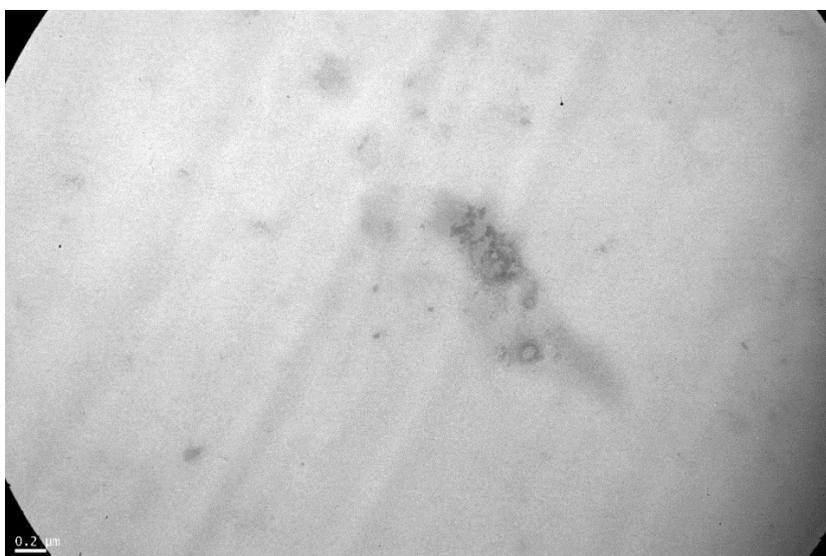


Figura 2-2. Microscopía electrónica de transmisión de CuNPs.

La longitud de onda SPR para el cobre se encuentra en la región visible, a 590 nm^[60]. Sin embargo, el espectro UV-Vis no exhibió esta banda característica (Véase **Figura 2-1**), por lo que no se puede asegurar la presencia de CuNPs en la muestra. Sumado a esto, también se vieron una serie de picos entre 200 y 300 nm, que indican que la muestra está desestabilizada. Los resultados de TEM obtenidos posteriormente permitieron corroborar lo observado en el espectro UV-Vis, ya que en la **Figura 2-2** las CuNPs están disgregadas.

NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Mediante la técnica de DLS se obtuvo un Z-average de 904 ± 25 nm y un PDI de 0,368, indicando que la muestra de AgNPs es moderadamente polidispersa con NPs que poseen un tamaño promedio de 904 nm. En la **Figura 2-3** y en la **Figura 2-4** se muestra la espectroscopía UV-Vis y la TEM para estas NPs, respectivamente.

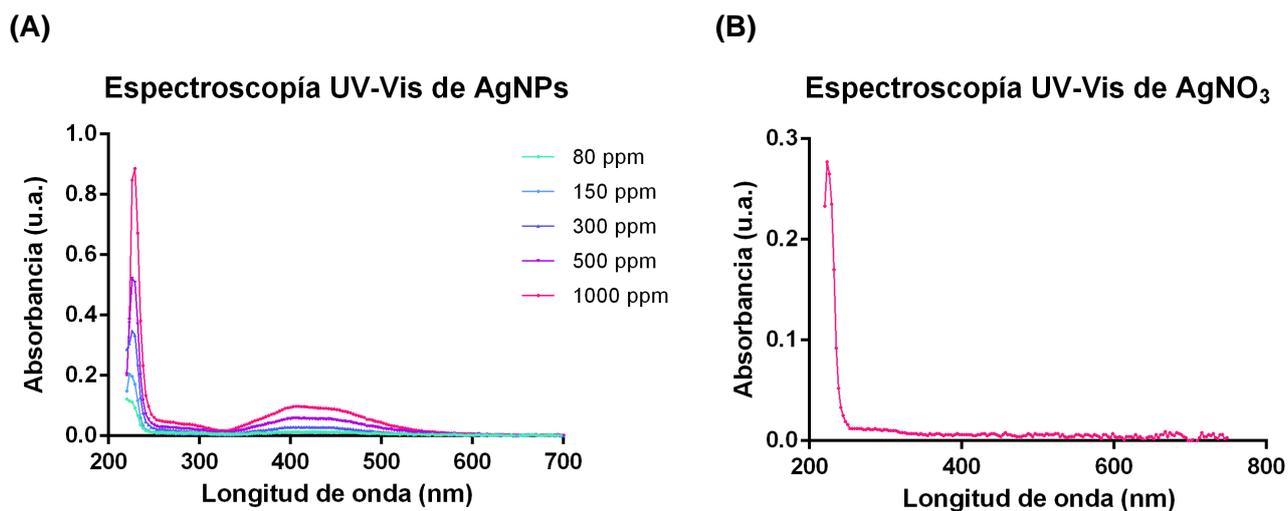


Figura 2-3. Espectroscopía UV-Vis de AgNPs y AgNO₃. (A) Resonancia plasmónica de superficie de las AgNPs. (B) Resonancia plasmónica de superficie de AgNO₃.

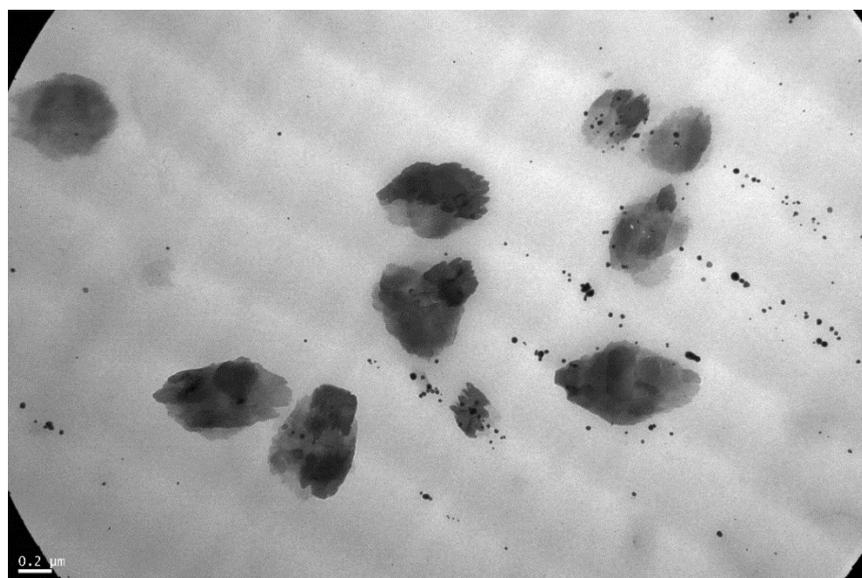


Figura 2-4. Microscopía electrónica de transmisión de AgNPs.

El espectro UV-Vis de las AgNPs (Véase **Figura 2-3 (A)**) mostró dos picos de absorción: uno a 409 nm, que se corresponde a la absorción de resonancia de plasmones de superficie local típica de estas NPs^[61], con lo cual se puede asegurar la presencia de AgNPs en la muestra; y otro pico a máximo 229 nm, que refiere a los iones Ag⁺ libres que se encuentran en grandes cantidades en la muestra de AgNPs, debido a que las NPMs se están desestabilizando. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una espectroscopía UV-Vis a una solución de 0,2 mM de AgNO₃ en agua destilada y, efectivamente, se observó un pico de absorción aproximadamente en 229 nm, correspondiente a los iones Ag⁺ en solución (Véase **Figura 2-3 (B)**). En adición, TEM evidenció NPs heterogéneas en morfología (Véase **Figura 2-4**), confirmando además el tamaño y la polidispersidad obtenidos por DLS. Cabe mencionar que también se observaron aglomerados de

AgNPs (no se muestra), típico de las NPs que se encuentran en un medio acuoso en altas concentraciones. Finalmente, el ZP para las AgNPs fue de -10,03 mV, lo cual indica estas NPs tienen una elevada tendencia a formar aglomerados debido a que son poco electronegativas.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados del espectro UV-Vis y de TEM de las CuNPs revelaron que las NPMs se disgregaron, con lo cual no hay NPMs en la muestra. Por otro lado, la muestra de AgNPs contiene una población moderadamente polidispersa de NPs con morfologías heterogéneas y un tamaño promedio de 904 nm que están en proceso de desestabilización.



CAPÍTULO 3: ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

CAPÍTULO 3: ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Como se mencionó previamente, las NPMs actúan como agentes antimicrobianos excepcionales a bajas concentraciones. Para cuantificar la actividad antimicrobiana *in vitro* de estas NPs se realizaron ensayos de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y de Concentración Bactericida Mínima (CBM), a modo tal de evaluar la actividad bacteriostática y bactericida^[62]. Los ensayos microbiológicos se realizaron en paralelo a los fisicoquímicos presentados en el capítulo anterior. Debido a que se observó que las CuNPs estaban disgregadas (Véase **Figura 2-2**), sólo se llegó a evaluar la CIM en una cepa de *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*), sin continuar con el resto de los ensayos. Posteriormente, se procedió a analizar exclusivamente a las AgNPs llevando a cabo ensayos de CIM y de CBM en *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

La CIM se define como la mínima concentración de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación *overnight* a 37°C, mientras que la CBM es la mínima concentración de un antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de su incubación *overnight*^[62]. Los antimicrobianos que detienen el metabolismo de las bacterias previniendo su crecimiento y reproducción, pero sin provocar su muerte son bacteriostáticos; mientras que aquellos que producen la muerte de los microorganismos son bactericidas^[63]. Esta definición se aplica sólo al microorganismo (o incluso a la cepa) contra el cual se prueban la CIM y la CBM, y se ve influida por las condiciones de crecimiento, la densidad bacteriana, la duración de la prueba y el grado de reducción del número de bacterias^[63].

Los ensayos de CIM y CBM se realizaron en forma consecutiva en un total de 4 días (Véase **Figura 3-1**). Para la CIM se probaron concentraciones de 1,6; 8; 15; 30; 40; 60 y 100 ppm de NPMs a modo tal de hallar el porcentaje de inhibición sobre las cepas estudiadas; mientras que para la CBM se estudiaron las condiciones más concentradas de 60 y 100 ppm que presentaron inhibición del crecimiento, a modo tal de encontrar una posible concentración bactericida.



Figura 3-1. Esquema de trabajo para los ensayos de CIM y de CBM de NPMs.

3.1. Preparación del inóculo

La generación de los inóculos se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Para ello, se vertieron 30 mL de medio de cultivo líquido MH (21 g/L de agua destilada) previamente esterilizado en un tubo tipo Falcon estéril de 50 mL. A continuación, se tomó una colonia de la placa de medio sólido de la cepa, revolviendo luego ésta dentro del tubo tipo Falcon. Se incubó 24 hs en estufa a 37°C.

3.2. Ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima

Con un espectrofotómetro, se midió la densidad óptica (DO) del inóculo a 600 nm y se diluyó posteriormente, a modo tal de obtener una DO de 0,5 McFarland ($1 \cdot 2 \times 10^8$ UFC/mL). Luego, en condiciones de esterilidad, se prepararon diluciones seriadas de las NPMs en medio líquido MH a partir de los lotes correspondientes en tubos tipo eppendorf de 2 mL, de modo tal que las concentraciones finales a testear sean 1,6; 8; 15; 30; 40; 60 y 100 ppm (Véase **Figura 3-2**), y se llevó a cabo el plaqueo en dos placas de 96 wells (96w).

- ♥ **Placa control:** En ésta se sembraron como control 200 µL de medio líquido MH estéril en las columnas 11 y 12 de la placa. Luego, desde la columna 2 hasta la 9 y desde la fila B hasta la H se sembraron 20 µL de cada concentración de NPMs más 180 µL (200 µL finales) de medio de cultivo MH. Ambos son controles negativos que se utilizan para, por un lado, verificar la ausencia de crecimiento por posibles contaminaciones y, por otro lado, obtener las DO_{600} del medio MH y de las diferentes concentraciones de NPMs. Estos valores de DO_{600} posteriormente se restan a los valores de DO_{600} obtenidos en la *placa tratamiento* (Véase **Ecuación 3-1**), de forma tal que el crecimiento se deba exclusivamente a la cantidad de bacterias presentes en cada condición.
- ♥ **Placa tratamiento:** En ésta se sembraron como control 200 µL del inóculo en las columnas 11 y 12 de la placa (control positivo de crecimiento). Luego, desde la columna 2 hasta la 9 y desde la fila B hasta la H se sembraron 20 µL de cada concentración de NPMs más 180 µL (200 µL finales) del inóculo.

Las placas se incubaron por 24 hs en estufa a 37°C.

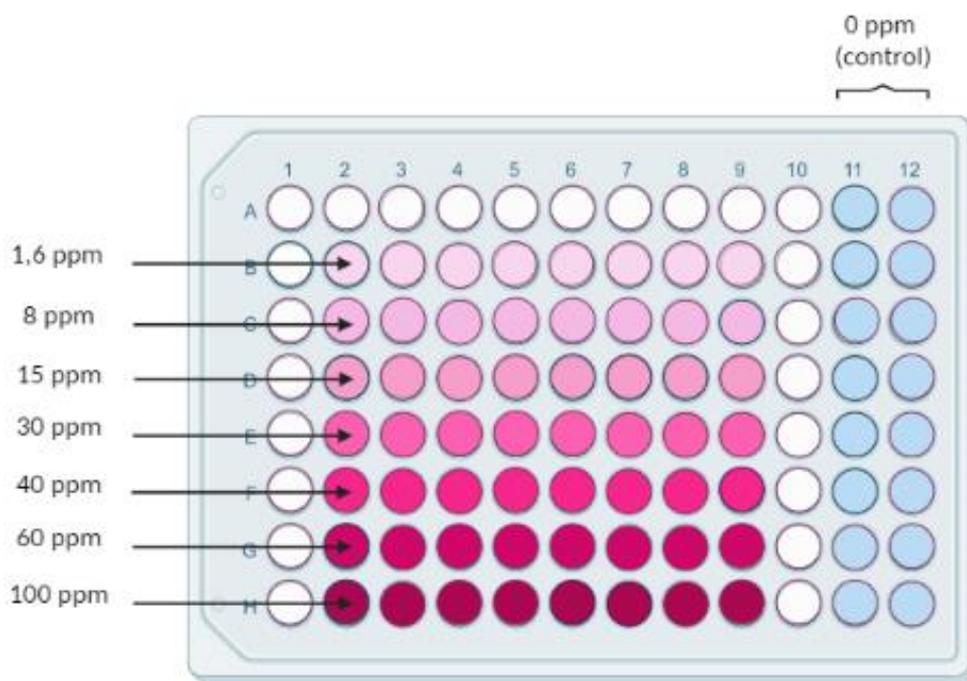


Figura 3-2. Esquema del patrón de plaqueo de las NPMs en placas de 96w. La placa control tiene como 0 ppm (control negativo) medio MH, mientras que la placa tratamiento tiene como 0 ppm (control positivo) a las bacterias. La incubación de las NPMs se realiza de forma creciente conforme aumenta el número de filas.

Se incubaron las placas de 96w en estufa a 37°C y por 24 hs. Pasado este tiempo, se midió la DO_{600nm} en el Cytation 5 y se calculó el porcentaje de Inhibición de cada concentración (Véase **Ecuación 3-1**). Todos los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de los datos obtenidos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.0. Las diferencias significativas con respecto al control se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunnett. Valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados como significativos. Los distintos grados de significancia se representaron en los gráficos como asteriscos, siendo:

- ♥ *, cuando $p < 0,05$
- ♥ **, cuando $p < 0,01$
- ♥ ***, cuando $p < 0,001$
- ♥ ****, cuando $p < 0,0001$
- ♥ ns, cuando el valor fue no significativo.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{(DO_{\text{condición}} - DO_{\text{NPMs}}) * 100}{DO_{\text{control}} - DO_{\text{medio}}}$$

Ecuación 3-1. Cálculo del % Inhibición. Siendo $DO_{\text{condición}}$, la DO de las bacterias incubadas con el tratamiento; DO_{NPMs} , la DO de las NPMs del tratamiento; DO_{control} , la DO promedio de las bacterias sin tratamiento; y DO_{Control} , la DO del medio MH.

Para la CIM de CuNPs en *P. aeruginosa* se realizaron 3 réplicas biológicas con 8 réplicas técnicas para cada condición (n = 24); para la CIM de AgNPs en *P. aeruginosa* y *S. aureus* se llevaron a cabo 4 réplicas biológicas con 8 réplicas técnicas para cada condición (n = 32), mientras que para *E. coli* se hicieron 3 réplicas biológicas con 8 réplicas técnicas para cada condición (n = 24).

3.3. Ensayo de Concentración Bactericida Mínima

Utilizando la placa tratamiento de 96w de la CIM, se tomaron 100 μ L de wells al azar de las condiciones 0 ppm (control positivo), 60 ppm y 100 ppm de NPMs para sembrar por extensión en placas de Petri con agar nutritivo y medio MH. En adición, se sembraron diluciones de $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-8}$ de cada condición, y un control negativo con medio MH. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 4 réplicas técnicas para cada condición (n = 12). Todas placas se dejaron incubando 24 hs en estufa a 37°C. El control positivo se utiliza como control de crecimiento para asegurar que la cepa pueda crecer normalmente en medio agar nutritivo con MH. Por otro lado, el control negativo es un control de contaminación que corrobora que el medio en el cual crecen las bacterias no está contaminado con otros microorganismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Concentración Inhibitoria Mínima en *P. aeruginosa*

Para *E. coli*, el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano aumenta paulatinamente de forma dependiente de la dosis a medida que se incrementa la concentración de CuNPs (Véase **Figura 3-3**). A partir de 30 ppm se aprecia una diferencia significativa de la inhibición respecto del control, la cual se mantiene y se vuelve altamente significativa en las concentraciones de 60 y 100 ppm, en donde se alcanzan porcentajes de inhibición del 15,77% y del 27,32%, respectivamente. Por consiguiente, se encontró la CIM a 30 ppm.

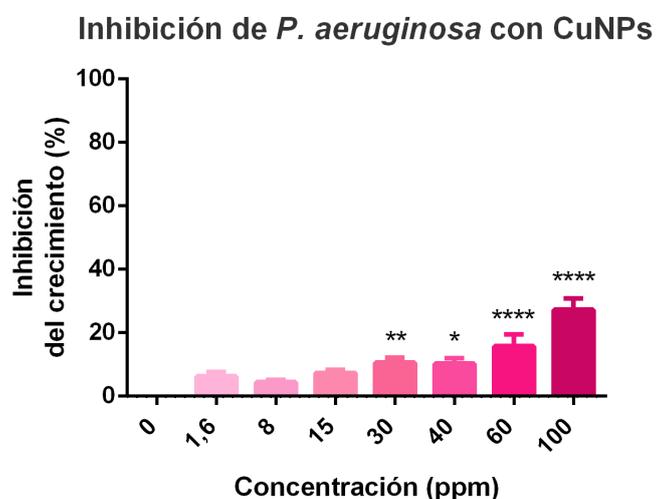


Figura 3-3. Concentración Inhibitoria Mínima de CuNPs en *P. aeruginosa*.

NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*

♥ *P. aeruginosa*

P. aeruginosa resulta resistente a las concentraciones de 1,6; 8 y 15 ppm de AgNPs, donde no se aprecia una inhibición en su crecimiento (Véase **Figura 3-4**). Sin embargo, a partir de 30 ppm se manifiesta un aumento abrupto en el porcentaje de inhibición, del 53,94%, con alto grado de significancia estadística respecto del control. Este efecto se mantiene en las concentraciones crecientes, en donde a 100 ppm se alcanza el mayor porcentaje de inhibición, que se corresponde con un 61,37%. Por consiguiente, se determinó la CIM a 30 ppm.

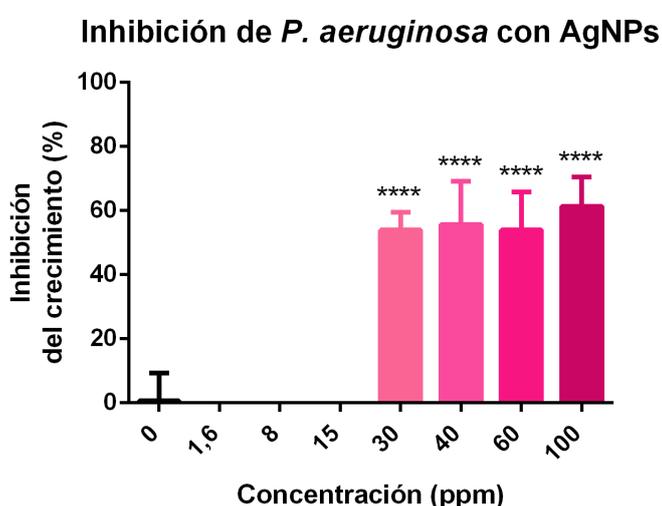


Figura 3-4. Concentración Inhibitoria Mínima de AgNPs en *P. aeruginosa*.

Para el ensayo de CBM, el control de bacterias sin tratar crece formando una pátina sobre el agar nutritivo con MH, tanto para la muestra sin diluir como para las diluciones $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$ y $1 \cdot 10^{-8}$ (Véase **Figura 3-5**). En adición, con el control del medio MH no hubo crecimiento bacteriano (no se muestra). Estos resultados permiten asegurar, respectivamente, que esta bacteria es capaz de crecer en el medio utilizado para el ensayo y que en las placas con las condiciones de 60 y 100 ppm el crecimiento se deba exclusivamente a las bacterias que se plaquearon en el agar, y no a posibles contaminaciones. Respecto a la condición de 60 ppm, si bien en las diluciones $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$ y $1 \cdot 10^{-8}$ hubo una disminución de la carga bacteriana respecto del control sin tratar, todas las placas exhibieron crecimiento. Para 100 ppm las diluciones no presentaron crecimiento, pero la placa sin diluir mostró una pátina de *P. aeruginosa*. Como se mencionó previamente, la CBM es la mínima concentración de un antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de su incubación, con lo cual refiere a una actividad bactericida. En base a esta

definición, al reestablecer las condiciones óptimas de crecimiento, si el antimicrobiano es bactericida no deberían apreciarse microorganismos en ninguna de las placas. Si bien es un hecho que los tratamientos disminuyeron la carga bacteriana respecto del control, las bacterias fueron capaces de reanudar su crecimiento y reproducción luego de ambos tratamientos; es por ello que tanto 60 como 100 ppm resultaron bacteriostáticas y no bactericidas del crecimiento de *P. aeruginosa*.

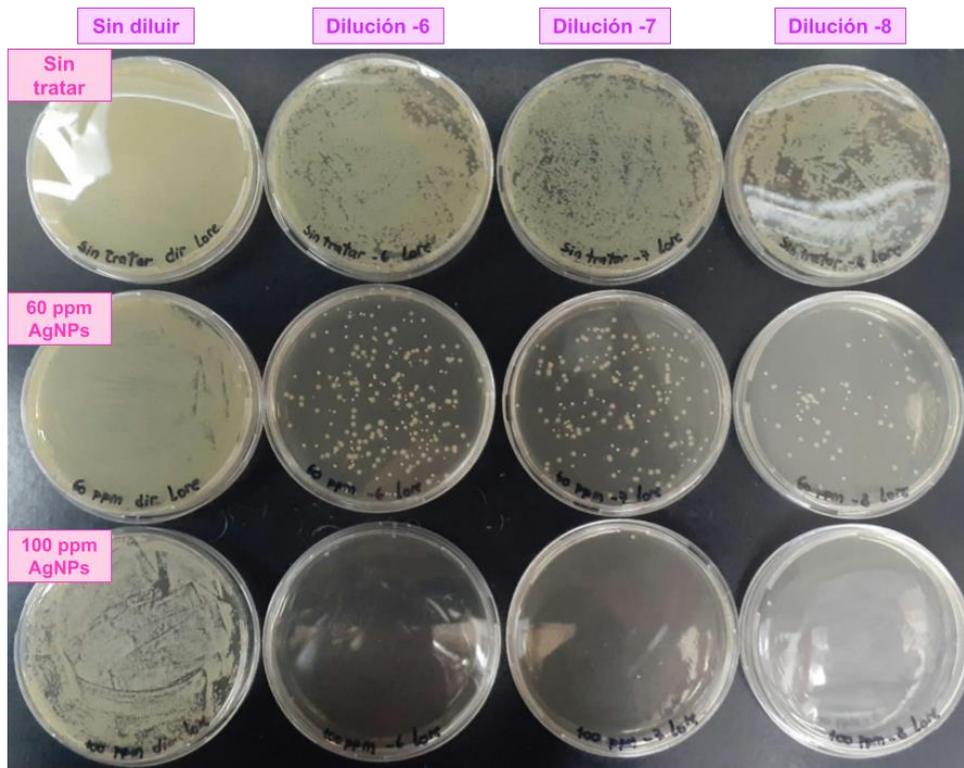


Figura 3-5. Concentración Bactericida Mínima de AgNPs en *P. aeruginosa*. De izquierda a derecha: Sin diluir, dilución 1.10^{-6} , dilución 1.10^{-7} y dilución 1.10^{-8} , de arriba hacia abajo: *P. aeruginosa* sin tratar, *P. aeruginosa* con 60 ppm de AgNPs y *P. aeruginosa* con 100 ppm de AgNPs.

♥ *E. coli*

E. coli resultó ser una bacteria altamente sensible a las concentraciones de AgNPs testeadas, ya que se obtuvieron elevados porcentajes de inhibición respecto del control en la mayor parte de las concentraciones incubadas (Véase **Figura 3-6**). En una primera instancia, el porcentaje de inhibición del crecimiento aumentó de forma dependiente de la dosis para las concentraciones de 1,6; 8; 15 y 30 ppm, en donde de 8 a 15 ppm se observó un aumento abrupto de 14,04% al 75,13%, respectivamente. En 100 ppm se notó un descenso en el porcentaje de inhibición respecto al obtenido en 60 ppm, efecto que podría deberse a que a mayores concentraciones de AgNPs, éstas se aglomeran disminuyendo su efectividad antibacteriana^{[9][64]}. Se encontró la CIM, entonces, en 8 ppm.

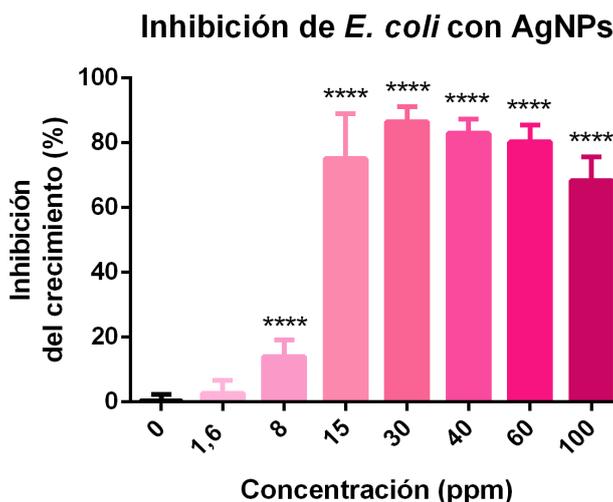


Figura 3-6. Concentración Inhibitoria Mínima de AgNPs en *E. coli*.

Para el ensayo de CBM, los controles de *E. coli* sin tratar, tanto la muestra sin diluir como las diluciones (Véase **Figura 3-7**), y del medio MH (no se muestra) dieron exactamente igual que los observados para *P. aeruginosa* (Véase **Figura 3-5**) lo que permitió asegurar nuevamente la capacidad de crecimiento de la bacteria a ensayar y la ausencia de contaminación. Respecto a la condición de 60 ppm, se observó una diferencia significativa en el crecimiento de *E. coli* respecto del control sin tratar: en la muestra sin diluir hay menor carga bacteriana y en las diluciones $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$ y $1 \cdot 10^{-8}$ de 60 ppm directamente no se aprecia crecimiento. Para la condición de 100 ppm, la placa sin diluir creció como el control mientras que las diluciones no exhibieron crecimiento bacteriano. Comparando ambos tratamientos, la condición de 60 ppm presentó entonces mayor capacidad de eliminar a los microorganismos que la de 100 ppm, efecto que también quedó evidenciado en los resultados de la CIM, donde el porcentaje de inhibición obtenido es mayor para 60 que para 100 ppm (80,29 % contra 68,41 %, respectivamente) (Véase **Figura 3-6**). Sin embargo, como este efecto letal no es mayor al 99,9%, se concluye que ambas concentraciones son bacteriostáticas del crecimiento de *E. coli*.

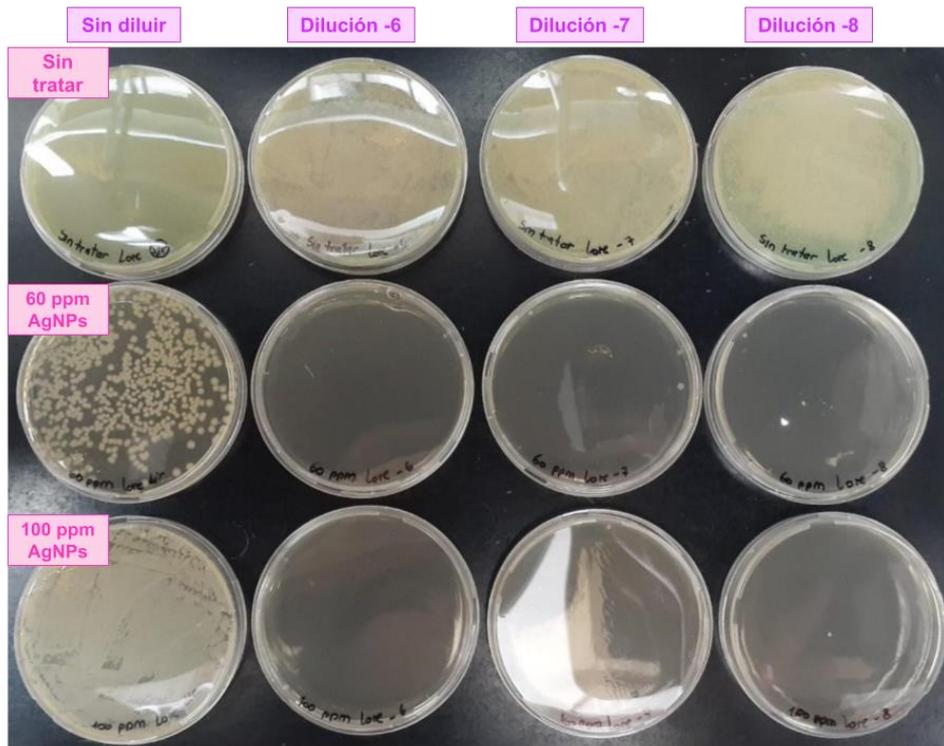


Figura 3-7. Concentración Bactericida Mínima de AgNPs en *E. coli*. De izquierda a derecha: Sin diluir, dilución 1.10^{-6} , dilución 1.10^{-7} y dilución 1.10^{-8} , de arriba hacia abajo: *E. coli* sin tratar, *E. coli* con 60 ppm de AgNPs y *E. coli* con 100 ppm de AgNPs.

♥ ***S. aureus***

Para *S. aureus*, las AgNPs mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento a partir de 8 ppm, el cual aumenta abruptamente con la condición de 15 ppm, de 18,33% a 46,62%, respectivamente (Véase **Figura 3-8**). A partir de 15 ppm, el porcentaje de inhibición mantuvo la misma tendencia. Por lo tanto, la CIM de AgNPs para *S. aureus* se encontró a 8 ppm.

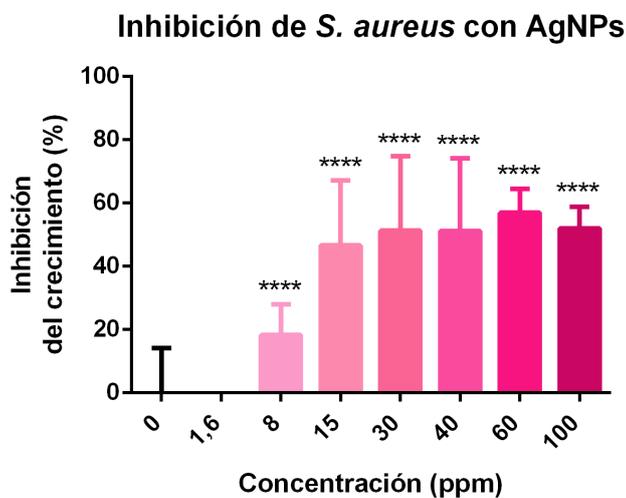


Figura 3-8. Concentración Inhibitoria Mínima de AgNPs en *S. aureus*.

Para el ensayo de CBM, los controles de *S. aureus* sin tratar, tanto la muestra sin diluir como las diluciones (Véase **Figura 3-9**) y del medio MH (no se muestra) dieron exactamente igual que los observados para *P. aeruginosa* y *E. coli* (Véase **Figura 3-5** y **Figura 3-7**, respectivamente), lo que permitió asegurar nuevamente la capacidad de crecimiento de la bacteria a ensayar y la ausencia de contaminación. En la condición de 60 ppm hubo una disminución en el crecimiento de *S. aureus* respecto del control, tanto en la siembra sin diluir como en las diluciones 1.10^{-6} , 1.10^{-7} y 1.10^{-8} ; mientras que, en la condición de 100 ppm, el crecimiento en la placa sin diluir y en las diluciones resultó muy similar al observado en el control. Estos resultados indican que la capacidad de eliminar a los microorganismos es mayor a 60 ppm que a 100 ppm, pero, como hay carga bacteriana en ambos tratamientos, las dos concentraciones son bacteriostáticas para *S. aureus*.

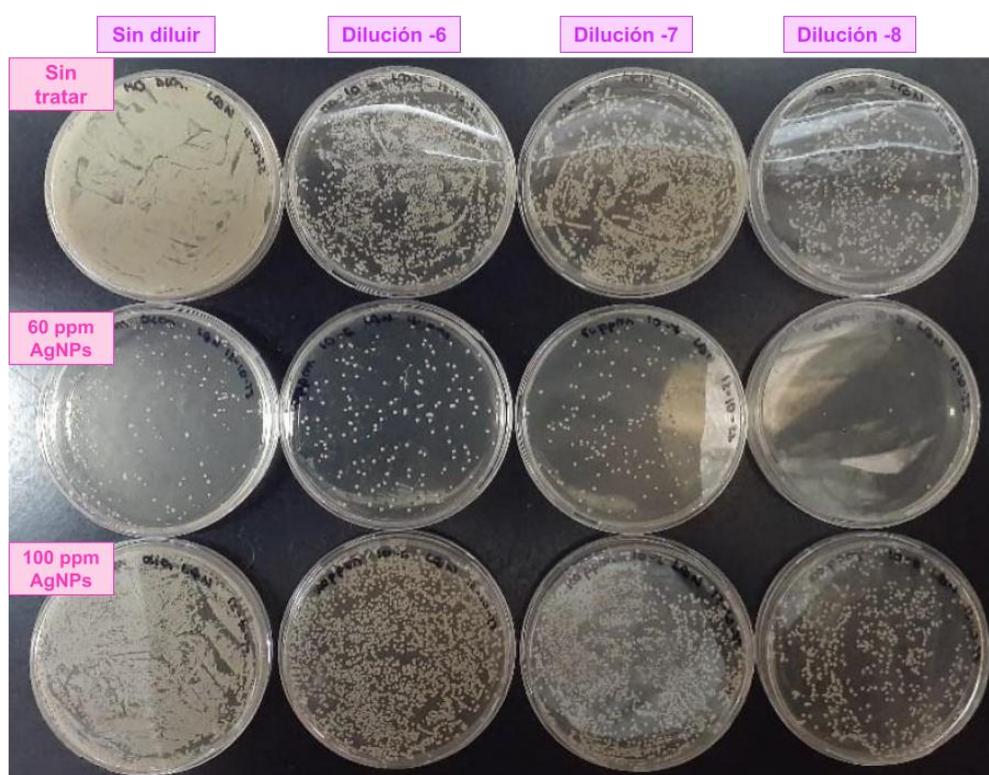
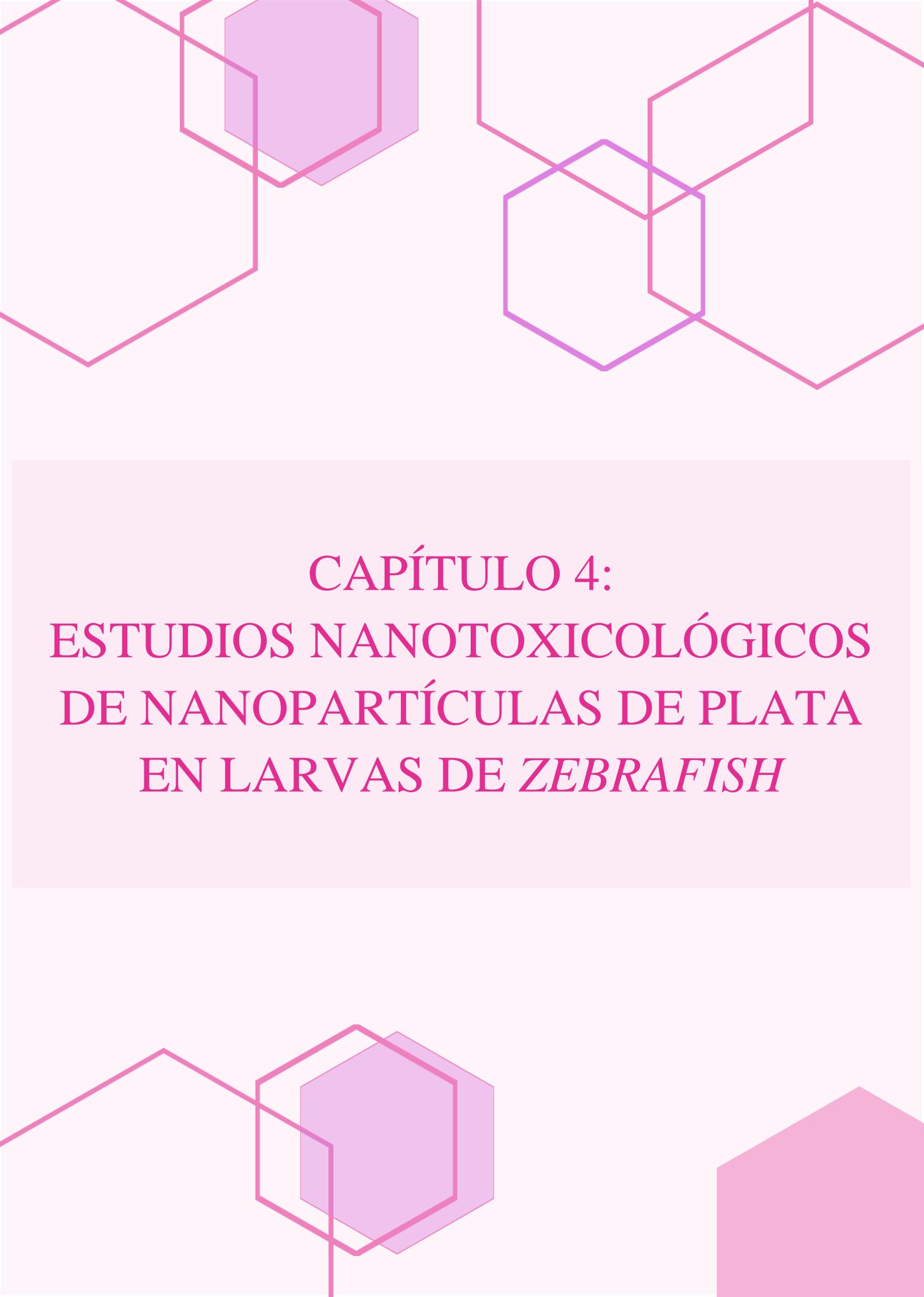


Figura 3-9. Concentración Bactericida Mínima de AgNPs en *S. aureus*. De izquierda a derecha: Sin diluir, dilución 1.10^{-6} , dilución 1.10^{-7} y dilución 1.10^{-8} , de arriba hacia abajo: *S. aureus* sin tratar, *S. aureus* con 60 ppm de AgNPs y *S. aureus* con 100 ppm de AgNPs.

CONCLUSIONES PARCIALES

En primera instancia, en relación a las CuNPs, se obtuvo para *P. aeruginosa* una CIM de 30 ppm, con porcentajes de inhibición muy por debajo respecto de los observados para las AgNPs. Por otro lado, en relación a las AgNPs, se encontró la CIM para las tres cepas bacterianas bajo estudio: en *P. aeruginosa* se alcanzó una CIM a 30 ppm, mientras que para *E. coli* y *S. aureus*, ésta se dio a 8 ppm. Con lo cual, *P. aeruginosa* resultó mucho más resistente al tratamiento que las otras dos

cepas, siendo *E. coli* la más sensible ya que ésta exhibió porcentajes de inhibición significativamente superiores en todas las concentraciones ensayadas, en relación a las otras dos. Las concentraciones de AgNPs producen efectos distintivos en las cepas testeadas ya que se tratan de diferentes especies que presentan mecanismos de respuesta metabólica particulares. Finalmente, las concentraciones de 60 y 100 ppm de AgNPs resultaron bacteriostáticas para todas las cepas debido a que las bacterias demostraron capacidad de crecimiento en medio nutritivo luego de los tratamientos correspondientes.



CAPÍTULO 4:
ESTUDIOS NANOTOXICOLÓGICOS
DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
EN LARVAS DE *ZEBRAFISH*

CAPÍTULO 4: ESTUDIOS NANOTOXICOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LARVAS DE ZEBRAFISH

La nanotoxicidad de las AgNPs depende de varios parámetros, como la preparación de la suspensión coloidal, el estado de aglomeración, la naturaleza química de las NPs, la dosis administrada, la naturaleza del organismo vivo, el tipo celular, la morfología y el tamaño de la superficie^[23]. Con la finalidad de estudiar la nanotoxicidad y la biocompatibilidad del lote de AgNPs para su futura aplicación como antibacteriano y potenciador de la cicatrización en heridas cutáneas, se realizaron estudios *in vivo* en el modelo animal *zebrafish*. El Laboratorio de Bio-Nanotecnología (LBN) de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) posee amplia experiencia en la manipulación y trabajo con *zebrafish*, por lo tanto, los ensayos pertinentes a esta sección se efectuaron según Prieto *et al.*, 2012, Feas *et al.*, 2017, Igartúa *et al.*, 2015 y Martínez *et al.*, 2018^{[65][66][67][68]}. Se estudiaron los efectos subletales, los cuales funcionan como indicadores de los posibles efectos peligrosos a largo plazo del producto nanotecnológico. Para esto, se incubaron larvas de 5 dpf en las concentraciones 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 ppm de AgNPs, y se estudió de 5 a 7 dpf la mortalidad, la toxicidad generalizada (morfología) y la toxicidad en tejidos específicos (neurotoxicidad, cardiotoxicidad y hepatotoxicidad).

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MANTENIMIENTO DE ZEBRAFISH ADULTOS Y OBTENCIÓN DE EMBRIONES

El mantenimiento y la reproducción del modelo *zebrafish* se llevaron a cabo en el acuario del grupo de trabajo del LBN, ubicado en la UNQ. Los *zebrafish* adultos (de 6 a 18 meses de edad) se mantuvieron a 28°C en peceras con ciclos de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad^{[66][69]} y con agua continuamente aireada, en un rango de pH entre 7,0-8,0. Los peces fueron alimentados con escamas secas (TetraMin PRO®) tres veces al día.

En este estudio, los “embriones” se refieren al *zebrafish* de hasta 3 dpf mientras que las “larvas” se refieren a los animales que eclosionan después de 3 dpf.

Los embriones se obtuvieron por apareamiento natural. Para ello, la noche anterior al día de desove, se seleccionaron hembras y machos y se separaron en trampas hechas de malla de plástico dentro de la misma pecera de puesta. A la mañana siguiente, se mezclaron hembras y machos para que naturalmente se produzca el desove y la posterior fecundación.

Luego de 1 hpf, se recolectaron los huevos y se mantuvieron en medio E3 (NaCl₅ mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM y MgSO₄ 0,33 mM en agua desionizada con 500 ppb de azul de metileno como fungicida) a 28°C con el mismo ciclo de luz-oscuridad. A la hora de la recolección, se evaluaron las características de los embriones utilizando un estereomicroscopio (lupa binocular) Nikon SMZ800 (Nikon, EE. UU), de forma tal de seleccionar aquellos fertilizados y en buenas condiciones, y descartar los coagulados y los no fertilizados (Véase **Figura 4-1**).

Los estudios de biocompatibilidad que se describirán a continuación se realizaron en el estadio larvario de *zebrafish* (de 3 a 7 dpf), y fueron aprobados por el Comité de Bioética-UNQ Res.CS. N°338/09 y 481/13, CICUAL Dict. CE-UNQ N°2/14.

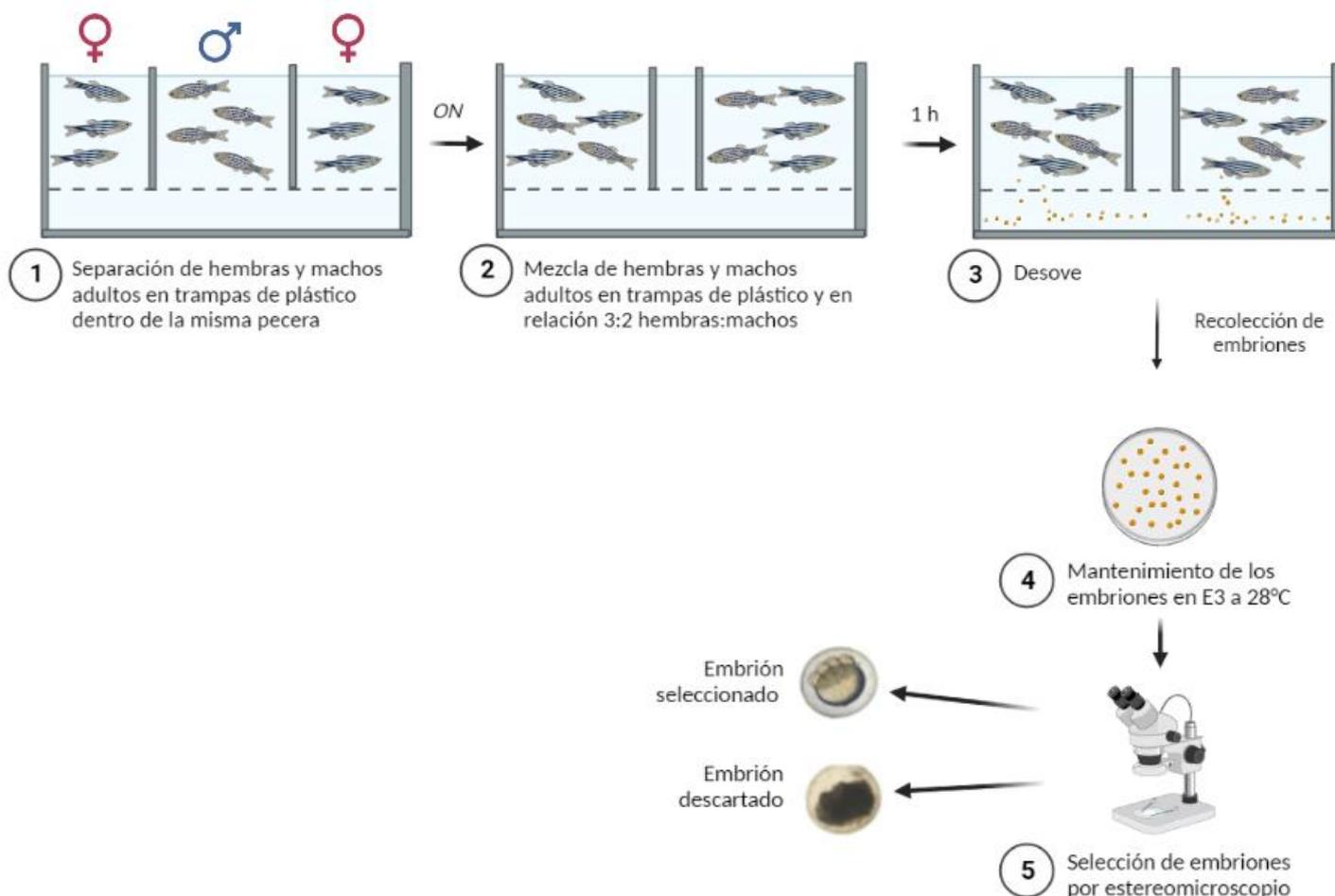


Figura 4-1. Esquema de la obtención y selección de embriones de *zebrafish*. Esquema realizado con BioRender.

4.2. ESTUDIOS DE BIOCAMPATIBILIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Para los estudios de biocompatibilidad se utilizaron larvas entre 5 y 7 dpf ya que a partir de las 5 dpf es que el cerebro, el corazón, el hígado, el páncreas, los riñones, el intestino y los sistemas sensoriales de *zebrafish* son completamente funcionales^[41]. En consecuencia, un tratamiento en este estadio del desarrollo es útil para estudiar los efectos de la administración de AgNPs en órganos formados y funcionales (estudio de la biocompatibilidad) (Véase Figura 4-2).

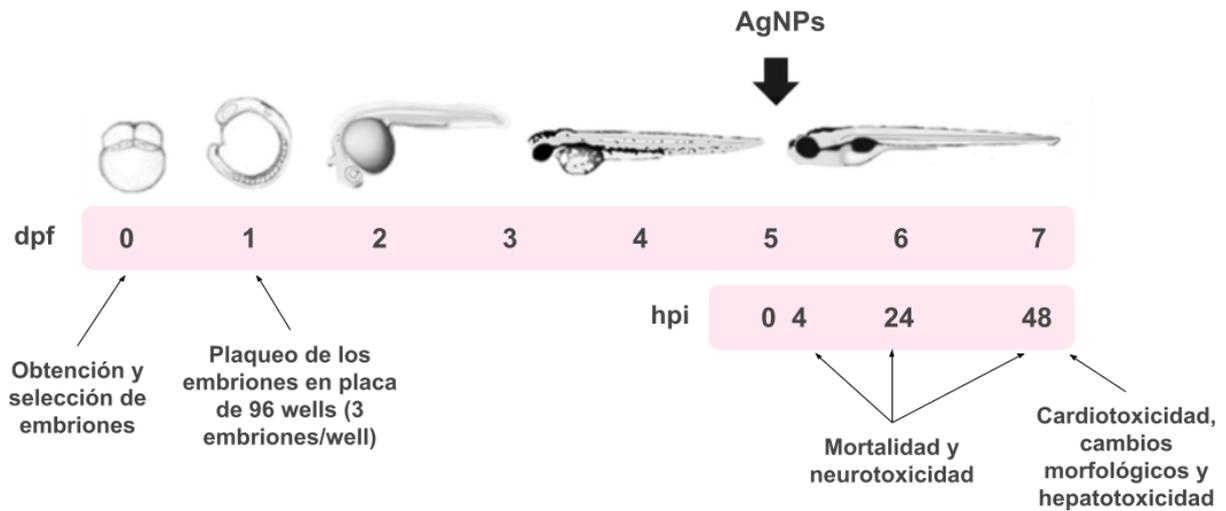


Figura 4-2. Línea de tiempo del desarrollo de *zebrafish* y de los ensayos de biocompatibilidad *in vivo*^[70].

Una vez obtenidos y seleccionados los embriones viables, se procedió a plaquear al día siguiente (1 dpf) 3 embriones por well en 225 μ L de medio E3 en una placa de 96 wells (96w), la cual se dejó incubando a 28°C bajo el ciclo de luz-oscuridad detallado previamente. A las 5 dpf, donde los embriones ya pasan al estadio larvario, se procedió con el tratamiento incubando 25 μ L de cada condición por well, lo cual determina las 0 hs post incubación (hpi). Las condiciones se basaron en diluciones seriadas del stock de AgNPs de 10.000 ppm en medio E3, siendo las concentraciones a testear: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 ppm (Véase Figura 4-3). Como control negativo se incubaron a las larvas con 25 μ L de medio E3. Las placas de 96w se mantuvieron en la incubadora en agitación a 28°C y con el mismo ciclo de luz-oscuridad.

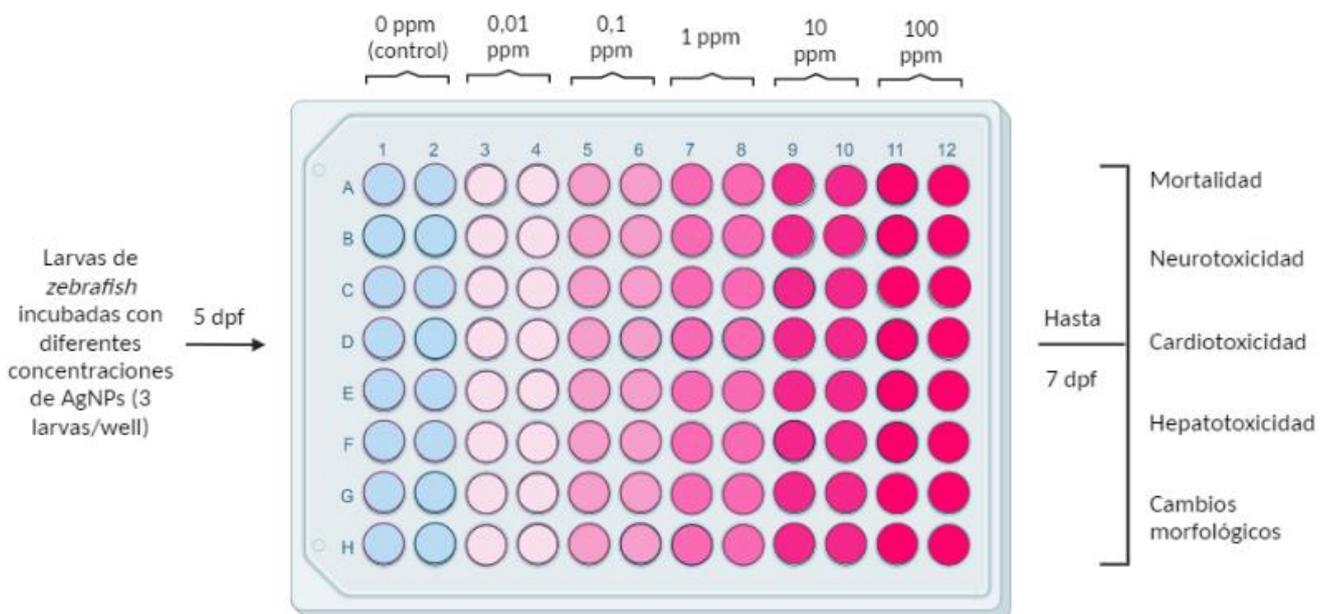


Figura 4-3. Esquema del tratamiento de las larvas de *zebrafish* con las AgNPs.

Para el tratamiento se realizaron 3 réplicas biológicas, es decir, que se hizo la incubación en tres ocasiones con huevos obtenidos a partir de distintos padres, a modo tal de incrementar la variabilidad genética del ensayo. Con cada réplica biológica se llevaron a cabo los ensayos de biocompatibilidad, a saber: (i) mortalidad, (ii) neurotoxicidad, (iii) cardiotoxicidad, (iv) cambios morfológicos y (v) hepatotoxicidad, evaluándose (i) y (ii) a las 4, 24 y 48 hpi, y (iii), (iv) y (v) a las 48 hpi (Véase **Figura 4-2**). Es importante mencionar que el ensayo finalizó a los 7 dpf (48 hpi) porque luego de este tiempo las larvas consumen su saco vitelino, requiriendo entonces de alimentación exógena. En este contexto, se impone una nueva variable porque comienza a regir una competencia por el alimento afectando la cantidad disponible para cada muestra.

4.2.1. Mortalidad

La mortalidad de las larvas se estudió a las 4, 24 y 48 hpi utilizando un estereomicroscopio considerando larvas muertas a aquellas con ausencia de latido cardíaco. La mortalidad en cada condición se expresó como el porcentaje de larvas muertas respecto del total de larvas para cada condición. Se llevaron a cabo 3 réplicas biológicas con 16 réplicas técnicas para cada condición, lo que se corresponde con un $n = 144$.

4.2.2. Neurotoxicidad: estudio de nado espontáneo

Dado que la actividad de nado espontáneo, tanto hipo como hiperactividad, es un parámetro de neurotoxicidad^{[65][71]}, se estudió la movilidad de las larvas a las 4, 24 y 48 hpi, y a temperatura ambiente, mediante un método óptico utilizando el equipo wMicrotracker (Designplus, Argentina)^{[65][66][67][68][72]}. Este sistema posee un haz de luz infrarroja que atraviesa cada well de una placa de 6, 12, 24, 96 o 384 wells; cuando el haz es interrumpido por el movimiento de una larva, la señal se interrumpe, considerándose como un evento de actividad. Así, el equipo permite determinar el número de eventos de actividad en cada well en una placa de 96w durante un tiempo específico que, para este ensayo, fue de 15 minutos. El movimiento espontáneo en cada condición se expresó como el porcentaje respecto del promedio de eventos de actividad en el grupo de larvas control tratadas con medio E3. Se llevaron a cabo 3 réplicas biológicas con 16 réplicas técnicas para cada condición, lo que se corresponde con un $n = 48$.

4.2.3. Cardiotoxicidad: estudio de ritmo cardíaco

Dado que las diferencias en el ritmo cardíaco de las larvas tratadas respecto de las larvas control puede considerarse un efecto cardiotóxico^[73], se estudió el ritmo cardíaco de las mismas a los 7 dpf y a las 48 hpi por filmación en estereomicroscopio^{[65][66][67]}. En adición, se determinó la presencia de edemas pericardiales^[74]. Para ello, en primer lugar, las larvas se transfirieron de forma individual a un portaobjetos y se inmovilizaron con una solución de carboximetilcelulosa sódica (CMC) 20 mg/mL. Se grabaron videos de las larvas durante 15 segundos, a partir de los cuales se realizó posteriormente el conteo manual de los latidos. El ritmo cardíaco se expresó como latidos por

minuto y los resultados de cada condición se expresaron como un porcentaje respecto del promedio de latidos de las larvas control. El conteo manual se realizó tres veces a partir de cada video, a modo tal de disminuir el error asociado. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 5 réplicas técnicas para cada condición ($n = 15$).

4.2.4. Cambios morfológicos

Las 5 larvas de cada una de las 3 réplicas biológicas ($n = 15$) utilizadas en 4.2.3. para determinar ritmo cardíaco, se fotografiaron posteriormente para analizar cambios morfológicos. Entre los cambios que se consideraron en este ensayo se incluyen (i) columna doblada, (ii) malformación de mandíbula, (iii) malformación de cola, (iv) malformación de cabeza, (v) necrosis en la región de la cabeza, (vi) necrosis hepática, (vii) necrosis del saco vitelino, (viii) vitelo no consumido, (ix) vejiga natatoria desinflada, y (x) presencia de edemas (Véase **Figura 4-4**).

(A)



(B)

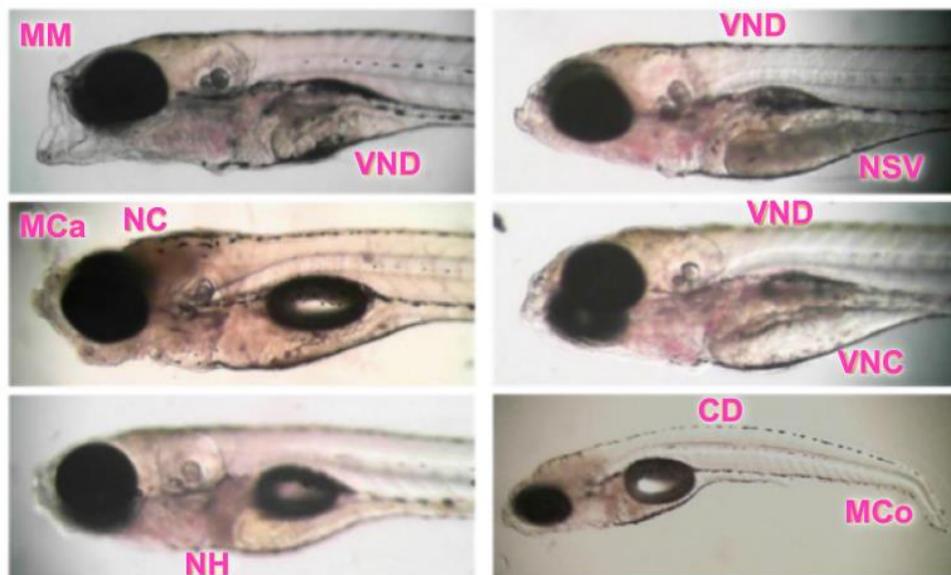


Figura 4-4. Morfología en larvas de zebrafish. (A) Morfología de una larva de *zebrafish* control de 7 dpf en posición dorsolateral. (B) Anomalías morfológicas que se pueden observar en larvas a los 7 dpf: columna doblada (CD); malformación de cabeza (Mca); malformación de cola (MCo); malformación de mandíbula (MM); necrosis en la cabeza (NC); necrosis hepática (NH); necrosis del saco vitelino (NSV); vitelo no consumido (VNC); vejiga natatoria desinflada (VND)^{[6][75]}.

Cada una de las larvas recibió un puntaje (*scoring*) en función de la cantidad de malformaciones presentadas^[73]:

- ♥ **0 (sin daño)**, para las larvas sin cambios morfológicos.
- ♥ **1 (daño leve)**, para las larvas con 1 o 2 anomalías morfológicas.
- ♥ **2 (daño moderado)**, para las larvas con 3 o 4 anomalías morfológicas.
- ♥ **3 (daño grave)**, para las larvas con más de 4 anomalías morfológicas.
- ♥ **4 (daño letal)**, para las larvas sin latido cardíaco.

A partir del puntaje obtenido para cada larva, se calculó el promedio de cambios morfológicos de cada condición, expresando los resultados como el *scoring* respecto del control. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 5 réplicas técnicas para cada condición (n = 15).

4.2.5. Hepatotoxicidad

Dado que un hígado sano se ve claro y translúcido, mientras que uno dañado se vuelve oscuro y opaco^[75] (Véase **Figura 4-5.**), se analizó el estado del hígado de las larvas control y de las larvas tratadas con las AgNPs a partir de las fotografías tomadas para analizar los cambios morfológicos en 2.3.4. El hígado se ubica en la zona posterior al pericardio y anterior al intestino, pudiendo ser observado cuando la larva se encuentra en posición dorsolateral^[6]. Se analizaron las 5 larvas de cada una de las 3 réplicas biológicas (n = 15) y se determinó si sus hígados presentaban degeneración o necrosis. Los resultados se expresaron como la cantidad de larvas con daño hepático respecto del total de larvas por condición.

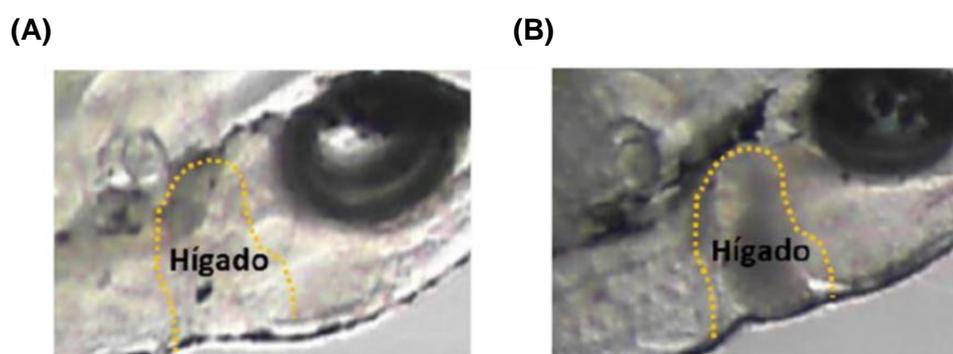


Figura 4-5. Morfología hepática en larvas de zebrafish. (A) Morfología del hígado de una larva de 7 dpf cuando no hay degeneración/necrosis hepática. (B) Morfología del hígado de una larva de 7 dpf luego de un tratamiento con una droga hepatotóxica^[6].

4.3. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de los datos obtenidos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.0. Las diferencias significativas con respecto al control se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunnett. Valores de $p \leq 0,05$

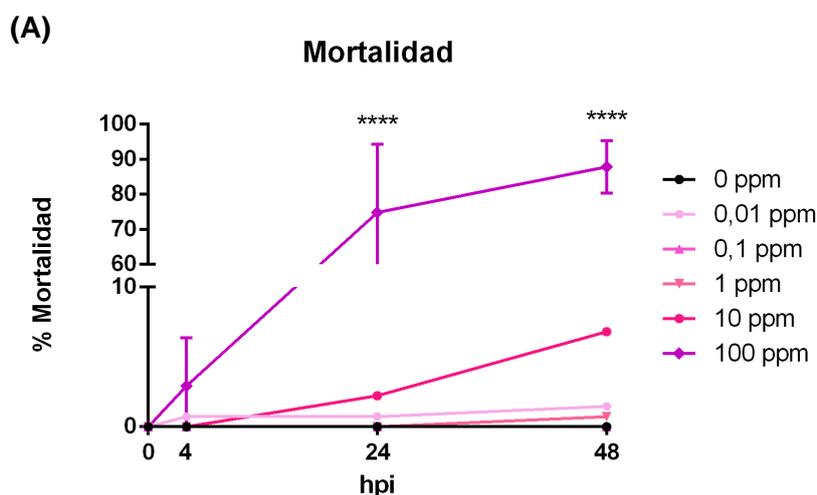
fueron considerados como significativos. Los distintos grados de significancia se representaron en los gráficos como asteriscos, siendo:

- ♥ *, cuando $p < 0,05$
- ♥ **, cuando $p < 0,01$
- ♥ ***, cuando $p < 0,001$
- ♥ ****, cuando $p < 0,0001$
- ♥ ns, cuando el valor fue no significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MORTALIDAD

No se observó un descenso significativo en la supervivencia de las larvas incubadas con las concentraciones de 0,01; 0,1, 1 y 10 ppm; sin embargo, a 100 ppm sí se observó un efecto letal altamente significativo conforme se incrementa el tiempo de incubación con las AgNPs (Véase **Figura 4-6 (A)**): a las 4 hpi ya se alcanza un 2,93% que luego progresa a un 74,83% a las 24 hpi, obteniéndose a las 48 hpi una mortalidad del 87,83%, representando casi el total de larvas incubadas para esa condición. La **Figura 4-6 (B)** muestra una ampliación de la **Figura 4-6 (A)**, a modo tal de dilucidar los porcentajes de mortalidad de las concentraciones más diluidas. En ella, se nota que el mayor porcentaje de mortalidad se alcanza a las 48 hpi con la condición de 10 ppm, representando el 6,8%.



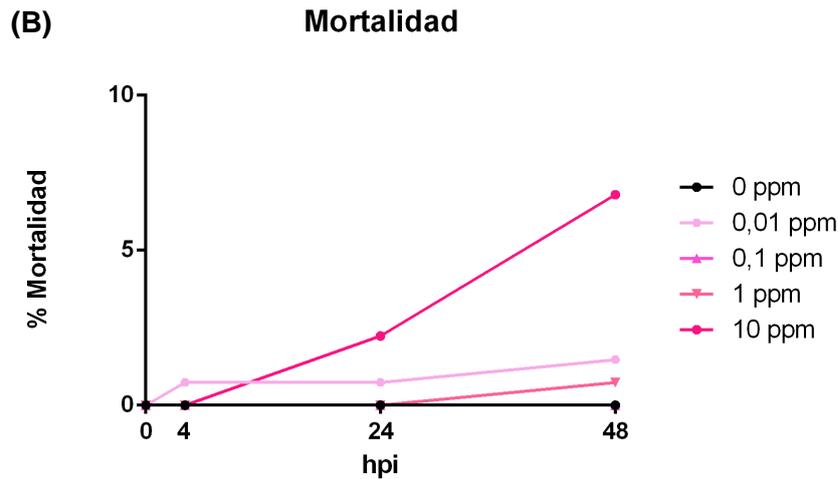
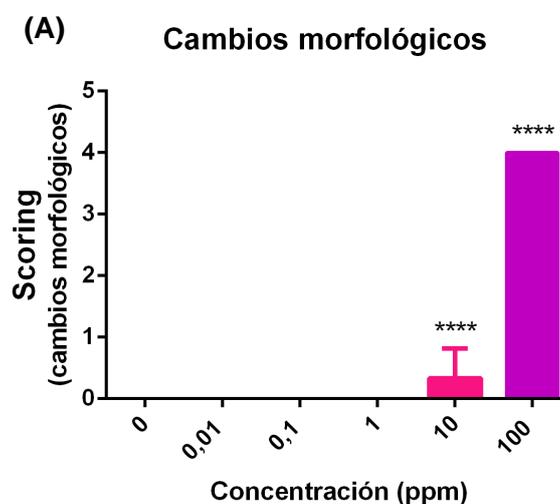


Figura 4-6. Mortalidad en larvas de zebrafish expuestas a AgNPs. Los resultados se expresan como el porcentaje de larvas muertas respecto del total de larvas. **(A)** Se muestra el % de mortalidad a las 0, 4, 24 y 48 hpi de todas las concentraciones testadas. **(B)** Se muestra el % de mortalidad a las 0, 4, 24 y 48 hpi de las concentraciones 0; 0,01; 0,1; 1 y 10 ppm.

CAMBIOS MORFOLÓGICOS

Las larvas expuestas a 0, 0,01, 0,1 y 1 ppm de AgNPs no presentaron anomalías morfológicas, por lo que se les asignó un *scoring* de 0 (Véase **Figura 4-7 (A)**). En la concentración de 10 ppm se observó un *scoring* menor a 1 pero superior a 0, con lo cual las larvas adquirieron daños morfológicos muy leves. Por otro lado, a 100 ppm se aprecia, con un alto grado de significancia estadística respecto del control, un *scoring* de 4 indicando larvas con ausencia de latido cardíaco, evento que se documentó en el ensayo de mortalidad a esta misma concentración (Véase **Figura 4-6 (A)**). Dentro de las anomalías morfológicas que se observaron se incluyen NH, NSV, VNC y VND (Véase **Figura 4-7 (B)**), siendo VND la más frecuente.



(B)

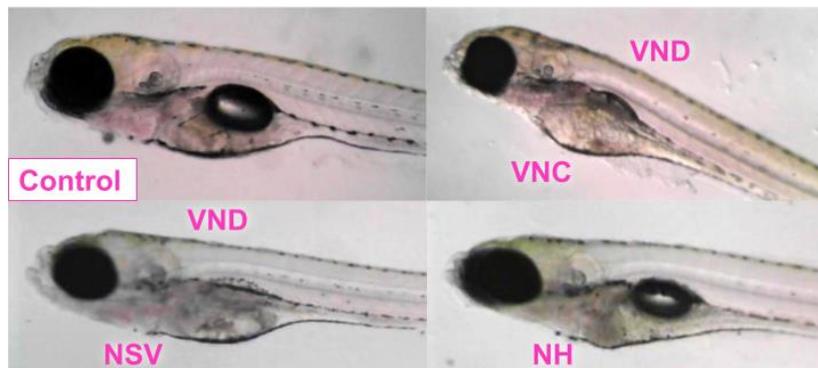


Figura 4-7. Anomalías morfológicas en larvas de zebrafish expuestas a AgNPs. (A) Daños morfológicos expresados como el promedio de cambios morfológicos para cada condición (*scoring*) respecto del control. **(B)** Anomalías morfológicas observadas (VND: vejiga natatoria desinflada; VNC: vitelo no consumido; NH: necrosis hepática; NSV: necrosis del saco vitelino).

ACTIVIDAD NEUROLÓGICA Y CARDÍACA

Respecto a la actividad neurológica, a las 4 hpi se observó un incremento en el movimiento espontáneo de las larvas incubadas con las concentraciones más diluidas —de 0,01 y 0,1 ppm— respecto del control (Véase **Figura 4-8 (A)**), que refiere a un momento excitatorio inicial de las larvas, efecto que luego a concentraciones más elevadas disminuye, observándose un descenso en el movimiento; a las 24 hpi esta tendencia se mantuvo y fue acompañada de un descenso abrupto en el movimiento en la concentración de 100 ppm (Véase **Figura 4-8 (B)**), hecho que también se debe al mayor porcentaje de mortalidad que se documentó a las 24 hpi (Véase **Figura 4-6 (A)**); a las 48 hpi se vio un descenso en el movimiento espontáneo más marcado en la concentración de 10 ppm y un movimiento prácticamente nulo en 100 ppm (Véase **Figura 4-8 (C)**). Si bien el descenso en el movimiento espontáneo también se asocia a la mortalidad de las larvas —ya que en ese contexto tampoco hay movimiento—, a las 4 hpi las larvas incubadas con las concentraciones de 10 y 100 ppm ya exhiben una disminución del movimiento, momento en el cual las larvas tenían casi un 100% de viabilidad (Véase **Figura 4-6 (A)**). Este efecto mantiene la misma tendencia a medida que transcurre el tiempo. Por consiguiente, la disminución en el movimiento espontáneo fue causada no sólo por un impacto letal sino también por un efecto neurotóxico bajo las concentraciones de 10 y 100 ppm.

Por otro lado, respecto a la actividad cardíaca, se apreció un incremento altamente significativo del ritmo cardíaco en todas las condiciones ensayadas (Véase **Figura 4-8 (D)**), con lo cual las larvas presentaron taquicardia. Para 100 ppm, no se observó ritmo cardíaco dado que este análisis se llevó a cabo a las 48 hpi, momento para el cual las larvas exhibieron un elevado porcentaje de mortalidad (Véase **Figura 4-6 (A)**). No se observaron edemas pericardiales en ninguna de las condiciones.

Realizando una comparación de los resultados de neurotoxicidad y cardiotoxicidad a las 48 hpi (Véase **Figura 4-8 (C)** y **Figura 4-8 (D)**), se documentó a 10 ppm un descenso en el movimiento espontáneo, el cual fue a su vez acompañado por un ligero descenso en el ritmo cardíaco de las larvas; momento a partir del cual éstas comenzaron a reducir el ritmo cardíaco hasta alcanzar la mortalidad en 100 ppm.

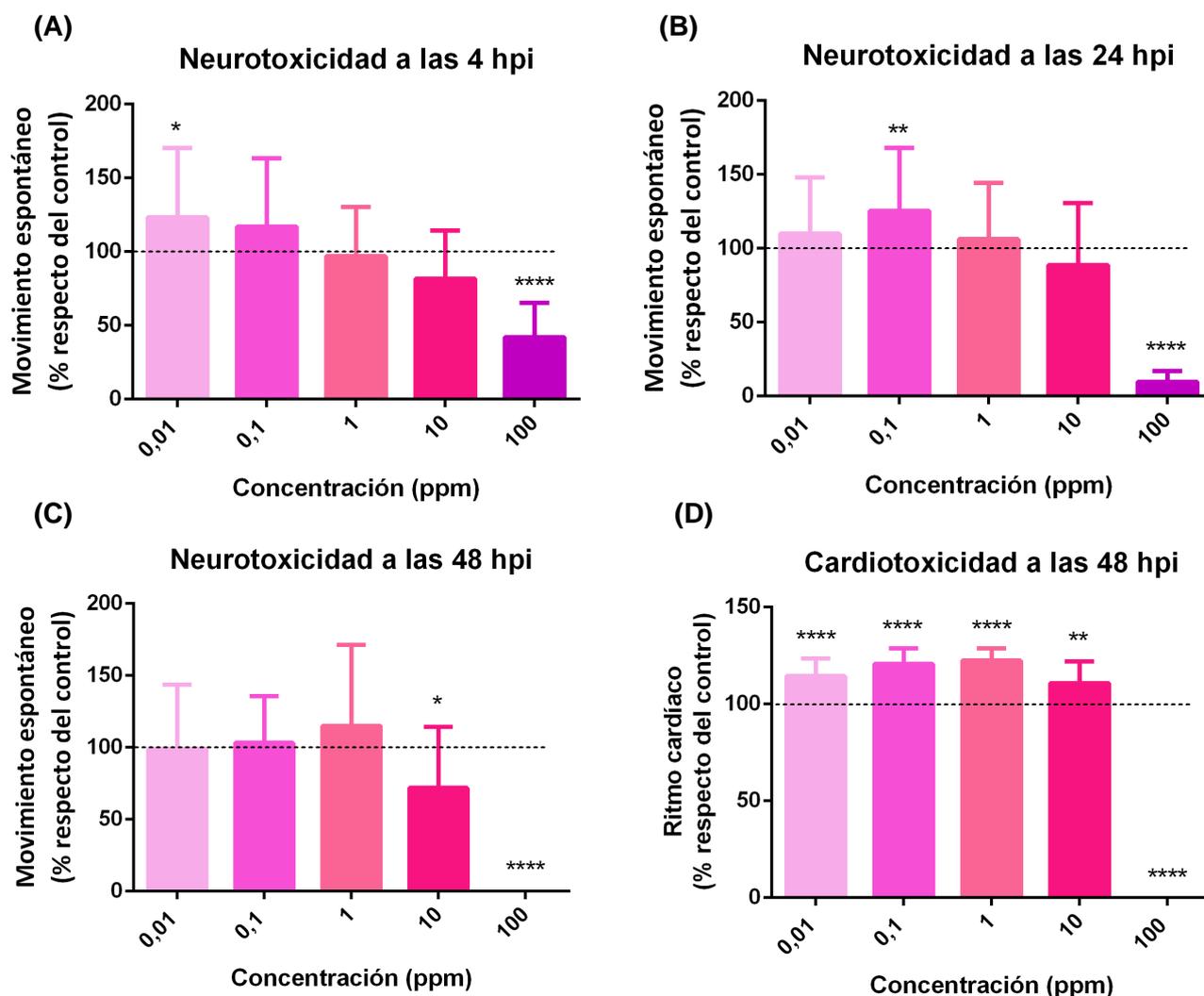


Figura 4-8. Actividad neurológica y cardíaca en larvas de zebrafish expuestas a AgNPs. Actividad neurológica (neurotoxicidad) a las **(A)** 4, **(B)** 24 y **(C)** 48 hpi expresada como el porcentaje de movimiento espontáneo respecto del control. **(D)** Actividad cardíaca (cardiotoxicidad) a las 48 hpi expresada como el porcentaje de frecuencia cardíaca respecto del control.

HEPATOTOXICIDAD

Con el estudio de degeneración hepática, se observó que, de cada 15 larvas estudiadas para las condiciones de 0; 0,01; 0,1; 1 y 10 ppm de AgNPs, sólo 2 de ellas presentaron necrosis en el hígado (Véase **Tabla 4-1**), lo que representa un 13,33% del total de larvas. Por consiguiente, estas NPs no resultaron hepatotóxicas en ninguna concentración.

| Tratamiento (ppm) | Cantidad de larvas con NH | Cantidad de larvas totales por condición |
|-------------------|---------------------------|--|
| 0 | 0 | 15 |
| 0,01 | 2 | 15 |
| 0,1 | 2 | 15 |
| 1 | 2 | 15 |
| 10 | 2 | 15 |

Tabla 4-1. Hepatotoxicidad en larvas de *zebrafish* expuestas a AgNPs. Los valores se muestran como la cantidad de larvas con NH respecto del total de larvas para cada condición.

CONCLUSIONES PARCIALES

El análisis nanotoxicológico de AgNPs en el modelo animal *zebrafish* reveló que el tratamiento resultó cardiotóxico en todas las concentraciones testadas, mostrando un incremento en el ritmo cardíaco y luego una disminución del mismo por la letalidad de la concentración de 100 ppm. Se observó modificación en el movimiento espontáneo a 10 y 100 ppm, y un efecto letal a 100 ppm. Por otro lado, las larvas presentaron anomalías morfológicas muy leves a 10 ppm y no exhibieron necrosis hepática en ninguna de las condiciones estudiadas. Por ello, se puede concluir que las AgNPs no son teratogénicas ni hepatotóxicas en este modelo para las concentraciones y tiempos ensayados.



CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES FINALES

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES FINALES

En primer lugar, se caracterizaron las AgNPs y se observó que las mismas comprenden una población moderadamente polidispersa de NPs con un tamaño promedio de 904 nm, morfologías heterogéneas y cierta inestabilidad, que cabe mencionar se debe al exceso de energía libre que presentan normalmente las NPMs como consecuencia de su elevada área superficial. Es por ello que en los procesos de síntesis se las suelen estabilizar con agentes protectores —tales como polímeros, surfactantes, ligandos orgánicos, disolventes, entre otros— que sean capaces de superar las fuerzas atractivas entre las NPs^[76], proceso que se está poniendo a punto por nuestro grupo de trabajo. Respecto a los estudios microbiológicos, se concluye que las AgNPs son eficientes para inhibir el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. En relación a esto último, teniendo en cuenta que el objetivo futuro de este estudio es aplicar a las AgNPs como antimicrobianos en el tratamiento de lesiones cutáneas, resulta sumamente importante que éstas sean capaces de inhibir tanto a *P. aeruginosa* como a *S. aureus*, ya que en aquellos individuos que poseen heridas crónicas, estas bacterias son las principales responsables de que la herida no cicatrice^{[77][78]}, además del hecho de que presentan resistencia antibiótica tanto intrínseca como adquirida^[78], dificultando aún más el cuadro clínico. Utilizando estas AgNPs se puede inhibir el crecimiento de bacterias multirresistentes por múltiples mecanismos, resultando en una excelente alternativa a los tratamientos convencionales. Por último, respecto a los análisis nanotoxicológicos, las AgNPs no exhibieron efectos hepatotóxicos ni teratogénicos en *zebrafish*. Sin embargo, sí resultaron cardiotoxicas en todas las concentraciones ensayadas y neurotóxicas y letales en altas concentraciones y a largo plazo.

Los valores de CIM representan el resultado de una prueba *in vitro* en la que una concentración fija y estática de AgNPs se incubaba con una concentración inicialmente fijada de bacterias en un medio acuoso, situación sobreestimada ya que la flora bacteriana de la piel contiene concentraciones de bacterias mucho menores, y que pueden fluctuar ampliamente. Los datos *in vitro* proporcionan información sobre la acción potencial de las AgNPs pero este es sólo uno de los muchos factores necesarios para predecir un resultado clínico favorable^[63]. Es importante mencionar también que en la práctica clínica los agentes bacteriostáticos se han usado eficientemente para el tratamiento de diversas enfermedades bacterianas^[63]. Respecto a los ensayos nanotoxicológicos *in vivo*, se lograron dilucidar las implicaciones tóxicas de las AgNPs en el modelo animal *zebrafish* bajo determinadas condiciones experimentales, a modo tal de conocer los posibles efectos secundarios que pueda producir un tratamiento en seres humanos^[9]. Es necesario destacar que, si bien estos estudios son eficientes para la determinación de efectos colaterales comparables en humanos, las dosis que se podrían aplicar en un tratamiento requieren estudios clínicos posteriores.



CAPÍTULO 6: PERSPECTIVAS A FUTURO

CAPÍTULO 6: PERSPECTIVAS A FUTURO

Este trabajo de investigación forma parte del proyecto I+D “Estudios toxicológicos de compuestos nanotoxicológicos en el modelo *zebrafish*” del LBN de la UNQ, y se enmarca dentro del doctorado en curso de la Lic. Ayelen M. Sosa, co-directora del presente seminario, titulado “Film nanotecnológico con materiales autóctonos: liberación paulatina de agentes bactericidas y cicatrizantes para el tratamiento de lesiones cutáneas”. En base a los resultados obtenidos en este seminario, se determinó que las AgNPs caracterizadas representan excelentes candidatas para el tratamiento de estas lesiones, ya que han exhibido una CIM para cepas bacterianas de interés clínico y son eficientes para *bypassear* los mecanismos de multirresistencia. Además de la evaluación *in vivo* expuestas en este seminario, se realizarán a futuro ensayos de biocompatibilidad *in vitro* —MTT, cristal violeta y rojo neutro— en queratinocitos de la piel (línea HaCat) y en fibroblastos murinos (línea 3T3)^[79], con la finalidad de evaluar la citotoxicidad de las AgNPs en células basales y profundas de la piel. Todos estos resultados serán la base para la realización del seminario de grado de la estudiante Belen E. Berin “Desarrollo de compósitos nanotecnológicos con aplicaciones médicas: caracterización *in vitro* e *in vivo*”, dirigido por la Dra. M. Jimena Prieto y co-dirigido por la Lic. Ayelen M. Sosa. Belen incorporará las AgNPs en emulsiones o/w con diversos principios activos para luego integrarlos en films de gelatina, a los cuales le caracterizará la eficiencia antibacteriana y la nanotoxicidad en HaCat y 3T3 y en el modelo animal *zebrafish*. A raíz de estos trabajos se espera poder poner a punto un tratamiento eficiente y seguro para combatir los daños tisulares.

Mi camino como becaria de grado en el LBN me permitió adquirir seguridad en el trabajo de laboratorio, criterio en el análisis de datos, aprender a trabajar en equipo y obtener experiencia en la presentación a congresos; todas herramientas que me enriquecieron como estudiante y que me ayudarán para desenvolverme como profesional.

REFERENCIAS

- [1] Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases*, 2(4), MR17–MR71.
- [2] Rahman, Z., Charoo, N. A., Akhter, S., Beg, S., Reddy, I. K., & Khan, M. A. (2018). *Nanotechnology-based drug products. Nanoscale Fabrication, Optimization, Scale-Up and Biological Aspects of Pharmaceutical Nanotechnology*, 619–655.
- [3] Joris, F., Manshian, B. B., Peynshaert, K., De Smedt, S. C., Braeckmans, K., & Soenen, S. J. (2013). Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. *Chemical Society reviews*, 42(21), 8339–8359.
- [4] Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., & Farokhzad, O. C. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83(5), 761–769.
- [5] Markowicz-Piasecka, M. & Mikiciuk-Olasik, E. (2016). Dendrimers in drug delivery. *Nanobiomaterials in Drug Delivery*, 39–74.
- [6] Igartúa, D. E. (2019). *Nanotecnología Farmacéutica basada en Dendrímeros aplicada al tratamiento del Alzheimer* [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Quilmes.
- [7] Ferrari, E. & Soloviev, M. (2020). *[Methods in Molecular Biology] Nanoparticles in Biology and Medicine*. Springer.
- [8] Dolez, P. I. (2015). Nanomaterials Definitions, Classifications, and Applications. *Nanoengineering*, 3-40.
- [9] Martínez, C. S., Igartúa, D. E., Calienni, M. N., Feas, D. A., Siri, M., Montanari, J., Chiaramoni, N. S., Del Valle Alonso, S. & Prieto, M. J. (2017). Relation between biophysical properties of nanostructures and their toxicity on zebrafish. *Biophysical reviews*, 9(5), 775–791.
- [10] Kargozar, S., & Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15492–15500.
- [11] Kolhe, P., Misra, E., Kannan, R. M., Kannan, S., & Lieh-Lai, M. (2003). Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *International journal of pharmaceuticals*, 259(1-2), 143–160.
- [12] Rajabi, M., Srinivasan, M. & Mousa, S. A. (2016). Nanobiomaterials in drug delivery. *Nanobiomaterials in Drug Delivery*, 1–37.
- [13] Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1534.

- [14] Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2007). Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicological Sciences*, 101(2), 239–253.
- [15] Khanna, P.; Kaur, A.; Goyal, D. (2019). Algae-based metallic nanoparticles. Synthesis, characterization and applications. *Journal of Microbiological Methods*, 163, 105656.
- [16] Bayat, M., Zargar, M., Chudinova, E., Astarkhanova, T., & Pakina, E. (2021). In Vitro Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: The First Report of Applying Biogenic Nanoparticles against *Pilidium concavum* and *Pestalotia* sp. Fungi. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5402.
- [17] Kvittek, L., Panacek, A., Pucek, R. Soukupova, J., Vanickova, M., Kolar, M. & Zboril, R. (2011). Antibacterial activity and toxicity of silver – nanosilver versus ionic silver. *Journal of Physics: Conference Series*, 304, 012029.
- [18] Flores, C. Y. (2014). *Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida* [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química.
- [19] Negut, I., Grumezescu, V., & Grumezescu, A. M. (2018). Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9), 2392.
- [20] Rubilar, O., Rai, M., Tortella, G., Diez, M. C., Seabra, A. B., & Durán, N. (2013). Biogenic nanoparticles: copper, copper oxides, copper sulphides, complex copper nanostructures and their applications. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1365–1375.
- [21] Ermini, M. L., & Voliani, V. (2021). Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age. *ACS nano*, 15(4), 6008–6029.
- [22] Mathur, P., Jha, S., Ramteke, S., & Jain, N. K. (2017). Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1–12.
- [23] Zielińska, A., Costa, B., Ferreira, M. V., Miguéis, D., Louros, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Chaud, M. V., Morsink, M., Willems, N., Severino, P., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Nanotoxicology and Nanosafety: Safety-By-Design and Testing at a Glance. *International journal of environmental research and public health*, 17(13), 4657.
- [24] Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, 7, 1831.
- [25] Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Liu, Q., Cheng, Z., Dai, G., Wu, G., Wang, L., & Chen, L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of nanomedicine*, 14, 1469–1487.
- [26] Pelgrift, Robert Y.; Friedman, Adam J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14), 1803–1815.

- [27] Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, 67(3), 159–173.
- [28] Piorel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P. & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 1-27.
- [29] López, L. S. (2021). *Estudio de factores de virulencia en Escherichia coli* [Trabajo de fin de grado]. Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid.
- [30] Pérez, C. Zúñiga, T. & Palavecino, C. E. (2021). Photodynamic therapy for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 34, 102285.
- [31] Mrochen, D. M., Fernandes de Oliveira, L. M., Raafat, D., & Holtfreter, S. (2020). *Staphylococcus aureus* Host Tropism and Its Implications for Murine Infection Models. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7061.
- [32] Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 7202.
- [33] Ameh, T., & Sayes, C. M. (2019). The Potential Exposure and Hazards of Copper Nanoparticles: A Review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 71, 103220.
- [34] Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International journal of nanomedicine*, 15, 2555–2562.
- [35] Mogollón Cortez, G. F. & Veloz Chipre, X. V. (2021). *Síntesis de nanopartículas de plata utilizando hojas de Petiveria Alliacea L. (Anamú) y su aplicación en tratamiento de aguas* [Trabajo de grado]. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química.
- [36] Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W. & Borm, P. J. A. (2004). Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.*, 61(9), 727–728.
- [37] Ubaid K. A., Zhang X., Sharma V. K. & Li L. (2020). Fate and risk of metal sulfide nanoparticles in the environment. *Environ. Chem. Lett.*, 18(1), 97–111.
- [38] Bai, C., & Tang, M. (2019). Toxicological study of metal and metal oxide nanoparticles in zebrafish. *Journal of applied toxicology: JAT*, 40(1), 37–63.
- [39] Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2337–2343.
- [40] Streisinger, G., Singer, F., Walker, C., Knauber, D. & Dower, N. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics*, 112, 311–319 (1986).
- [41] De Esch, C., Sliker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R. & de Groot, D. (2012) Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: A mini review. *Neurotoxicology and Teratology*, 34(6), 545–553.
- [42] Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., & Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical research in toxicology*, 33(1), 95–118.

- [43] Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, 203: 253-310.
- [44] Bohnsack, J. P., Assemi, S., Miller, J. D., & Furgeson, D. Y. (2012). The Primacy of Physicochemical Characterization of Nanomaterials for Reliable Toxicity Assessment: A Review of the Zebrafish Nanotoxicology Model. *Nanotoxicity. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 926, 261–316.
- [45] de Abreu, M. S., Giacomini, A. C. V. V., Echevarria, D. J. & Kalueff, A. V. (2019). Legal aspects of zebrafish neuropharmacology and neurotoxicology research. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 101, 65–70.
- [46] Lammer, E., Kamp, H. G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E. R., Wendler, K., Zok, S., & Braunbeck, T. (2009). Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 23(7), 1436–1442.
- [47] Nishimura, Y., Inoue, A., Sasagawa, S., Koiwa, J., Kawaguchi, K., Kawase, R., Maruyama, T., Kim, S., & Tanaka, T. (2016). Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenital anomalies*, 56(1), 18–27.
- [48] Goessling, W., & Sadler, K. C. (2015). Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology*, 149(6), 1361–1377.
- [49] Bambino, K., Morrison, J., & Chu, J. (2019). Hepatotoxicity in Zebrafish Larvae. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1965, 129–138.
- [50] Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 86(1), 6–19.
- [51] Bauer, B., Mally, A., & Liedtke, D. (2021). Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13417.
- [52] Maciag, M., Wnorowski, A., Mierzejewska, M., & Plazinska, A. (2022). Pharmacological assessment of zebrafish-based cardiotoxicity models. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 148, 112695.
- [53] Jia, K., Cheng, B., Huang, L., Xiao, J., Bai, Z., Liao, X., Cao, Z., Shen, T., Zhang, C., Hu, C., & Lu, H. (2020). Thiophanate-methyl induces severe hepatotoxicity in zebrafish. *Chemosphere*, 248, 125941.
- [54] Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology advances*, 32(4), 711–726.
- [55] Tomaszewska, E., Soliwoda, K., Kadziola, K., Tkacz-Szczesna, B., Celichowski, G., Cichomski, M., Szmaja, W. & Grobelny, J. (2013). Detection Limits of DLS and UV-Vis Spectroscopy in Characterization of Polydisperse Nanoparticles Colloids. *Journal of Nanomaterials*, 1–10.

- [56] Sponton, O. E. (2016). *Desarrollo de nanopartículas biopoliméricas para la encapsulación de ácidos grasos poliinsaturados* [Tesis doctoral]. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química.
- [57] Friederici, M. G. (2013). *Nanopartículas de Au y Pd: Síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas* [Tesis de doctorado] Universidad de Barcelona, Departamento de Química Inorgánica.
- [58] Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 697, 63–70.
- [59] Batalla Mayoral, J., Cuadros Moreno, A., San Martín-Martínez, E. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8(4). 4319-1-4319-6.
- [60] Parveen, F., Sannakki, B., Mandke, M. V., & Pathan, H. M. (2016). Copper nanoparticles: Synthesis methods and its light harvesting performance. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 144, 371–382.
- [61] Mussin, J., Robles-Botero, V., Casañas-Pimentel, R., Rojas, F., Angiolella, L., San Martín-Martínez, E., & Giusiano, G. (2021). Antimicrobial and cytotoxic activity of green synthesis silver nanoparticles targeting skin and soft tissue infectious agents. *Scientific reports*, 11(1), 14566.
- [62] Horna Quintana, G., Silva Diaz, M., Vicente Taboada, W., Tamariz Ortiz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Med Hered*, 16(1), 39-45.
- [63] Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864–870.
- [64] Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351.
- [65] Prieto, M.J., Gutierrez, H. C., Arévalo, R., Chiaramoni, N. S. & Del Valle Alonso, S. (2012). Effect of Risperidone and Fluoxetine on the Movement and Neurochemical Changes of Zebrafish. *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 2(4), 129-138.
- [66] Feas, D.A., Igartúa, D. E., Calienni, M. N., Martinez, C. S., Pifano, M., Chiaramoni, N. S., Del Valle Alonso, S. & Prieto, M. J. (2017). Nutraceutical emulsion containing valproic acid (NE-VPA): a drug delivery system for reversion of seizures in zebrafish larvae epilepsy model. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 47, 429-437.
- [67] Igartúa, D. E., Calienni, M. N., Feas, D. A., Chiaramoni, N. S., Del Valle Alonso, S., & Prieto, M. J. (2015). Development of Nutraceutical Emulsions as Risperidone Delivery Systems: Characterization and Toxicological Studies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(12), 4142–4152.

- [68] Martínez, C. S., Feas, D. A., Siri, M., Igartúa, D. E., Chiaramoni, N. S., Del V Alonso, S., & Prieto, M. J. (2018). In vivo study of teratogenic and anticonvulsant effects of antiepileptics drugs in zebrafish embryo and larvae. *Neurotoxicology and teratology*, 66, 17–24.
- [69] Igartúa, D. E., Azcona, P. L., Martínez, C. S., Alonso, S., Lassalle, V. L., & Prieto, M. J. (2018). Folic acid magnetic nanotheranostics for delivering doxorubicin: Toxicological and biocompatibility studies on Zebrafish embryo and larvae. *Toxicology and applied pharmacology*, 358, 23–34.
- [70] Martínez, C. S., Igartúa, D. E., Czarnowski, I., Feas, D. A., Alonso, S. D., & Prieto, M. J. (2019). Biological response and developmental toxicity of zebrafish embryo and larvae exposed to multi-walled carbon nanotubes with different dimension. *Heliyon*, 5(8), e02308.
- [71] Selderslaghs, I. W., Hooyberghs, J., Blust, R., & Witters, H. E. (2013). Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicology and teratology*, 37, 44–56.
- [72] Prieto, M. J., del Rio Zabala, N. E., Marotta, C. H., Carreño Gutierrez, H., Arévalo Arévalo, R., Chiaramoni, N. S., & del Valle Alonso, S. (2014). Optimization and in vivo toxicity evaluation of G4.5 PAMAM dendrimer-risperidone complexes. *PLoS one*, 9(2), e90393.
- [73] Berghmans, S., Butler, P., Goldsmith, P., Waldron, G., Gardner, I., Golder, Z., Richards, F. M., Kimber, G., Roach, A., Alderton, W., & Fleming, A. (2008). Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function--potential safety screens for early drug discovery. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 58(1), 59–68.
- [74] Fako, V. E., & Furgeson, D. Y. (2009). Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6), 478–486.
- [75] He, J. H., Guo, S. Y., Zhu, F., Zhu, J. J., Chen, Y. X., Huang, C. J., Gao, J. M., Dong, Q. X., Xuan, Y. X., & Li, C. Q. (2013). A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 67(1), 25–32.
- [76] Friederici Muñoz, M. G. (2013). *Nanopartículas de Au y Pd: Síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas* [Tesis de doctorado]. Universidad de Barcelona, Departamento de Química Inorgánica.
- [77] Rahim, Kashif; Saleha, Shamim; Zhu, Xudong; Huo, Liang; Basit, Abdul; Franco, Octavio Luiz (2017). Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microbial Ecology*, 73(3), 710–721.
- [78] Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimo, U. F., Caroleo, B., ... de Franciscis, S. (2015). Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(5), 605–613.
- [79] Igartúa, D. E., Martínez, C. S., del V. Alonso, S., & Prieto, M. J. (2020). Combined Therapy for Alzheimer's Disease: Tacrine and PAMAM Dendrimers Co-Administration Reduces the Side Effects of the Drug without Modifying its Activity. *AAPS PharmSciTech*, 21(3).

AGRADECIMIENTOS

Aún recuerdo la emoción que tenía aquella vez que conocí los laboratorios de la UNQ. Quienes me conocen saben cuánto amo la ciencia y lo feliz que me hace hacer investigación. Estoy escribiendo estas palabras con lágrimas en los ojos, sumamente agradecida con cada persona que pasó por mi vida y que dejó una huella en mi corazón. Este logro es un logro colectivo, no podría haber llegado hasta acá si no fuera por todo el amor y la contención que recibí a lo largo de todos estos años.

En primer lugar, quiero agradecer a mi amada UNQ, mi segunda casa; la que me dio la posibilidad de formarme académicamente de manera gratuita en un ambiente de extremada calidez. En ella di mis primeros pasos en la investigación y en la docencia, experiencias que sumaron muchísimo a mi formación como profesional y que me confirmaron que mi camino efectivamente era este.

A mi mamá, a mi papá y a mi hermano, que me apoyaron en mis crisis, festejaron mis aciertos y me contuvieron en mis caídas. Mamá, mi modelo a seguir, la mujer que más admiro en este mundo por la fuerza de su mente y de su corazón, mi compañera número uno; papá, el que con una mirada ya entiende cómo me siento, y quien me enseñó que lo más importante es ser buena persona y que la patria es el otro, siempre. Alan, quien me llena de orgullo al ver el hombre increíble en el que se convirtió, lleno de hermosos valores y con un corazón enorme: a vos te quiero agradecer cada unión, cada alegría compartida, cada complicidad, cada abrazo reconfortante. Sos la persona que más amo en este mundo.

A mi abuela, aquella mujer que con su dulzura siempre me saca una sonrisa y me hace sentir amada; estoy enormemente agradecida con Dios de que estés hoy conmigo, presente en este momento tan especial. Sos mi persona favorita. A mi madrina Cristy, esa tía con la que peleo constantemente y que me hace tentar de la risa con sus locuras. Gracias por amarnos tanto a Alan y a mí, sos nuestra segunda mamá.

A mi abuelo Guillermo, mi viejito... ¡cuánto te extraño! El día que te fuiste, te llevaste una parte de mi alma con vos. Te siento cada vez que el viento sopla, y te veo en mis sueños cuando estoy perdida, en donde me guías hacia el camino correcto. Gracias por estar espiritualmente acompañándome en cada paso que doy.

A mi operón... aquellos dos hombres que comenzaron siendo amigos de cursada y que hoy en día son uno de los pilares más importantes de mi vida, Pato y Ale: Pato, mi bff, mi rey, mi confidente, el que con una mirada ya entiende todo lo que quiero decir, quien sabe perfectamente qué decir para hacerme sentir mejor, emocionarme o tentarme de la risa. Te quiero, te amo y te adoro; Ale, mi fiel amigo y compañero de mesada, el que me hace llorar de la risa con sus anécdotas y ocurrencias, quien me da los mejores consejos y unos hermosos abrazos de oso, de esos que me renuevan, y de quien aprendí muchísimo. No me alcanzan las palabras para agradecerles todo lo

que hicieron por mí, si no fuera por ustedes dos no estaría en donde estoy hoy en día. Son parte de mi familia. Mi corazón les pertenece para siempre.

A Viki, mi mejor amiga, la que me saca las mejores sonrisas y me da los abrazos más lindos y reconfortantes, con quien puedo ser yo misma. Le das luz a mi vida, amiga mía. Gracias por tu honestidad y por tu amor. Espero tenerte siempre, y que sigamos festejando nuestro cumpleaños juntas.

A mis mejores amigas de la vida, Aye y Ro, mi bello team. Gracias chicas por estar siempre para mí, en los buenos y en los malos momentos, desde hace... ¿cuántos años ya? ¡Perdí la cuenta! Estoy muy orgullosa de las tremendas mujeres que son, y de verlas perseguir sus sueños. Sé que van a lograr grandes cosas.

A Guille, el amor de mi vida, yo sé que sabés todo lo que siento por vos desde que te conocí hace ya tantos años... Gracias por amarme, por ser tan dulce conmigo, por escucharme y contenerme, y por respetar mis tiempos. Soy muy afortunada de estar acompañada de un hombre tan hermoso como vos.

A mis UNQamiguitas: Lu M., Lu Z. y Mari. Hermosas y dulces mujeres que conocí en las primeras materias de la UNQ y con las que hoy en día mantengo una relación sumamente especial. Gracias amiguita Lu por dejarme formar parte de la vida de tu hija, te prometo que le voy a dar a Sienni todo el amor que tenga en mi corazón.

A Marian, mi mejor amigo de la vida, aquella persona que conocí hace ya tanto tiempo en el Nacio al canto de "*We are the world, we are the children...*", y quien hoy es de las personas más importantes. Gracias por apoyarme y amarme tanto, amigo. A mi querido Basti, gracias mi vida por cada consejo, por cada mate y por ser tan tierno conmigo. A Nico, mi compañero musical y mi colega científico; siempre con una sonrisa y un karaoke a mano.

A mis amigas de la UNQ: Ari, Maga, Tere, Facu, Du, Fran, Fede, Nahu, Eze, personas increíbles con las que me relacioné en diferentes etapas de mi carrera; cada una me dejó una enseñanza y me ayudó a crecer como persona. A Juancho y a Marianelilla, mis primerxs amigas universitarias, quienes me hicieron sentir como en casa con su calidez y su afecto.

A Jime y a Caro, las mejores directoras que una becaria podría tener. Gracias chicas por confiar en mí y por formarme desde aquel 2018 cuando empezamos a trabajar juntas. Gracias por tratarme siempre con mucho amor, y por permitir que nuestro lazo sea más personal que profesional; gracias por cada consejo y por cada abrazo. Las admiro no sólo por lo inteligentes y exitosas mujeres que son, sino porque son excelentes personas que siempre actúan desde la sinceridad y el cariño. Me hace muy bien verlas tan felices a las dos, con sus nuevos proyectos. Les deseo los mejores éxitos. A Aye, mi co-dire-ami, quien me acompañó en todo este trabajo y me entrenó con mucha paciencia y afecto. Gracias por confiar en mi capacidad y ayudarme a crecer. Merecés que la vida te regale muchas cosas lindas por toda la fuerza que tenés en tu corazón. Te admiro muchísimo. A Belu,

nuestra nueva integrante del *zebrateam* y mi compañera bachatera, gracias por cada charla y por cada baile juntas.

A Silvia por dejarme formar parte del LBN y por siempre recibirme con una sonrisa. A todxs mis compañeros y compañeras del LBN, Naty, Dave, Dani, Nanu, Fer, Jor, Luis, Coni, Sofi, Egly, Marian, Gastón, Taís y Vicky, por todos esos mates, consejos, tardes de música con ensayos y charlas eternas.

Y, por último, a Dios. La fe siempre me mantuvo en pie y me dio la fuerza que necesitaba para seguir adelante en todos los aspectos de mi vida.

GRACIAS a todxs. Me explota el corazón de amor.