



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



Universidad
Nacional
de Quilmes

Berin, Belén E.

Desarrollo de compósitos nanotecnológicos con aplicaciones médicas : caracterización in vitro e in vivo



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:

Berin, B. E. (2023). *Desarrollo de compósitos nanotecnológicos con aplicaciones médicas: caracterización in vitro e in vivo. (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/20.500.11807/4230>

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

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

DESARROLLO DE COMPÓSITOS NANOTECNOLÓGICOS CON APLICACIONES MÉDICAS:

CARACTERIZACIÓN *IN*
VITRO E *IN VIVO*



Universidad
Nacional
de Quilmes



Belen E. Berin
Directora: Maria J. Prieto
Co-directora: Ayelen M. Sosa

Universidad Nacional de
Quilmes

2023

Becas recibidas

- Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC), financiada por el Consejo Interuniversitario Nacional (CIN)-Marzo 2023.

Participación en eventos CyT

- IV Jóvenes Bionanocientíficos (JoBioN): 23 y 24 de noviembre de 2022.

ÍNDICE

ÍNDICE

Glosario	5
Objetivos	6
Resumen	7

01. Capítulo 18

Estado del arte

1.1. ¿Qué es la nanotecnología?	9
1.2. Nanopartículas metálicas	12
1.2.1. Nanopartículas de plata	12
1.3. Sistema <i>delivery</i>	14
1.3.1. Emulsiones <i>o/w</i>	15
1.3.2. Nanocompósitos de biopolímeros	15
1.4. Actividad antimicrobiana	19
1.5. Nanotoxicología	19
1.5.1. Nanotoxicidad en cultivos celulares	20
1.5.2. Nanotoxicidad utilizando <i>zebrafish</i> como modelo animal	23
1.5.3. Estudios de toxicidad general y órgano-específica	25

02. Capítulo 227

Emulsiones aceite/agua

2.1. Metodología empleada	28
2.1.1. Encapsulación de NPMs en emulsiones <i>o/w</i>	28
2.1.2. Caracterización de emulsiones	29
2.1.3. Obtención de nanocompósitos de gelatina	29
2.2. Resultados y discusión	30

03. Capítulo 334

Caracterización *in vitro*

3.1. Metodología empleada	35
3.1.1. Mantenimiento celular	35
3.1.2. Ensayos de toxicidad con AgNPs	36
3.1.3. Citotoxicidad por cristal violeta	37
3.1.4. Activación metabólica por el método de reducción de MTT	39
3.1.5. Ensayos de captura de rojo neutro	39
3.1.6. Análisis estadístico	39
3.1.7. Ensayos microbiológicos	40
3.2. Resultados y discusión	42

04. Capítulo 449

Caracterización *in vivo*

4.1. Metodología empleada	50
4.1.1. Obtención de huevos fertilizados	50
4.1.2. Efecto toxicológico general	52
4.1.3. Efecto toxicológico órgano-específico	53
4.1.4. Análisis estadístico	54
4.2. Resultados y discusión	54

05. Capítulo 560

Conclusiones y perspectivas a futuro	61
--	----

GLOSARIO

- NPs: Nanopartículas
- NPMs: Nanopartículas metálicas
- NMs: Nanomateriales
- dpf: Días post-fecundación
- hpi: Horas post-incubación
- AgNPs: Nanopartículas de plata
- LBN: Laboratorio de Bio-Nanotecnología
- DLS: Dispersión de luz dinámica
- PPG: Propilenglicol
- SPC: Lecitina de Soja
- Spa: Sin principios activos
- Cpa: Con principios activos
- o/w: Aceite en agua
- MH: Mueller Hinton
- pa: Principios activos

Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es el desarrollo de nanocompuestos de gelatina con componentes bactericidas y cicatrizantes, y su evaluación *in vitro* e *in vivo*. En base a lo mencionado, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de emulsiones aceite en agua (o/w) con nanopartículas de plata (AgNPs) y activos cicatrizantes (lidocaína, vitamina A y sulfadiazina).
- Desarrollo y obtención de nanocompuestos de gelatina con emulsiones o/w.
- Evaluación de la biocompatibilidad de los nanocompuestos en células eucariotas de la piel.
- Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los compósitos nanotecnológicos.
- Determinación del efecto toxicológico general y órgano-específico en larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*).

Resumen

En la actualidad, resulta ser de gran interés el uso de biopolímeros para la elaboración de apósitos para el tratamiento de lesiones cutáneas. La utilización de materiales biopoliméricos combinados con nanomateriales (NMs), permite la obtención de compósitos que cuentan con las ventajas de ambos materiales para su aplicación biomédica. Dentro de los NMs, las AgNPs resultan ser un agente antimicrobiano de amplio espectro, dando como resultado un control eficaz de las infecciones producidas por patógenos que pueden encontrarse en la piel. Ante lo expuesto, en el presente trabajo se desarrolló un apósito que logra optimizar la acción del tratamiento cutáneo, evitando una complicación en el cuadro clínico del individuo. Asimismo, se estudió, la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de estos compósitos nanotecnológicos. Para esto, se realizaron estudios de toxicidad *in vitro* a partir de cultivos celulares eucariotas, llevando a cabo ensayos de viabilidad celular en células de la piel, como los queratinocitos (línea celular HaCaT) y fibroblastos murinos (línea celular 3T3). Una vez determinada la biocompatibilidad del nanocompósito se estudió la capacidad antimicrobiana por medio de ensayos microbiológicos de inhibición del crecimiento bacteriano. Por último, se realizó un análisis *in vivo* de toxicidad general y órgano-específica en larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*).

CAPÍTULO 1

ESTADO DEL ARTE

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

1.1. ¿Qué es la nanotecnología?

La nanotecnología es una disciplina que lleva a cabo el desarrollo de materiales, estructuras y sistemas funcionales de escala nanométrica. Esto quiere decir que la nanotecnología implica aquella tecnología generada a partir de materiales que poseen un tamaño que oscila entre una décima y una centena de nanómetro [1] (**Fig. 1.1**). Estos materiales, también conocidos como NMs, poseen propiedades diferentes a aquellos que presentan tamaños macroscópicos, entre ellas podemos destacar propiedades: ópticas, magnéticas, electrónicas y de conducción eléctrica [2]. Dichas características les proporcionan propiedades únicas y bien definidas, permitiendo que los mismos puedan ser utilizados en áreas como la electrónica, medicina, los alimentos, entre otros [3].

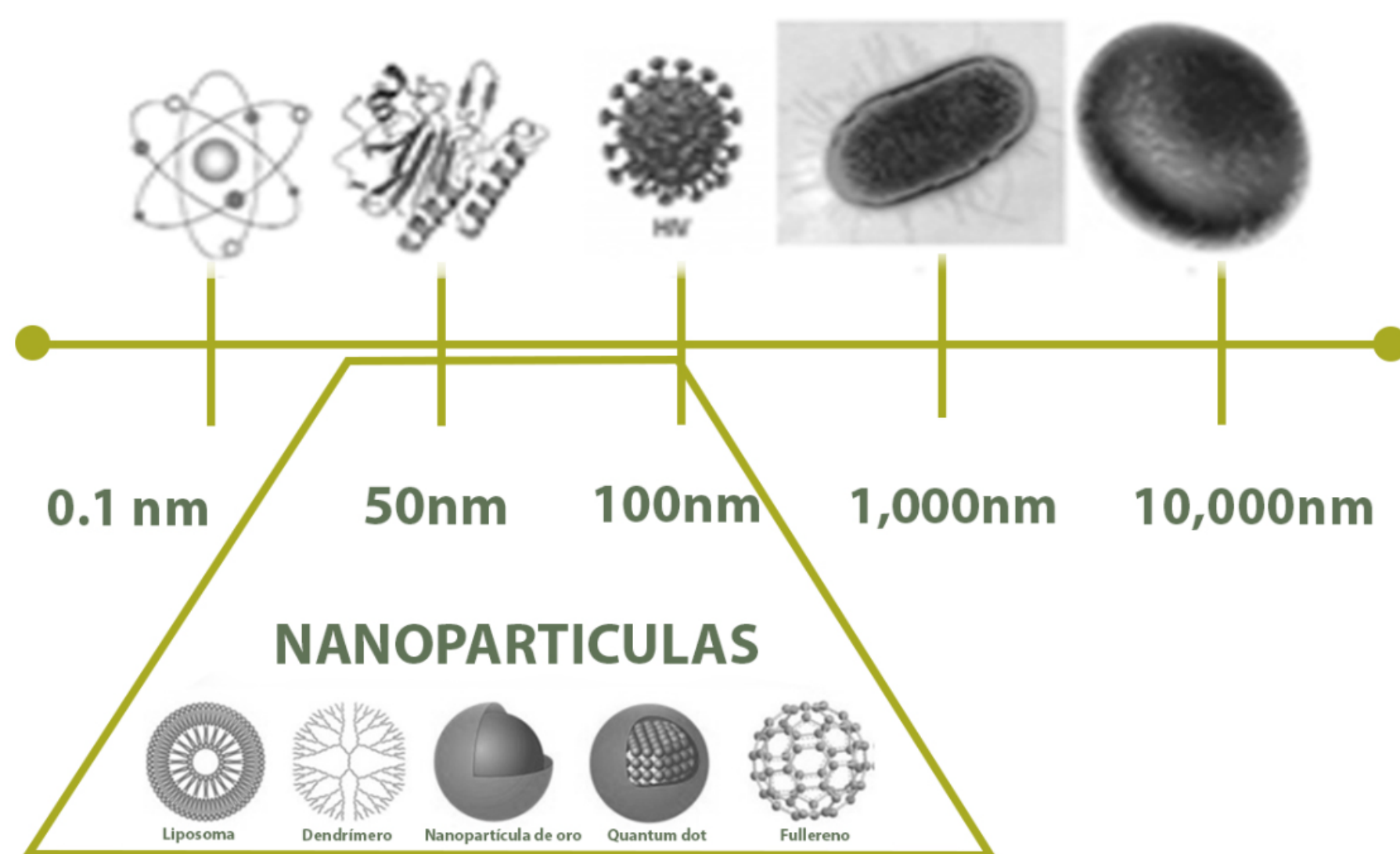


Figura 1.1. Esquema de los materiales que comprenden el rango de tamaño en la escala nanométrica [4].

Estas particularidades que hacen que cada NM sea único deriva de las características fisicoquímicas que presentan, como su tamaño, estructura, dimensiones su naturaleza química [5]. A partir de lo mencionado, los NMs pueden ser clasificados según, la cantidad de dimensiones que presentan por fuera de la nanoescala, existiendo tres categorías distintas: dimensión 0 (0D), unidimensional (1D), bidimensional (2D) (**Figura 1.2**)[6].

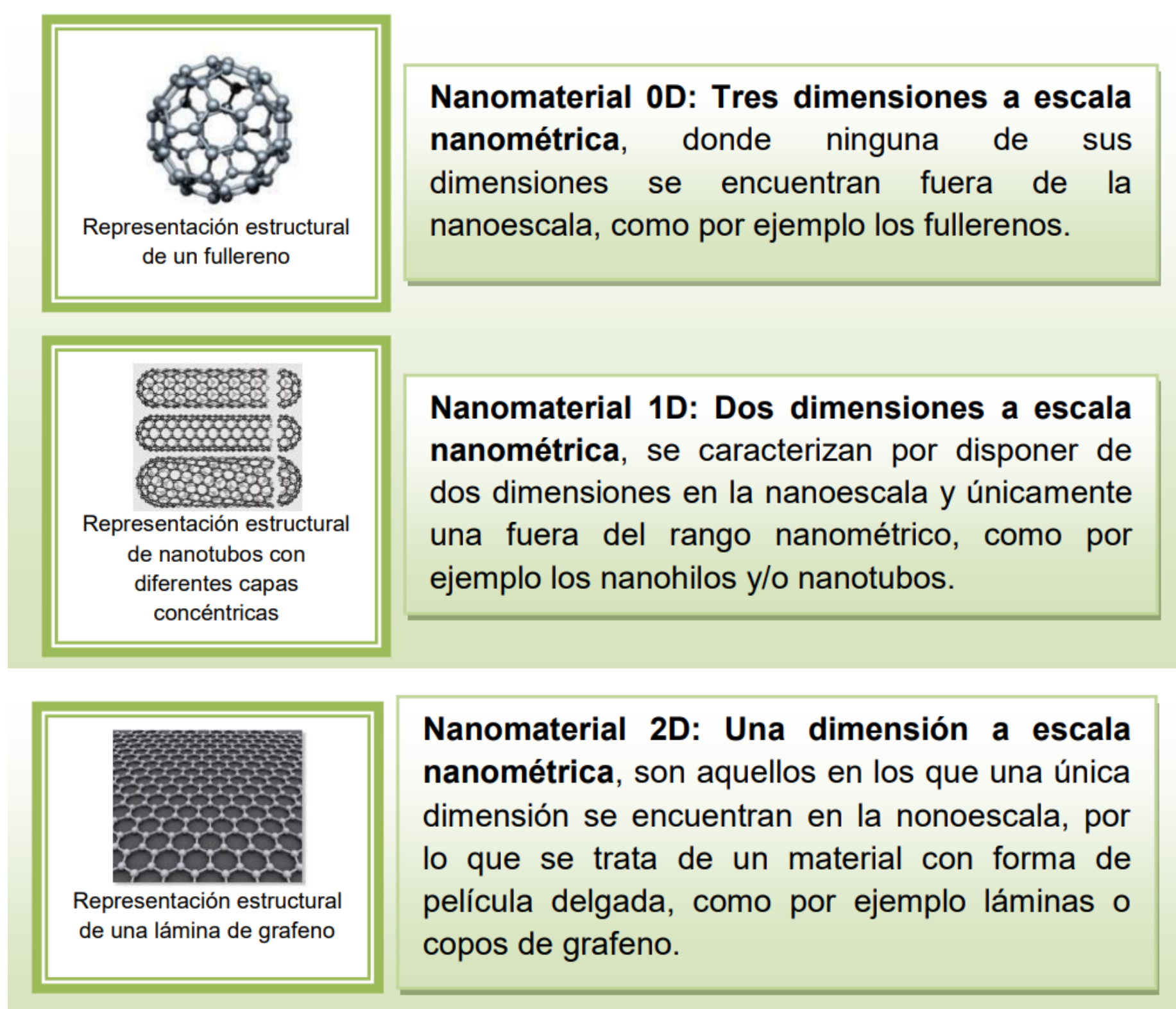


Figura 1.2. Clasificación de nanomateriales según su tipo de dimensión [6].

Por otro lado, los NMs también pueden ser clasificados en función de su naturaleza química; se los puede categorizar en materiales de naturaleza orgánica o inorgánica [7]. Por ejemplo, en base a dicha naturaleza, los materiales podrán poseer en mayor o menor medida cambios en la solubilidad, resistencia al calor, estabilidad o degradación, entre otros. Asimismo, las propiedades de los NMs pueden variar según el tamaño, siempre y cuando se encuentren dentro de la escala nanométrica. Esto se debe a que una variación en el tamaño del material lleva a un cambio en el valor del área superficial del mismo [8].

Una disminución en el tamaño hace que el área superficial al entorno aumente, lo que permite que los mismos posean mayor reactividad [8]. En la **Figura 1.3** se puede observar claramente como ocurre este aumento en la relación del área superficie-volumen al dividir el material en partes más pequeñas, mostrando que en este último caso, el área expuesta al entorno aumenta [8]; a diferencia del primer caso, en donde los átomos se encuentran interactuando con una mayor proporción, dando como resultado una disminución en el área superficial expuesta [8].

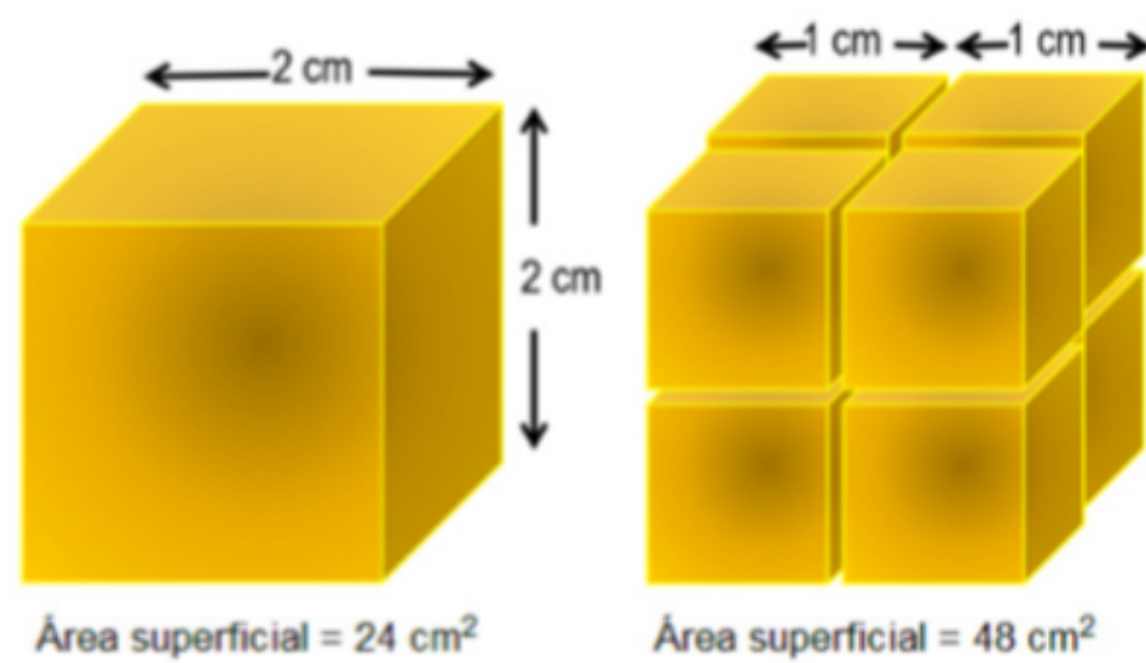


Figura 1.3. Variación en la relación del área superficie-volumen de un material como consecuencia de la disminución de tamaño [8].

Otra de las tantas características se basa en las diversas estructuras que pueden adquirir, dando como resultado que cada nanoestructura se comporte de manera diferenciada (**Figura 1.4**) [8].

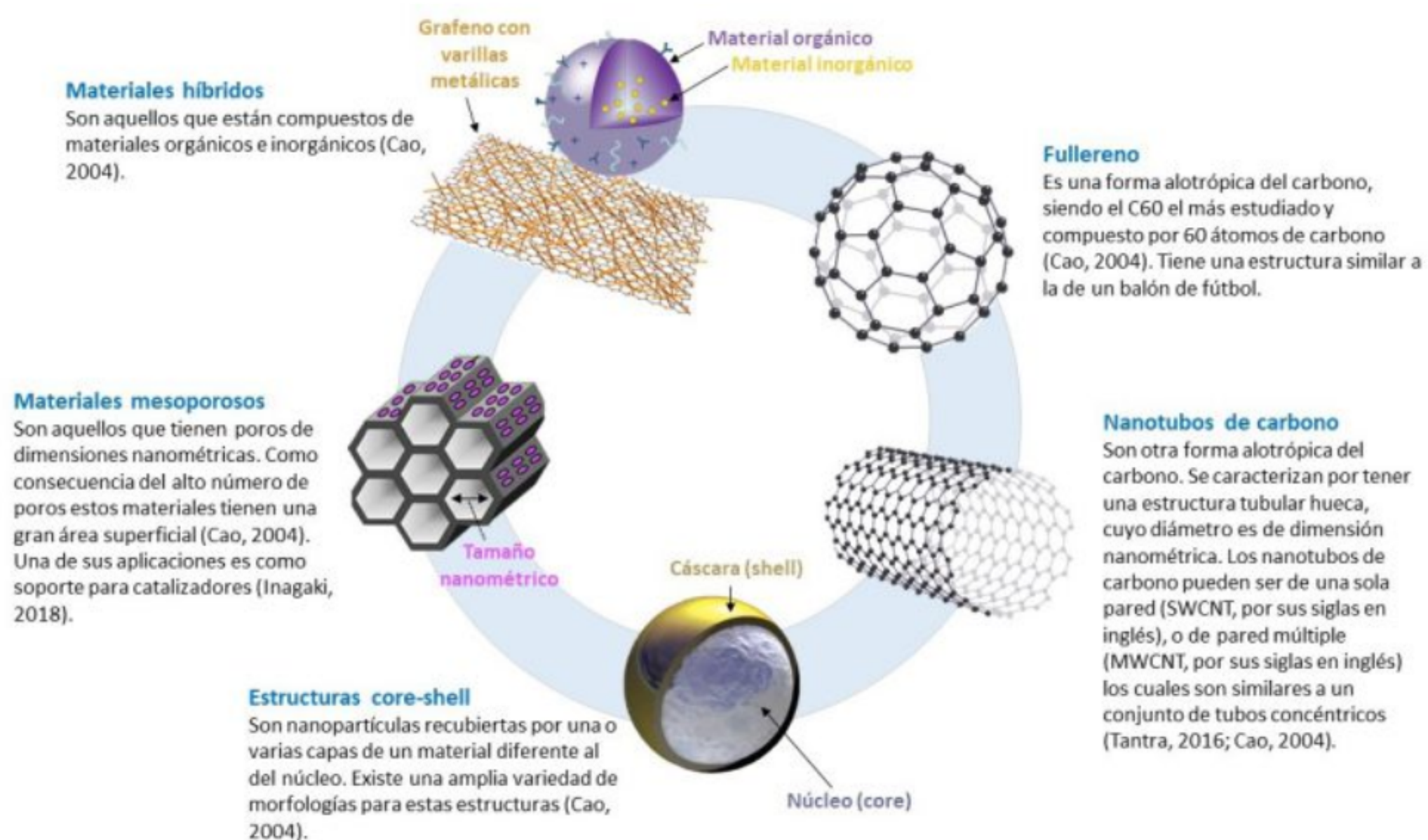


Figura 1.4. Nanomateriales y sus características nanoestructurales [8].

Por los aspectos descritos con anterioridad, es que los NMs cuentan con una gran variedad de usos en diversas áreas, haciendo de la nanotecnología un campo multidisciplinario.

En la actualidad la nanotecnología se ha vuelto una disciplina que deriva en grandes aplicaciones. La nanomedicina es uno de los tantos ejemplos, en donde la misma se ha orientado al desarrollo de NMs como son las nanopartículas (NPs), los sistemas *carrier* nanoestructurados, nanoestructuras, entre otros. Llevando a cabo, la elaboración de nuevos tratamientos para distintas afecciones.

Las nanopartículas metálicas (NPMs) son una de las tantas nanoestructuras que se destacan por su uso medicinal. Se trata de uno de los temas de gran interés, dada su versatilidad de aplicación en la industria médica, farmacéutica, cosmética, alimentaria, entre otras; gracias a que presentan propiedades fisicoquímicas únicas [5].

1.2. Nanopartículas metálicas

Las NPs poseen propiedades que resultan ser beneficiosas para su uso en el área de la nanomedicina. Específicamente las NPMs resultan ser de gran utilidad, debido que poseen una excepcional actividad antibacteriana atribuida a sus altas proporciones de área de superficie expuesta con respecto a volumen y a sus propiedades fisicoquímicas. Por tales motivos, las NPMs serían un buen candidato para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas producidas, por ejemplo, en lesiones cutáneas. Así mismo, las NPMs lograrían actuar sobre bacterias patógenas que han desarrollado resistencia contra varios antibióticos, incrementado así los beneficios de su uso [9].

1.2.1. Nanopartículas de plata

Las AgNPs presentan grandes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas y catalíticas debido a su tamaño, forma y composición; estas características son las que hacen que su aplicación práctica sea relevante en múltiples áreas, puesto que las mismas pueden emplearse en procesos de remediación ambiental, procesos catalíticos, entre otros [6]. Por otro lado, las AgNPs son aplicables a la biomedicina, ya que además de poseer actividad antibacteriana, es un potencial agente fungicida, cicatrizante; sin mencionar que su obtención es por métodos sencillos y variados de síntesis [10, 11].

Estas pueden actuar produciendo la muerte de un amplio espectro de bacterias patógenas, incluyendo aquellas que han generado resistencia a diversos antibióticos. En la **Figura 1.5** se puede observar que uno de los principales mecanismos de acción contra bacterias se basa en la generación de daño en el DNA, debido a la interacción de las AgNPs con grupos tiol de algunas enzimas, lo que evitará la división y consecuentemente la replicación bacteriana.

Por otro lado, las AgNPs pueden modular la señal de transducción y cambiar la estructura de la membrana celular, permeabilizando y permitiendo de esta forma el ingreso de las mismas, provocando la muerte celular [11]. Esta toxicidad que presentan también ocurre en células eucariotas [12]. Por esto, es de gran interés poder establecer un umbral que permita mantener su capacidad bactericida sin producir efectos toxicológicos en células eucariotas o que los mismos se encuentren entre valores aceptables.

Estos mecanismos antibacterianos que caracterizan a las AgNPs, van a depender de la distribución de tamaño de las mismas [13]. Esto se debe a que este mecanismo tiene una relación directa con el tamaño y de la relación superficie volumen [14], lo que puede afectar en mayor o menor medida su interacción con las bicapas lipídicas de la membrana bacteriana [15]. Las NPs que posean un menor tamaño serán las que presentan un efecto toxicológico más efectivo contra un amplio espectro de cepas bacterianas, puesto que logran penetrar en mayor medida en el organismo. Asimismo, que dichas NPs posean una mayor relación de superficie volumen dará como resultado un aumento en el área superficial para interaccionar con dicho organismo [16].

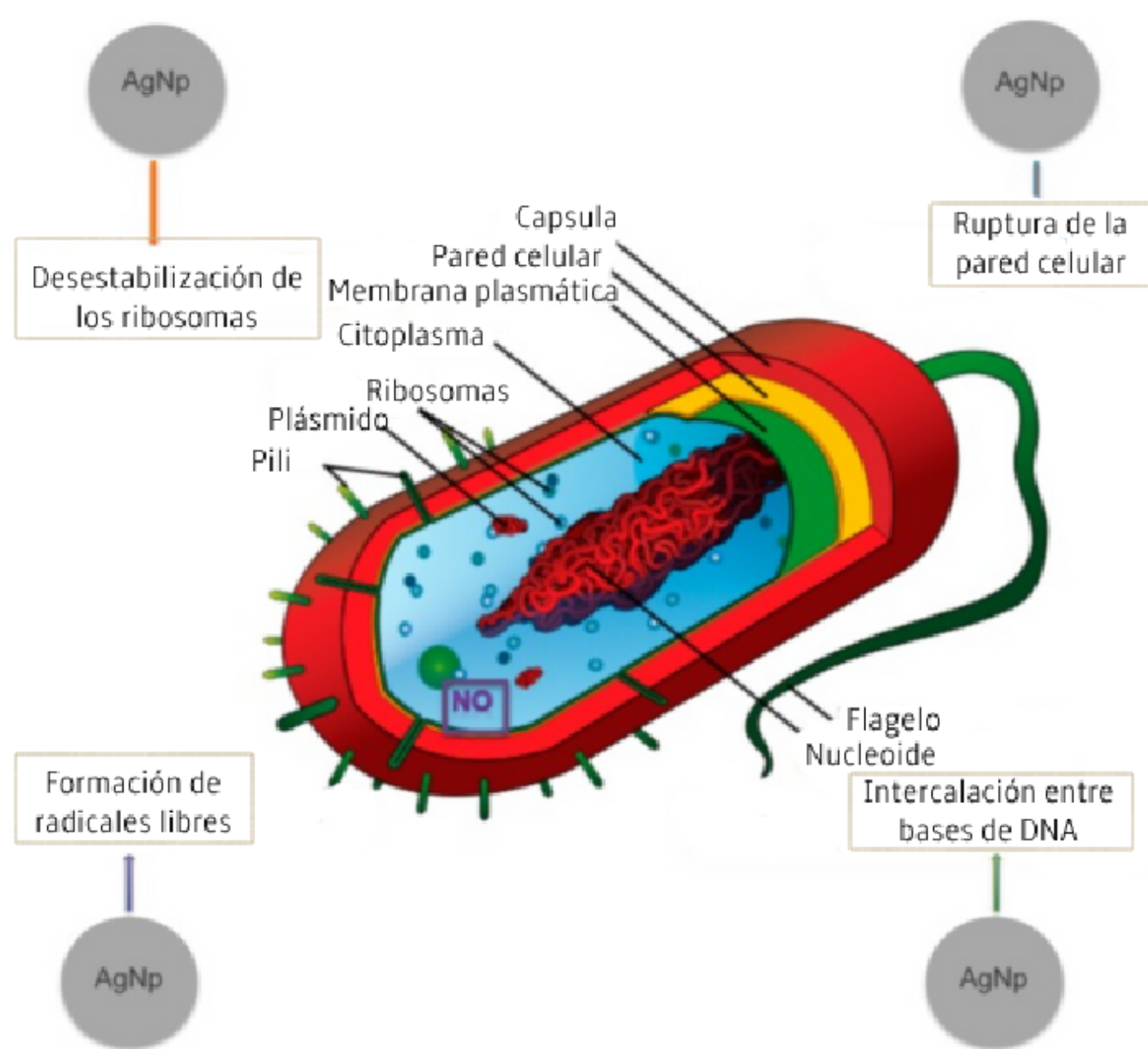


Figura 1.5. Mecanismos de acción bactericida propios de las nanopartículas de plata. Imagen adaptada de referencia [17].

Estudios previos realizados sobre las AgNPs indicarían que las mismas poseen propiedades anti-inflamatorias. Se observó que dichas NPs lograban disminuir la respuesta inflamatoria, reduciendo la liberación de citoquinas, la infiltración de linfocitos y llevando a la inducción de apoptosis sobre células inflamatorias [11].

Es por estas tantas características que las AgNPs resultan ser un gran candidato para el desarrollo de compósitos nanotecnológicos para el tratamiento de lesiones cutáneas. Por otro lado, a pesar de que las mismas contribuirían actuando como agente fungicida, antibacteriano previniendo infecciones y ayudando a controlar la respuesta inflamatoria, las AgNPs presentan una toxicidad *per se* que en consecuencia hace que no se puedan utilizar directamente para el tratamiento y que muchas veces no es tenido en cuenta. Es por este motivo que para lograr una mejora en su aplicación biomédica se emplean sistemas *delivery*, puesto que estos proporcionan una barrera que permite disminuir el efecto citotóxico de las nanopartículas en células eucariotas.

1.3. Sistema delivery

En muchas ocasiones, para que ciertos fármacos logren alcanzar efectividad en el tratamiento se requiere que los mismos se encuentren en elevadas concentraciones. Pero esto, frecuentemente puede resultar en la generación de efectos toxicológicos secundarios que perjudican la salud del paciente. Asimismo, podría ocurrir una disminución de la biodisponibilidad en el sitio *target* dada su diseminación sistémica, que a su vez afecta a distintas partes del organismo. Es por esto, que para mantener el efecto terapéutico se desarrolló un sistema *delivery* que logra optimizar estos factores. Las emulsiones o/w son una buena estrategia de terapia alternativa, siendo este un sistema *carrier* que permite la encapsulación de principios activos (pa) de distinta naturaleza (**Figura 1.6**) [18]; la gran mayoría de estas formulaciones nutraceuticas presentan $\omega 3$ y $\omega 9$, que son ácidos grasos esenciales y beneficiosos para el organismo.

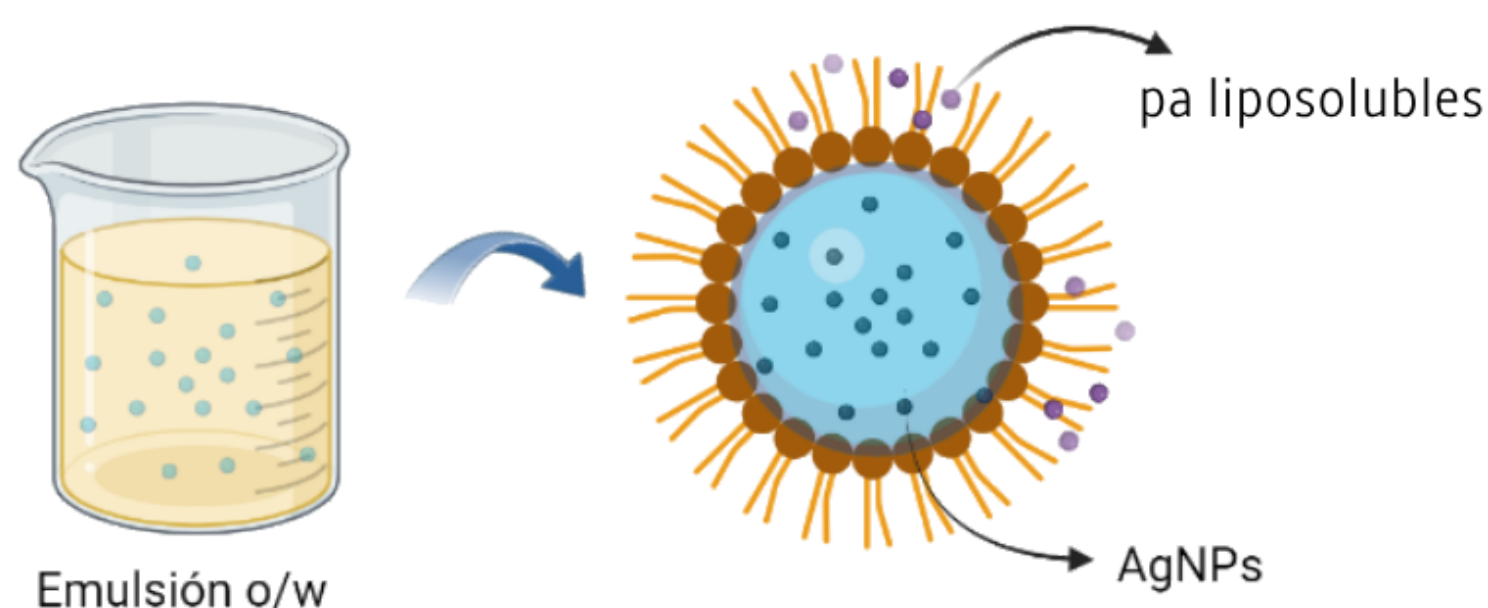


Figura 1.6. Emulsión aceite en agua para la encapsulación de principios activos.

1.3.1. Emulsiones o/w

En el presente trabajo se consideró que las emulsiones o/w son un buen candidato para la encapsulación de las AgNPs. Las emulsiones cuentan con una fase oleosa, la cual se desarrolló en base a tres tipos de aceites: aceite de hígado de bacalao, aceite de canola y vitamina E. Por otro lado, los tensioactivos utilizados como la lecitina de soja (SPC), tween 80 y el propilenglicol (PPG) conforman una parte importante para el armado de emulsiones, ya que los mismos contribuyen a la dispersión del agua en el aceite sin que se produzca una inversión de fases y también contribuyen a la estabilización de las gotas que se forman [19].

En base al tratamiento que se quiere desarrollar se utilizaron como pa a la lidocaína, sulfadiazina, vitamina A y AgNPs. La lidocaína además de actuar como anestésico, es capaz de promover la cicatrización de heridas [20]. En cuanto a la sulfadiazina, posee acción bactericida y bacteriostática frente a bacterias Gram (+) y Gram (-). La vitamina A es un antioxidante que promueve la regeneración cutánea, ya que se trata de un regulador de la proliferación celular, reparando así tejidos dañados de la piel [21]. En lo que respecta a las AgNPs, pueden actuar como agente bactericida, fungicida, anti-inflamatorio, promoviendo la cicatrización de la piel. Entonces, la utilización de este conjunto de pa lograría optimizar la acción del tratamiento cutáneo evitando lesiones crónicas.

1.3.2. Nanocompósitos de biopolímeros

Además de las ventajas obtenidas con este sistema, es de gran interés la obtención de una matriz semipermeable que permita el intercambio de gases y que contribuya a regular la humedad mediante la absorción de los exudados de la herida, logrando que los mismos sean biocompatibles e inocuos [22]. Los films poliméricos cumplen con las características mencionadas, puesto que se trata de una red tridimensional conformada de cadenas flexibles de polímeros, los cuales tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua [23]. Los polímeros son blandos, elásticos e hidrofílicos, siendo esta última característica la que le otorga la capacidad de hincharse en presencia de agua [23]; esta afinidad por el agua permite la absorción de los exudados producidos en lesiones cutáneas, logrando mantener una herida limpia. Los films, también denominados películas pueden clasificarse dependiendo su origen y naturaleza en tres grandes grupos: naturales, sintéticos y semisintéticos [24].

Los primeros existen de forma natural en el medio ambiente, mientras que los sintéticos se encuentran sintetizados artificialmente adquiriendo propiedades similares a los films naturales [24]; por último, los de tipo semisintéticos o también denominados biohíbridos, son preparados mediante una síntesis química parcial cuando la molécula precursora posee una estructura compleja [24]. Las películas también pueden ser clasificadas en base a su estructura química por lo cual adquieren diversas propiedades, dentro de este grupo podemos encontrar cuatro categorías [24]: películas de redes semi-interpenetradas, copolímeros, de doble red e híbridos. Los films copolímeros se encuentran formados por dos o más monómeros, además del agente entrecruzante, a fin de mejorar una propiedad específica del material resultante [25]. A diferencia de los copolímeros, los films de redes semi-interpenetradas se sintetizan por medio de la polimerización y reticulación de un monómero en presencia de un polímero ya formado, logrando así que este último quede ocluido en la red del film, adquiriendo las cualidades del polímero y promoviendo la mejora de las propiedades mecánicas del mismo (**Figura 1.7**) [25].

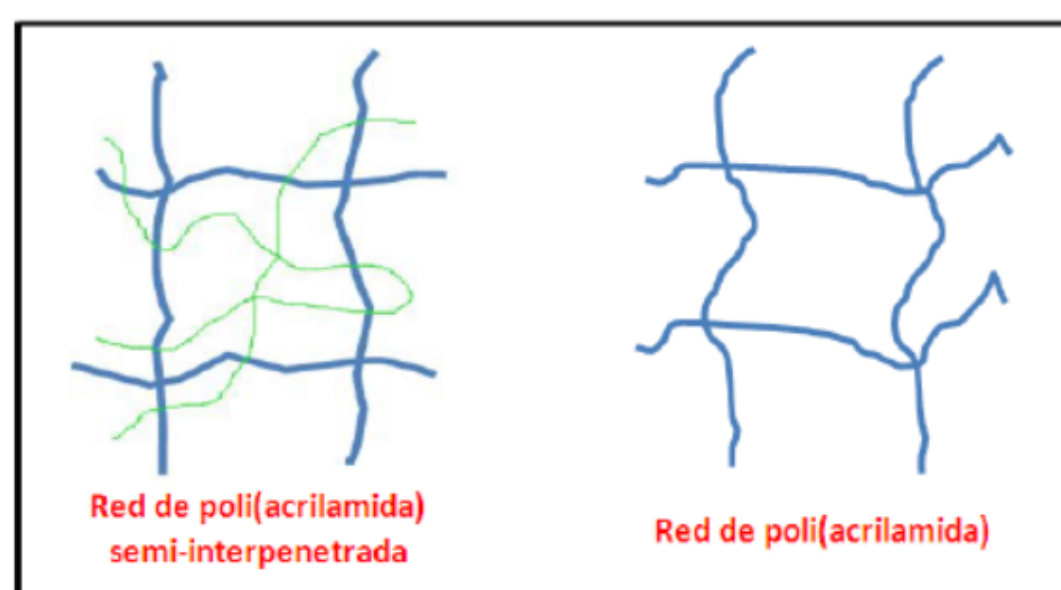


Figura 1.7. Film de red semi-interpenetrada con polímero ocluido (izquierda), red tridimensional de film convencional (derecha) [25].

En cuanto a las películas de doble red, estos se componen de dos redes interpenetradas que logran optimizar aún mejor sus propiedades mecánicas en comparación con películas convencionales (**Figura 1.8**); asimismo este tipo de films son húmedos y presentan resistencia al deterioro [25].

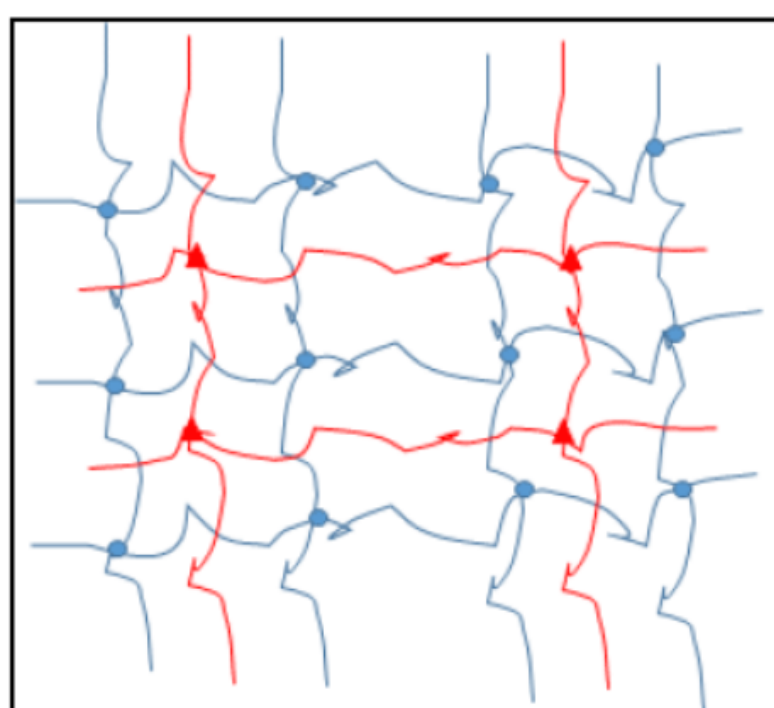


Figura 1.8. Films de doble red: Primera red (azul) posee mayor entrecruzamiento, mientras que la segunda red (roja) se encuentra entrecruzada en menor medida [25].

Por último, los films híbridos además de contener una fase orgánica que se encuentra constituida por las cadenas poliméricas entrecruzadas, cuentan con una fase inorgánica con la que puede interaccionar de forma física o química [25]; la incorporación de esta nueva fase resulta en un incremento de la capacidad de hinchamiento del material [25].

Las proteínas son biopolímeros capaces de formar películas y sus propiedades pueden variar con muchos factores; la gelatina ha sido utilizada ampliamente como material formador de películas [26]. Este biomaterial puede contener distintas moléculas del colágeno, puesto que durante el proceso de fabricación de este biopolímero, el colágeno es desnaturalizado, perdiendo su estructura original [27]. Las fibras de colágeno que forman hélices al calentarlas pierden su estructura, y luego recuperan parcialmente la misma durante el proceso de enfriamiento [27]. La velocidad de secado del biopolímero será en gran medida el determinante de los estados estructurales que puede tomar; estos pueden variar en tres estados diferentes: una estructura en espiral con cadenas conocido como estado amorfo, el estado semicristalizado que se encuentra compuesto de triples hélices y una estructura en espiral, y por último el estado cristalizado que corresponde al estado de empaquetamiento de triples hélices y una estructura en espiral (**Figura 1.9**); estos estados dependerán de la velocidad de secado de las películas de gelatina [27].

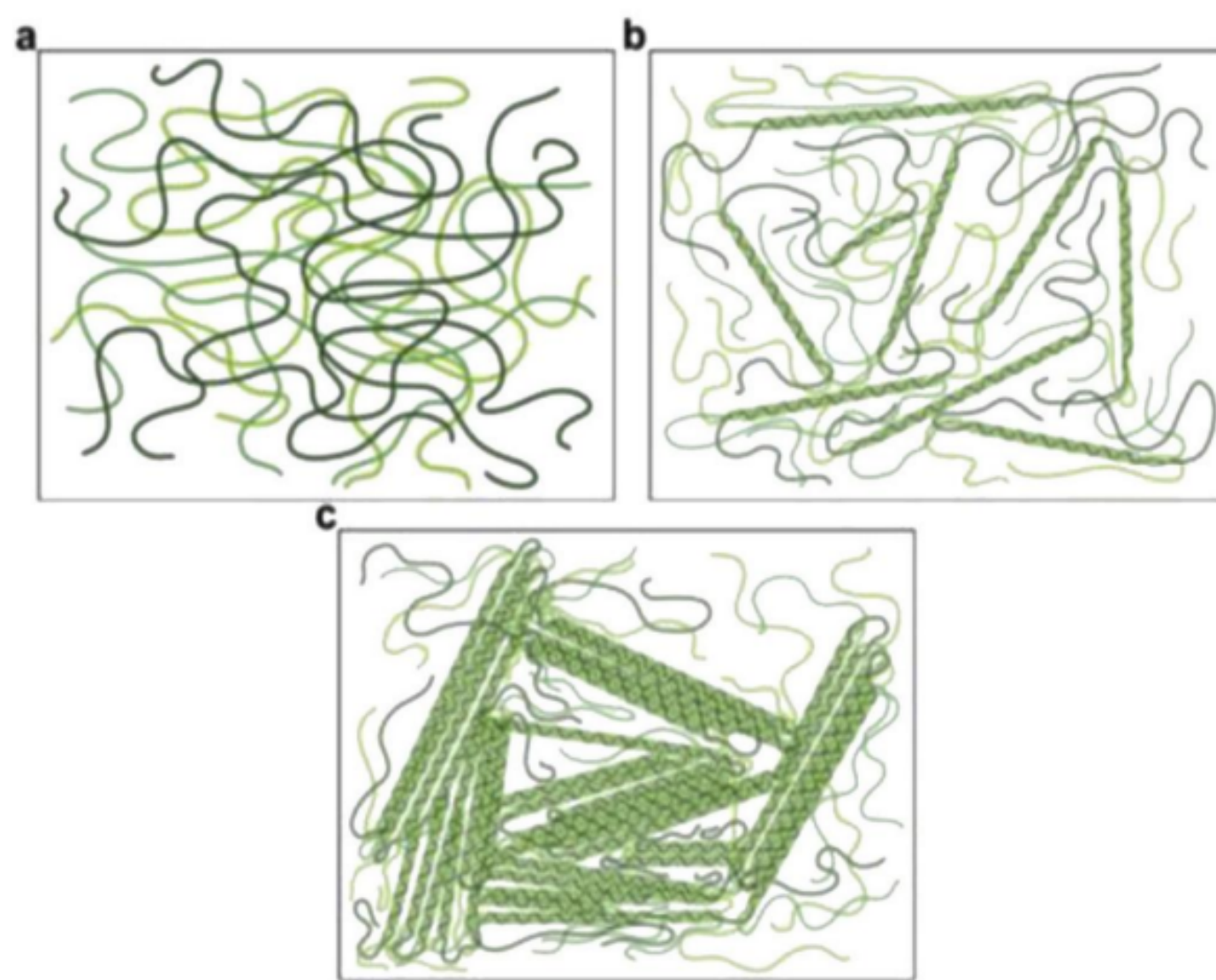


Figura 1.9. Estados estructurales de la gelatina. (a) Estado amorfo. (b) Estado semicristalizado. (c) Estado cristalizado [27].

Estas estructuras que la gelatina puede tomar se estabilizan mediante puentes de hidrógeno, los cuales se forman por medio de los residuos de glicina presentes en las triples hélices [27]. Los átomos de hidrógeno de este aminoácido da lugar a la captación de moléculas de agua, con las que podrán formar enlaces de hidrógeno (**Figura 1.10**); esto favorece la absorción de grandes cantidades de agua en la gelatina [27].

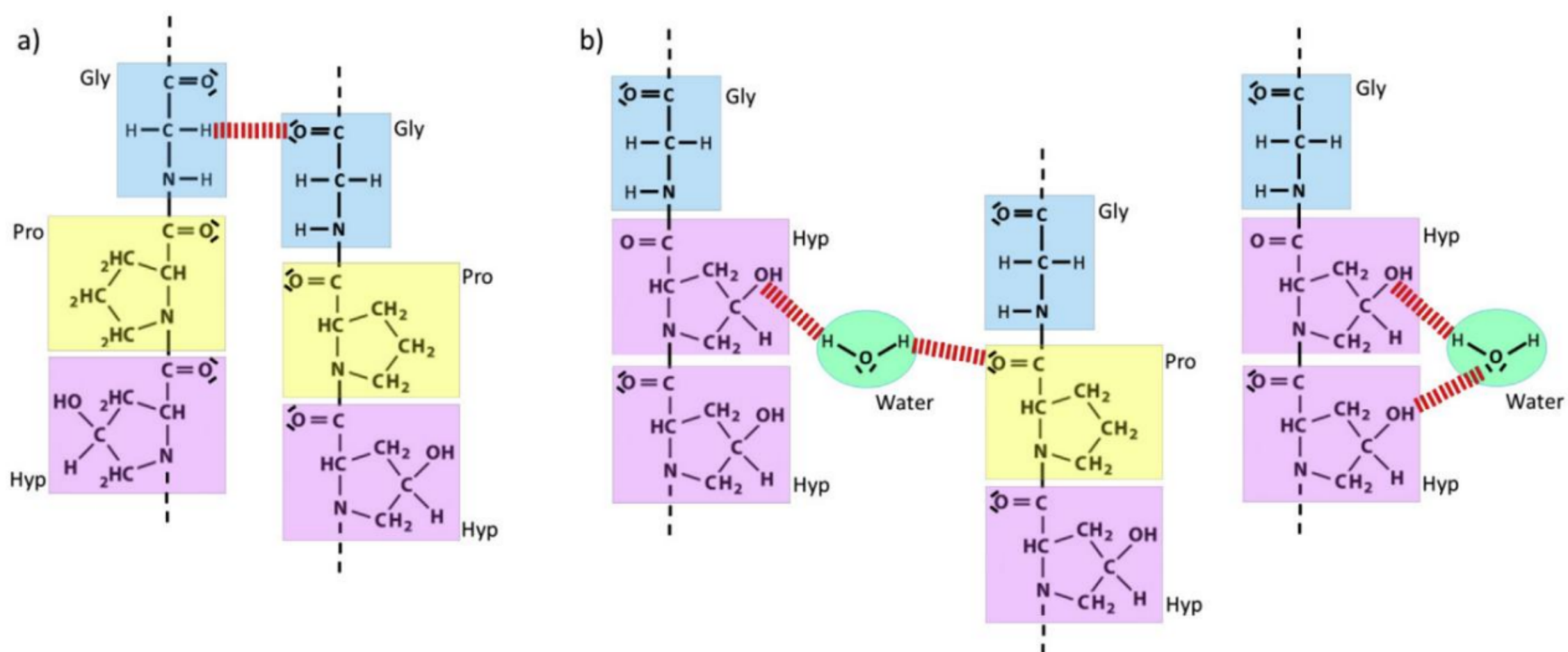


Figura 1.10. Enlaces de hidrógeno en estructura de gelatina (a) Puentes de hidrógeno estabilizando la hélice de gelatina. (b) Puentes de hidrógeno entre hélices de gelatina y moléculas de agua [27].

Por otro lado, este biomaterial cuenta con propiedades tensioactivas, es decir, que disminuye la tensión superficial entre dos sustancias; por lo que promueve la estabilización de emulsiones [27].

Estas características hacen que este biopolímero sea ideal para su aplicación como compósito, para promover así la cicatrización de heridas cutáneas. Este biomaterial logra mejorar en gran medida la adherencia, proliferación y propagación de fibroblastos y queratinocitos [28], lo que permite la migración y colonización celular en la zona afectada, promoviendo la cicatrización de la piel [23]. Al contar la gelatina con componentes que se encuentran mayoritariamente en el tejido de la piel, resultan ser biocompatibles e inocuos para su uso en la curación de lesiones cutáneas. Al mismo tiempo, además de proporcionar un andamio para los pa de la terapia [23] provee el apoyo necesario para su aplicación sobre superficies lesionadas. También es importante destacar que la porosidad que presenta este biopolímero permite el intercambio gaseoso, lo que da lugar a la correcta cicatrización; además por su capacidad de absorber altas cantidades de agua ayuda a eliminar los exudados de la herida, evitando así la generación de focos de infección bacteriana. Finalmente, al actuar como tensioactivo permite la incorporación de la emulsión o/w, ayudando así a la integración de este sistema que optimizará las ventajas del compósito nanotecnológico, puesto que actuará disminuyendo en gran medida la toxicidad de las AgNPs encapsuladas en la emulsión.

1.4. Actividad antimicrobiana

Si bien una de las tantas ventajas de los compósitos nanotecnológicos es su capacidad de actuar como barrera reduciendo la toxicidad de las NPMs sobre células eucariotas, es importante el análisis de su potencial antimicrobiano dentro del sistema *delivery*. En apartados anteriores se expuso cómo las heridas en la piel pueden dar lugar a la aparición de infecciones bacterianas que promueven la complicación del cuadro clínico del individuo. Esto se relaciona a que en la superficie cutánea cohabitan bacterias, hongos y parásitos, los cuales componen un complejo ecosistema que se encuentra en continua interacción con el huésped [29]; las bacterias residentes, con frecuencia se consideran un beneficio para el mismo, sin embargo algunas de ellas tienen un gran potencial patogénico, como por ejemplo bacterias como *Escherichia coli* [29]. Cuando el equilibrio de dicho ecosistema es alterado, como consecuencia se generan repercusiones negativas que predisponen y causan la aparición de enfermedades [29]. Por esto es esencial evitar el desarrollo de focos de infección ocasionados por la generación de heridas en el tejido de la piel; para realizar un análisis de la actividad antimicrobiana el procedimiento estándar se basa en métodos que miden la inhibición del crecimiento bacteriano. Específicamente, en un cultivo bacteriano se busca la aparición de halos de inhibición por el uso de los llamados discos de sensibilidad, los cuales son reemplazados por discos de los compósitos nanotecnológicos. Estudios previos han revelado que las AgNPs dentro de un sistema *delivery* como lo son los hidrogeles de colágeno, la actividad antimicrobiana sigue actuando sobre los microorganismos, lo cual da un panorama favorecedor [30]. En base a esto, realizar un análisis de la capacidad bactericida de las AgNPs dentro del sistema *carrier* que conforma al nanocompósito, evidenciará si se sigue manteniendo dicha propiedad.

1.5. Nanotoxicología

La nanotecnología en la actualidad se ha vuelto una disciplina que ha tomado gran relevancia, puesto que del desarrollo de nanomateriales derivan diversas aplicaciones en áreas como la nanoquímica, nanobiotecnología, nanomedicina, entre otras [1].

Sin embargo, el uso de materiales nanométricos podría suponer un riesgo debido a factores como su composición química, solubilidad en fluidos biológicos, forma y tamaño que puedan llevar a un aumento de la reactividad produciendo así una mayor toxicidad [31]. Es por esto que a partir de esta cuestión surge el estudio de la toxicidad de los NMs, lo cual se denomina como nanotoxicología. Esta disciplina permite llevar a cabo un amplio análisis sobre los efectos que podrían desarrollar los NMs o productos que los contengan en los organismos, convirtiéndolo así en una herramienta de prevención de riesgos [32]. Esto refuerza la importancia de llevar a cabo un exhaustivo estudio de la toxicidad de nanoestructuras desarrolladas para finalidades varias, especialmente aquellas destinadas a aplicaciones médicas. Realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* es indispensable para este análisis, debido a que permite obtener una caracterización detallada de la biocompatibilidad del tratamiento a desarrollar en base a nanotecnología.

1.5.1. Nanotoxicidad en cultivos celulares

Una de las herramientas más utilizadas para la evaluación de la toxicidad de las NPs son los ensayos *in vitro* en líneas celulares, ya que además de que posibilita realizar numerosas réplicas, los resultados obtenidos son reproducibles y permite estudiar los mecanismos de toxicidad por separado [33]. Particularmente para este plan de trabajo, es ideal el uso de líneas celulares, ya que se trata de estudiar la biocompatibilidad de compósitos nanotecnológicos para el tratamiento de lesiones cutáneas, por lo tanto, para la obtención de un análisis adecuado será fundamental el empleo de líneas celulares que componen las capas de la piel (**Figura 1.11**).

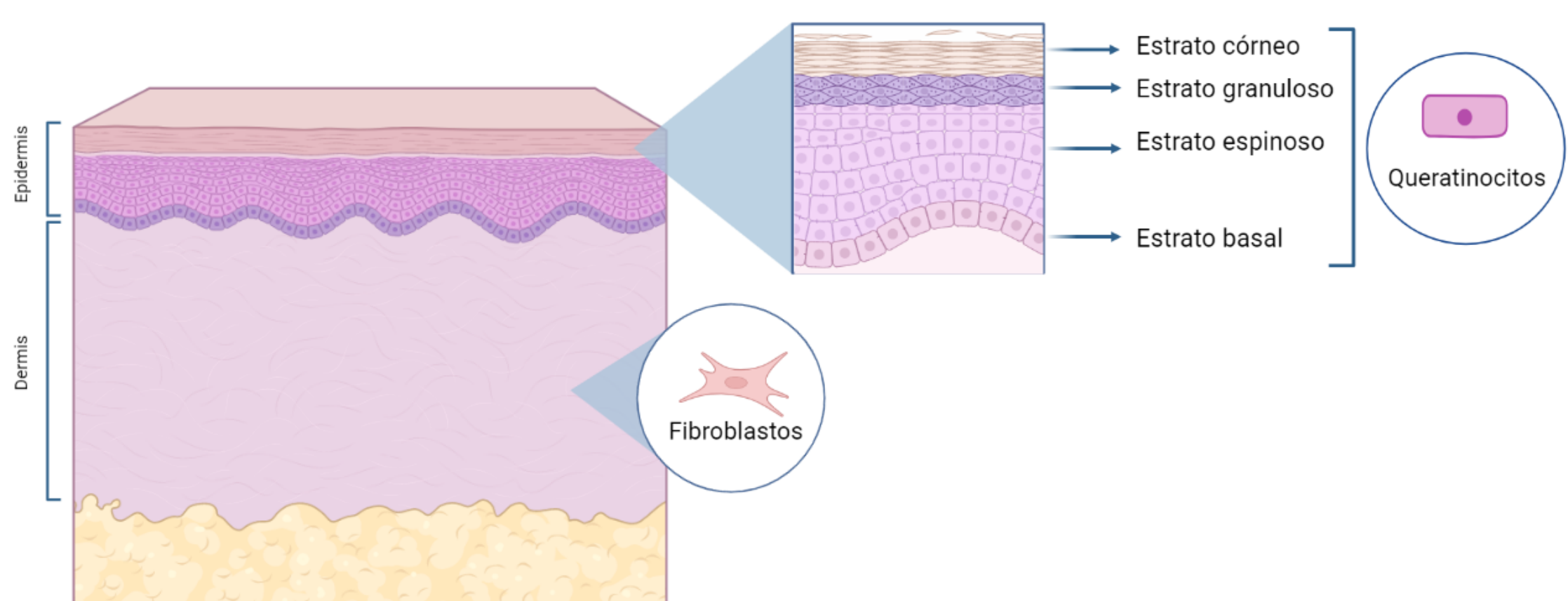


Figura 1.11. Esquema de las capas que componen a la piel junto con los principales tipos celulares que la conforman.

Los queratinocitos son considerados una de las células más importantes de la epidermis; y como se puede observar en la **Figura 1.11** estos se encuentran distribuidos en los diferentes estratos de la misma [34]. Estas células son capaces de generar queratina, además de que llevan a cabo la síntesis y secreción de fibronectina y laminina junto con colágeno de tipo IV en menor medida [35]. La línea celular HaCaT consiste en queratinocitos obtenidos a partir del tejido epitelial de la epidermis de personas adultas [35, 36]. Dicha línea conserva la gran mayoría de las características que poseen los queratinocitos humanos [37], lo cual hace que el uso de esta línea para la realización de ensayos de biocompatibilidad sea una muestra representativa de los efectos que se pueden generar cuando existe toxicidad. Por tales motivos y por su alto potencial para diferenciarse y proliferar en cultivos celulares *in vitro*, es que HaCaT resulta ser un gran candidato para su empleo en investigación sobre el tejido epitelial [36].

Por otra parte, los fibroblastos se encuentran en la capa interna de la piel, específicamente en la dermis, y los mismos son capaces de producir colágeno de tipo IV, fibronectina, laminina y procolágeno de tipo I y III [35]. La línea celular 3T3 es obtenida a partir de fibroblastos murinos, y la misma puede crecer partiendo de inóculos bajos, logrando mantener a lo largo del cultivo sus características morfológicas [38]. Esta línea es muy utilizada en investigación por sus diversas aplicaciones como en la caracterización de virus y en estudios vinculados al tejido conjuntivo [38]. Los resultados obtenidos a partir de fibroblastos dérmicos humanos son comparables con los de fibroblastos murinos, por lo cual, la convierte en la línea celular estándar para su uso en investigación [39]. Las particularidades que presentan estas líneas celulares permitirán dar una evaluación adecuada de los efectos toxicológicos que podrían presentar los compósitos nanotecnológicos, tanto sobre la capa más superficial de la piel (tejido epitelial) como la más profunda (tejido conjuntivo) que son las que quedaran expuestas ante una lesión cutánea.

A partir de la caracterización *in vitro*, se logra evaluar dependiendo del ensayo: migración celular, integridad de la membrana, integridad de las organelas e indirectamente la viabilidad celular. Además, la combinación de más de un método para la determinación de toxicidad pueden ofrecer resultados que permitan concluir de una forma eficaz y rápida la biocompatibilidad del nanomaterial a evaluar [40].

Como se mencionó en los primeros apartados, las nanoestructuras como las nanopartículas pueden presentar posibles efectos citotóxicos en células eucariotas. Debido a esto es de gran importancia evaluar los posibles efectos que podrían generarse frente a la exposición de un xenobiótico, el cual se define como una sustancia que no se encuentra de forma natural en el organismo y que pueden afectar las capacidades funcionales del mismo de forma beneficiosa o no.

En la **Figura 1.12** se pueden observar dichos efectos: tales como pérdida de la integridad de la membrana celular, lisosomal y la generación de daño en varias organelas como el aparato de Golgi, mitocondria, entre otras [40]. Este nivel de citotoxicidad generado por la interacción con el nanomaterial, se puede evidenciar y cuantificar, ya que los ensayos permiten analizar estos efectos de toxicidad por separado obteniendo reproducibilidad [33].

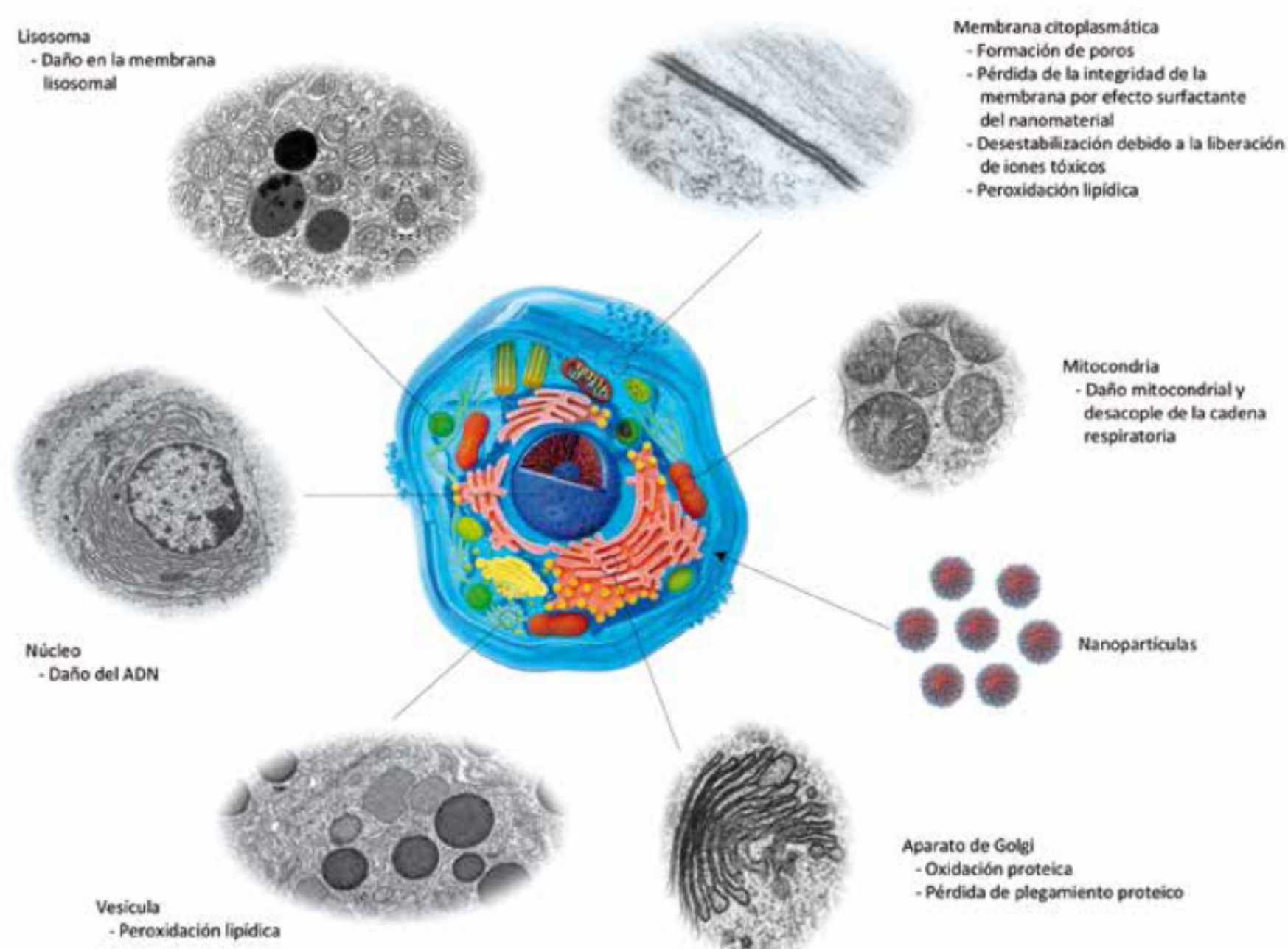


Figura 1.12. Efectos citotóxicos generados por la interacción célula eucariota-nanopartícula [40].

Existen diversos ensayos que proporcionan información de los posibles efectos toxicológicos que pueden surgir. Los más utilizados se basan en métodos colorimétricos, dado que estos proporcionan un análisis eficiente y detallado del impacto que una muestra puede generar en la viabilidad celular del cultivo. El ensayo de citotoxicidad por cristal violeta es el primer método empleado de una serie de ensayos a realizar, debido a que se obtiene una medida de la adhesión celular, permitiendo así cuantificar la viabilidad de las células y de forma indirecta la muerte celular [41]; esta determinación es posible por la acumulación de un colorante llamado cristal violeta, el cual se une al DNA tiñendo de esta forma la monocapa de células adheridas al plástico [42].

En segunda instancia se prosigue con el ensayo colorimétrico cuantitativo, el cual es activación metabólica por el método de reducción de MTT. Por medio de este método se logra identificar aquellas células que se encuentran viables utilizando la actividad metabólica como indicador. Esta determinación está dada por una reacción producida en las mitocondrias de células viables, donde una sal de tetrazolio llamada MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico) es reducida a su forma insoluble, formazan púrpura, por la enzima succinato deshidrogenasa (**Figura 1.13**) [41].

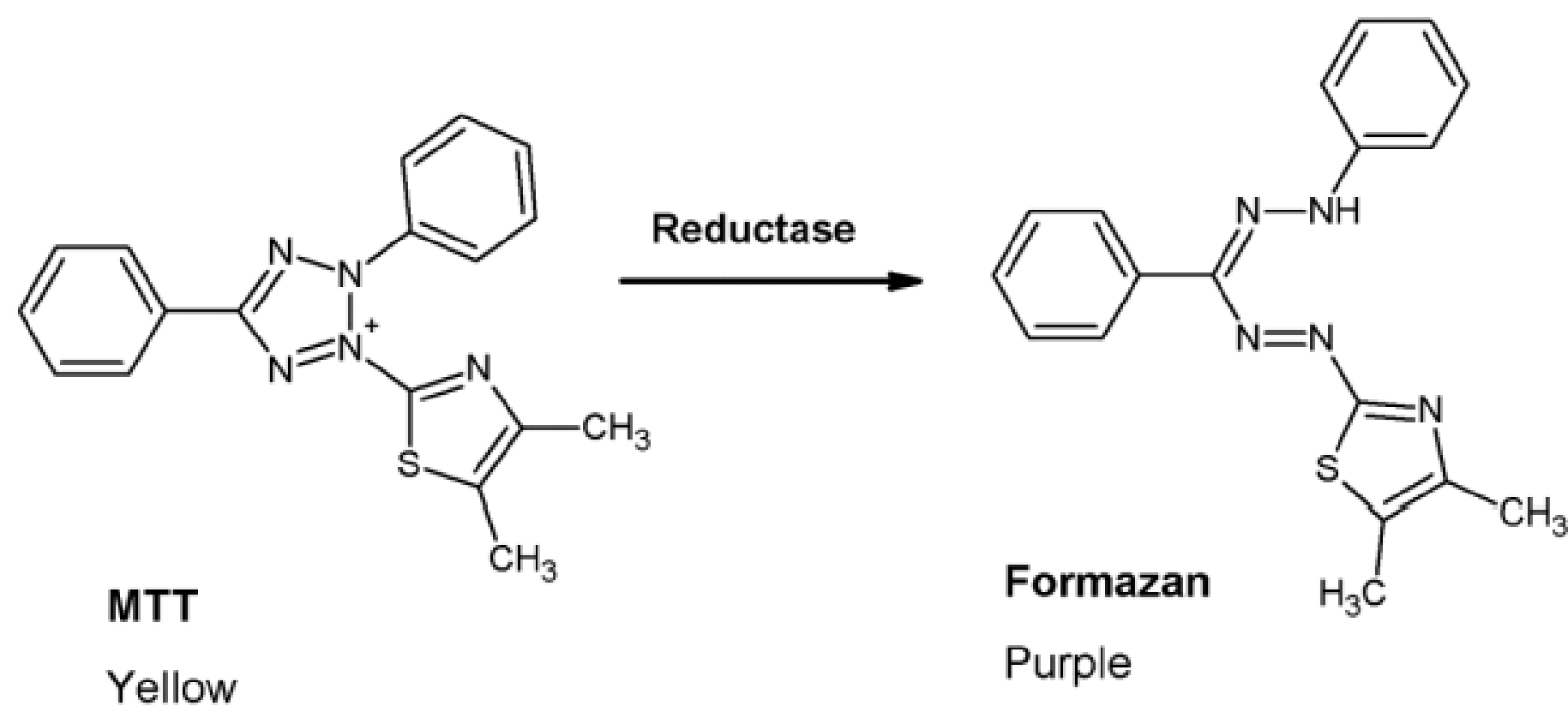


Figura 1.13. Reducción de MTT a formazan por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial [43].

Por último, mediante la realización del ensayo de captura de rojo neutro, se logra cuantificar la cantidad de células viables por medio de la intensidad de color del cultivo. Este método utiliza un colorante catiónico débil llamado rojo neutro, el cual presenta gran afinidad por compartimientos ácidos, por lo cual tiene una elevada preferencia por el compartimiento endosomal; esto hace que el colorante quede recluido en el ambiente ácido de los lisosomas debido a la protonación [44]. Teniendo esto en cuenta, se sabe que aquellas sustancias que dañen la integridad de la membrana, generando pérdida de la viabilidad celular, dará como resultado un decremento en la retención del colorante [45].

1.5.2. Nanotoxicidad utilizando *zebrafish* como modelo animal

El uso de *Zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo animal es muy utilizado en investigación, puesto que se trata de una especie ovípara, por lo que posee fecundación externa permitiendo observar de esta manera, las diferentes etapas del desarrollo embrionario hasta llegar a su fase adulta [46, 47]. Otra de las cualidades de este organismo modelo es que además de poseer una elevada fecundidad, llegando a producir cientos de huevos al día, el desarrollo ocurre de forma rápida (Figura 1.14) en un tiempo de aproximadamente entre 48-72 h post-fecundación [47]. Este rápido desarrollo embrionario en conjunto con la transparencia que presenta el embrión durante los distintos estadios proporciona un sistema ideal para detectar cambios morfológicos en estructuras y sistemas de órganos [48].

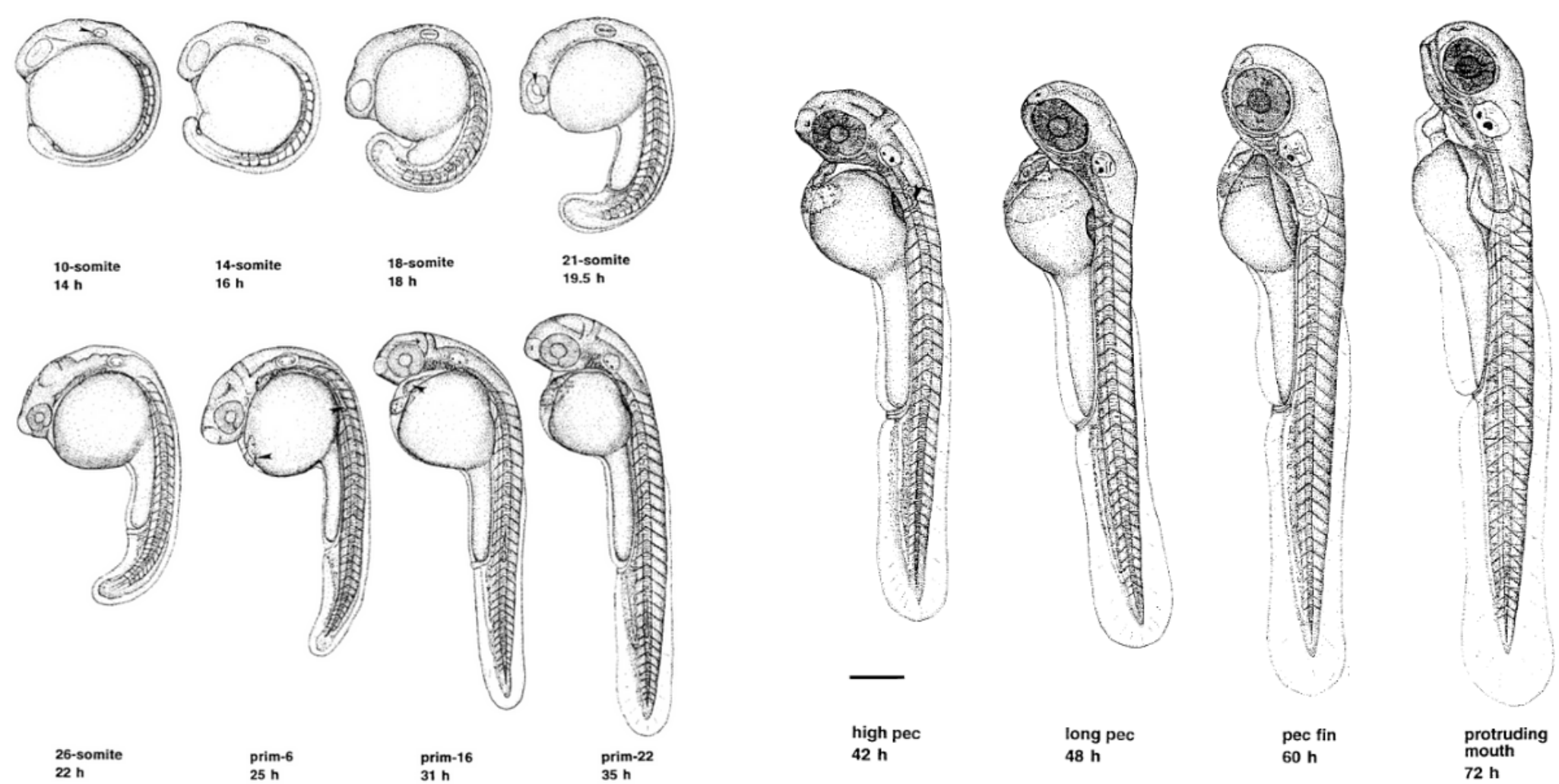


Figura 1.14. Primeras horas de los estadios de desarrollo embrionario en *Zebrafish* [49].

Las larvas de este modelo, es decir aquellos que se encuentran entre las 48 y 72 h post-fecundación, logran desarrollar de forma completa la mayoría de los órganos de un pez adulto (**Figura 1.15**) [47]. Además, el genoma de este organismo muestra que aproximadamente un 70% de los genes humanos tienen al menos un ortólogo de pez cebra [50], y por ende aquello que afecte genéticamente al modelo animal podría afectar a los seres humanos; debido a esto gran parte del desarrollo y la anatomía de los órganos de *zebrafish* presentan similitud en las funciones de su contraparte humana [51]. Esta particularidad permite realizar estudios de toxicología en su estado larval, puesto que se logra evidenciar tanto la toxicidad general como órgano-específica en sus diferentes estadios, observando los cambios producidos en la morfología del pez.

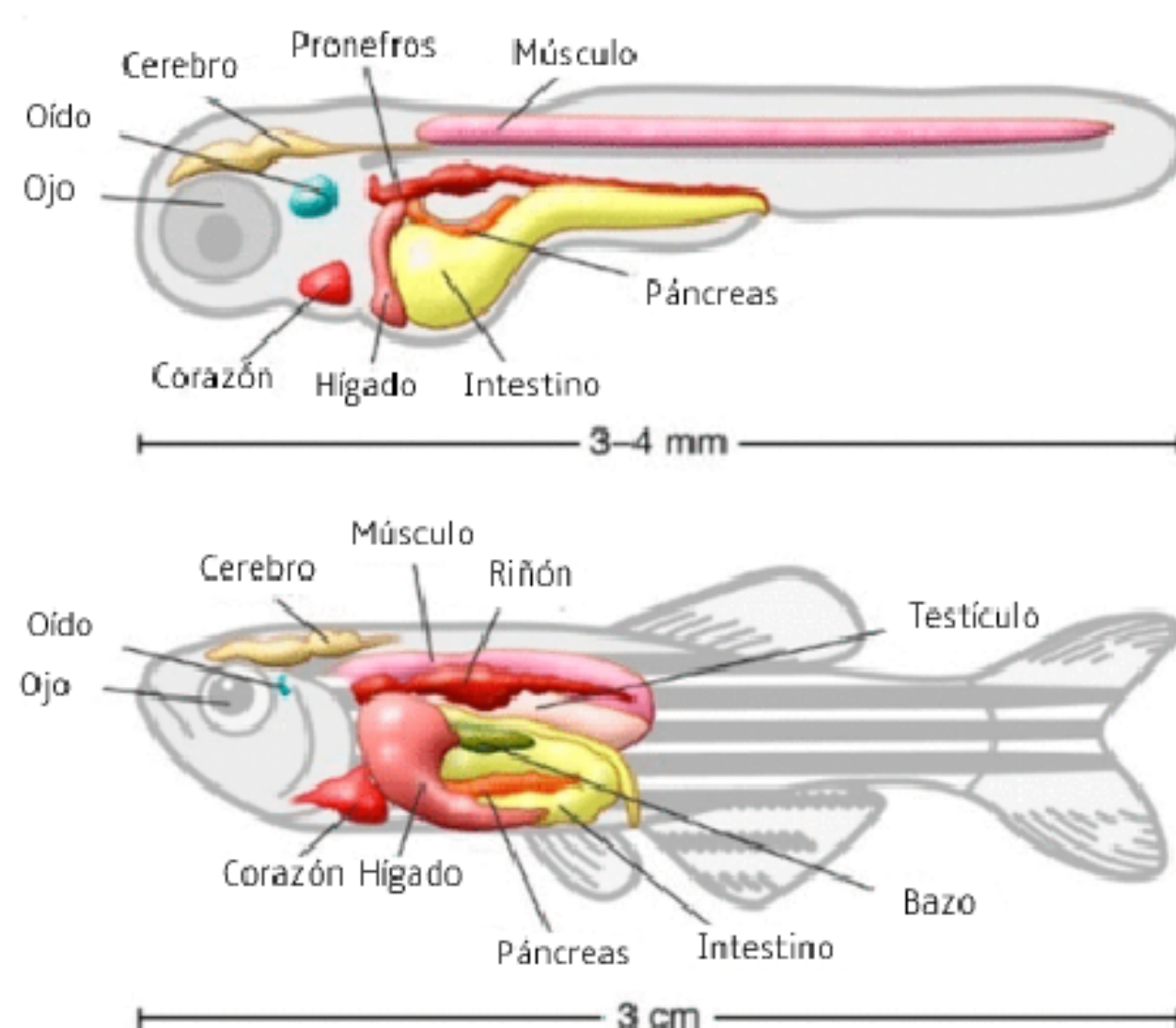


Figura 1.15. Anatomía de *Zebrafish* en su estado larval (esquema superior) y en su fase adulta (esquema inferior).

Imagen adaptada de referencia [51].

Mediante la incubación de un xenobiótico con el organismo modelo, se pueden evaluar respuestas fisiológicas y conductuales [52] que logran evidenciar los posibles efectos toxicológicos. Estas características y dado a la simplicidad y el bajo costo de la infraestructura para el mantenimiento del modelo, hacen que este sea ideal para su uso en investigación biomédica [47].

1.5.3. Estudios de toxicidad general y órgano-específica

La toxicidad en este organismo modelo puede ser evaluada mediante cambios en la morfología del pez, en la respuesta fisiológica y en el incremento en la tasa de mortalidad (toxicidad general), mientras que la toxicidad órgano-específica es analizable a través de las alteraciones generadas en la actividad neurológica, cardíaca y por medio de los cambios morfológicos. La capacidad de locomoción es una acción compleja que se encuentra íntegramente ligada a una respuesta de la función cerebral y el sistema nervioso [51]. Los embriones de *zebrafish* presentan capacidad natatoria justo después de la eclosión, y dicha capacidad se perfecciona a un modo de natación de ritmo y deslizamiento después de los 4 días post-fecundación (dpf) [51]. Teniendo en cuenta esto, se puede decir que un cambio en el movimiento espontáneo en larvas de *zebrafish*, podría predecir el desarrollo de una neurotoxicidad asociada al compuesto en estudio.

Por otro lado, es importante destacar que la fisiología cardiovascular entre humanos y el modelo de *zebrafish* se conserva a nivel anatómico, de biología de membrana y celular [51]. Asimismo, este organismo modelo es ideal para el estudio del desarrollo de cardiotoxicidad, ya que los efectos tóxicos que son producidos en el corazón no provocan una letalidad inmediata sino que pueden sobrevivir los primeros 7 días de su desarrollo sin función cardiovascular [53]. Esto posibilita el estudio del desarrollo de anomalías cardíacas de forma progresiva, evaluando la variación del ritmo cardíaco, ya sea produciendo una disminución en los latidos o un efecto excitatorio, y la morfología del corazón determinada por la presencia de edemas pericárdicos.

Otra de las tantas ventajas que presenta el modelo, se puede destacar que el hígado de *zebrafish* lleva a cabo las mismas funciones que el hígado humano, y el mismo es completamente funcional a los 5 dpf [51]. Esto posibilita realizar un análisis de la toxicidad de un xenobiótico, para observar los efectos que pueden presentarse mediante alteraciones en la morfología del hígado. Cuando dicho órgano se encuentra en buen estado, este se ve claro y traslúcido mientras que un hígado dañado se torna oscuro y opaco [54].

Es por esto que es importante evaluar la posibilidad del desarrollo de hepatotoxicidad, analizando variaciones en el tamaño de dicho órgano, degeneración hepática y retención del saco vitelino. Al margen de lo descrito en párrafos anteriores, es de importancia mencionar que los efectos toxicológicos también pueden manifestarse con cambios morfológicos en diferentes órganos y tejidos. Dichas alteraciones que se generan en respuesta a la exposición de un compuesto tóxico, pueden ser numerosas y de diferentes tipos, llegando a desarrollar anomalías tales como malformación de mandíbula (MM), vejiga natatoria desinflada (VND), necrosis del saco vitelino (NSV), malformación de cabeza (MCa), necrosis en la cabeza (NC), vitelo no consumido (VNC), necrosis hepática (NH), columna doblada (CD) y malformación de cola (MC). El análisis de estos cambios son de gran importancia, puesto que el desarrollo de estas alteraciones pueden dar una idea del nivel de toxicidad que un xenobiótico puede presentar.

CAPÍTULO 2

EMULSIONES ACEITE/AGUA

2.1. Metodología empleada

Según lo explicado, podemos evidenciar la importancia del uso de las emulsiones o/w, la cual logra prevenir la oxidación de las NPs y aumentar su biodisponibilidad para el tratamiento de lesiones cutáneas. En este apartado, se indicará la metodología empleada para la encapsulación de dos lotes de AgNPs distintas en emulsiones o/w. Dichas NPs fueron previamente estudiadas en el Laboratorio de Bio-Nanotecnología (LBN), donde se determinó que presentan diferentes características y respuestas biológicas, atribuible a las diferencias en el tamaño de las mismas. Para la correcta caracterización del sistema *carrier*, se evaluó la polidispersidad y el tamaño hidrodinámico de las emulsiones mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS). Por otro lado, para corroborar adecuadamente estos resultados, se compararon los mismos con micrografías obtenidas mediante microscopía de campo claro.

2.1.1. Encapsulación de NPMs en emulsiones o/w

El preparado de emulsiones o/w se llevó a cabo a través de un proceso de emulsificación espontánea donde se mezclaron pa (**Cuadro 2.1**), una mix de tensioactivos (tween 80, SPC y PPG), y los aceites que componen a la fase oleosa (aceite de canola, aceite de hígado de bacalao y vitamina E). Se realizó el armado de dos emulsiones con pa utilizando dos AgNPs, que por medio del *Nano Zetasizer* se analizaron en estudios previos en el LBN, dando un tamaño de AgNPs de 7 nm (Lote 1) y otra con un tamaño de 904 nm (Lote 2).

Principios Activos		Principios Activos	
AgNPs Lote 1	60 ppm	AgNPs Lote 2	60 ppm
Lidocaína	0,1 %	Lidocaína	0,1 %
Sulfadiazina	0,1 %	Sulfadiazina	0,1 %
Vitamina A	248.000 UI	Vitamina A	248.000 UI
H ₂ O	12 g	H ₂ O	12 g

Cuadro 2.1. Concentraciones utilizadas de pa para la preparación de emulsiones.

Con un agitador magnético se obtuvo una mezcla homogénea de los tensioactivos (mix). En un tubo falcon se agregaron 6,25 g de la mix y otros 6,25 g de la fase oleosa, junto con la vitamina A, la sulfadiazina y la lidocaína (tanto el agua como las NPMs se añadieron al final del proceso de agitación). Para el control, en otro tubo se añadieron 6,25 g de fase oleosa y 6,25 g de mix, sin adicionar pa. Luego se pesó en un tubo, agua destilada y las AgNPs y para el control se pesó PPG y agua destilada.

Las emulsiones con pa (Cpa) y las de sin pa (Spa), se homogeneizaron a 10.000 rpm por 2 min en equipo de ultraturrax (Janhke & Kunkel GmbH and Co KG, Staufen, Alemania). Se dejó reposar hasta que disminuyera el calor generado, para evitar la oxidación de los lípidos, luego se volvió a homogeneizar por 2 min agregando gota a gota las AgNPs con el agua destilada, en la emulsión Cpa. Se realizó el mismo procedimiento para la condición Spa, añadiendo gota a gota el PPG con el agua destilada.

2.1.2. Caracterización emulsiones

Se realizaron diluciones al medio de Spa y Cpa para su análisis por microscopía de campo claro. Posteriormente, en un portaobjetos se puso una gota de cada condición y se colocó un cubreobjetos, dejándolo secar por unos 3 min y con el lector multi-modal *Cytation* (*Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Biotek*), se observaron con un aumento de 10X.

Para la determinación del tamaño de gota de las emulsiones, se utilizó la técnica de DLS, con el equipo *Malvern Mastersizer 2000E, Malvern Instruments Ltd*. Esta técnica nos permite medir el tamaño hidrodinámico de las gotas, para ello se regularon los siguientes parámetros: la determinación se realizó a 2000 rpm, con un grado de obscuración en un rango del 10-13 % y una intensidad del láser no menor al 74 %. Se trabajó con el parámetro D[4,3], ya que es quien nos puede dar una medida de estabilidad de las gotas formadas.

2.1.3. Obtención de nanocompuestos de gelatina

Se preparó una solución de film, pesando en balanza analítica 1,5 g de glicerol. Luego se añadieron 100 mL de agua destilada y se lo llevó a baño maría, en agitación, hasta llegar a los 70°C. En este punto se agregaron 3 g de gelatina y se dejó en agitación magnética por 20 min. Se tomaron 25 mL de la solución de film para cada condición:

25 mL de solución de film			
Spa 1:5	Spa 1:10	Cpa 1:5	Cpa 1:10
Se agregaron 5 mL de la emulsión control	Se agregaron 2,5 mL de la emulsión control	Se agregaron 5 mL de la emulsión con pa	Se agregaron 2,5 mL de la emulsión con pa

Cuadro 2.2. Cantidades utilizadas para el armado de las distintas condiciones de films.

Con un agitador magnético se homogeneizó la emulsión con la solución de film. Luego, en balanza granataria se pesaron 6 g de cada condición en placas de petri y se los dejó secando por una semana (**Figura 2.1**).

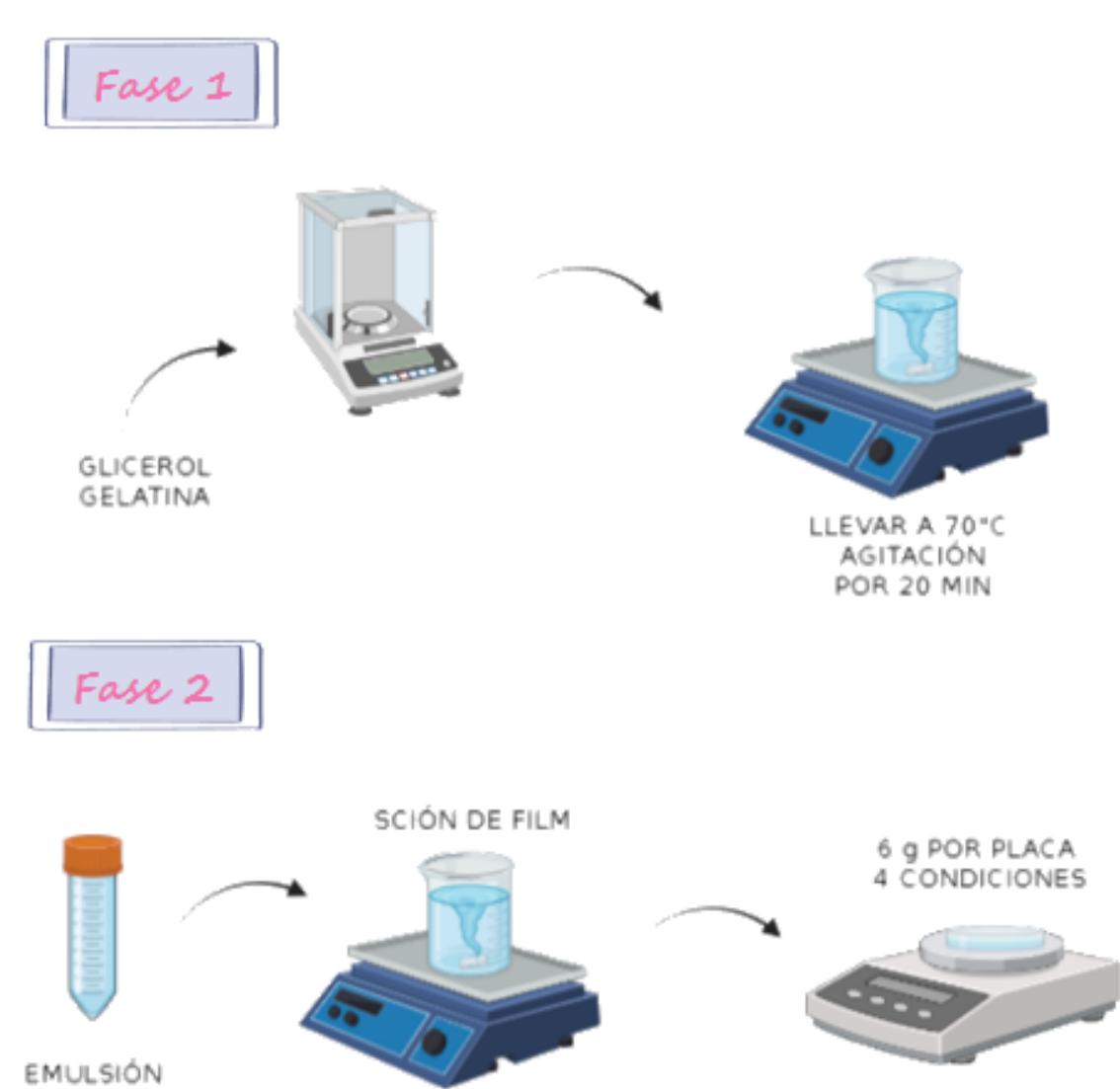
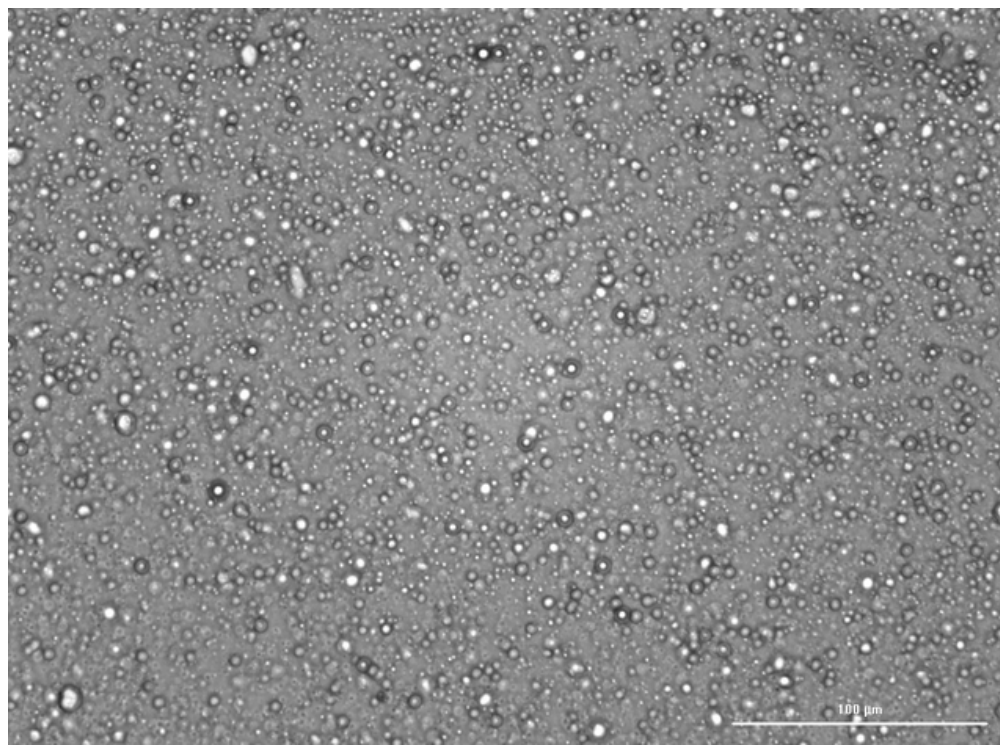


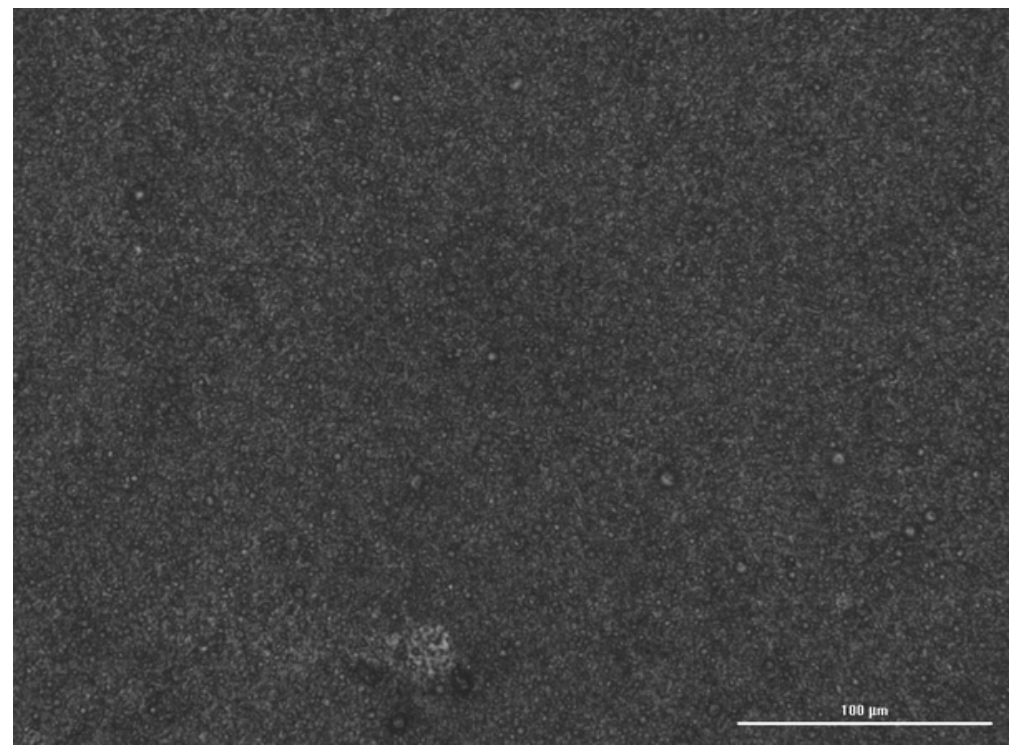
Figura 2.1. Flujo de trabajo para la obtención de compósitos nanotecnológicos de gelatina.

2.2. Resultados y discusión

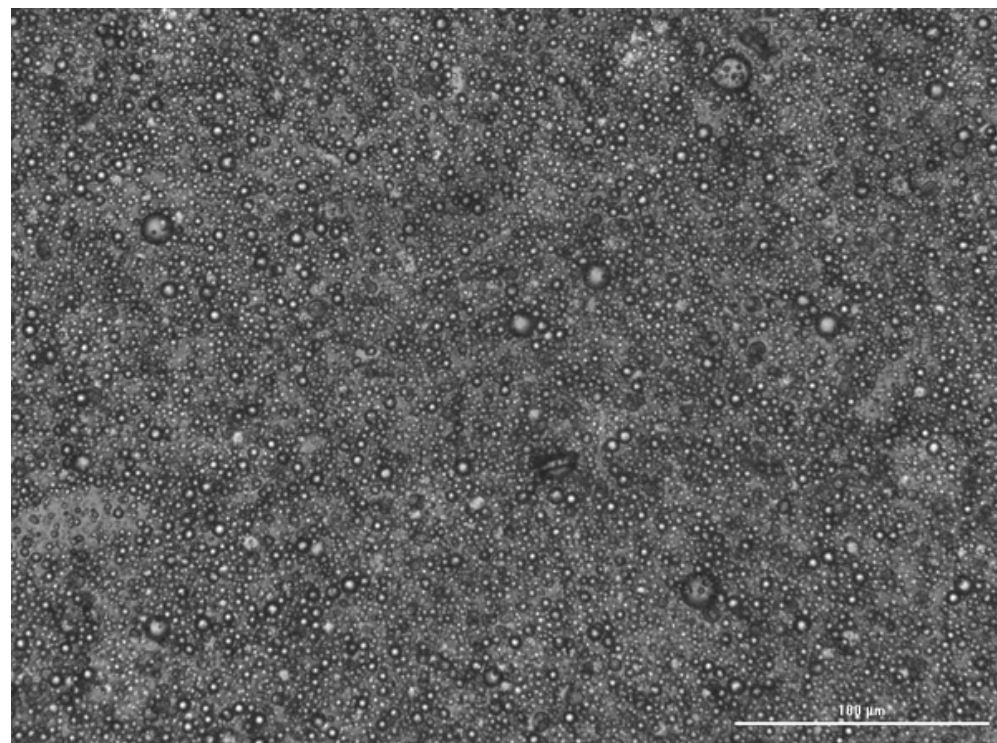
A partir de la caracterización de cada condición de las emulsiones se logró evidenciar el tamaño hidrodinámico de partícula, polidispersidad y por consiguiente se observó que las mismas han logrado incorporar correctamente las AgNPs en su interior. En la **Figura 2.2** mediante la microscopía de campo claro, se logra observar en la figura (a) y (c) que ambas condiciones de Cpa poseen un tamaño de gota considerablemente mayor, en comparación al de la figura (b), esto se condice con que la emulsión podría estar encapsulando los pa.



(a) Emulsión con pa con AgNPs Lote 1.



(b) Emulsión control sin pa.



(c) Emulsión con pa con AgNPs Lote 2.

Figura 2.2. Microscopía de campo claro en las diferentes condiciones.

En base a las imágenes obtenidas mediante la microscopía también se puede corroborar que la formación de gotas en la emulsión indican que no presentan un fenómeno de desestabilización, lo cual genera como consecuencia la agregación de gotas.

En el **Gráfico 2.1** se pudo observar que para la condición de Cpa AgNPs correspondiente al Lote 1 hay un tamaño de gota igual a $2,51 \mu\text{m}$ y para Cpa AgNPs del Lote 2 se obtuvo un tamaño de gota de $3,80 \mu\text{m}$. Comparando estos valores con el tamaño de Spa, el cual es de $1,09 \mu\text{m}$, se puede decir que estas diferencias en los valores evidencian que se lograron encapsular las NPs correctamente, puesto que se condicen estos resultados con el tamaño de las NPs utilizadas para el armado de emulsiones con pa; obteniendo así el menor tamaño de gota para las emulsiones Spa ya que las mismas no se les agregaron los pa correspondientes, luego un tamaño intermedio de gota para las emulsiones Cpa Lote 1 que presentaban un tamaño de AgNPs de 7 nm , y por último las emulsiones Cpa Lote 2 que presentaban un tamaño de AgNPs de 904 nm teniendo el mayor tamaño de gota. Por otro lado, también se observa, tanto para Cpa Lote 1 y 2 un aumento de la amplitud de la distribución gaussiana. Esto último nos estaría indicando que la muestra es polidispersa, lo que quiere decir que hay más de un tamaño de partícula en Cpa.

En lo que respecta al caso de la Spa, se puede ver que la polidispersidad es mucho menor a la obtenida para la Cpa AgNPs de ambos lotes, además se observa que el tamaño de partícula resulta ser inferior, puesto que las gotas de aceite de la emulsión no contiene pa encapsulados en su interior, y por tanto como resultado, también el tamaño de las gotas formadas son más homogéneas.

Mediante esta técnica se estima que el Índice de Polidispersidad (PDI) para Cpa Lote 1 es de 0,342, mientras que para Cpa Lote 2 fue 0,368. La polidispersidad de las muestras de Cpa tanto del lote 1 como del lote 2, radica en que la cantidad de pa que se logró encapsular en las emulsiones no es homogéneo, sino que se ve distribuido en diferentes cantidades en las gotas, dando como resultado una población polidispersa.

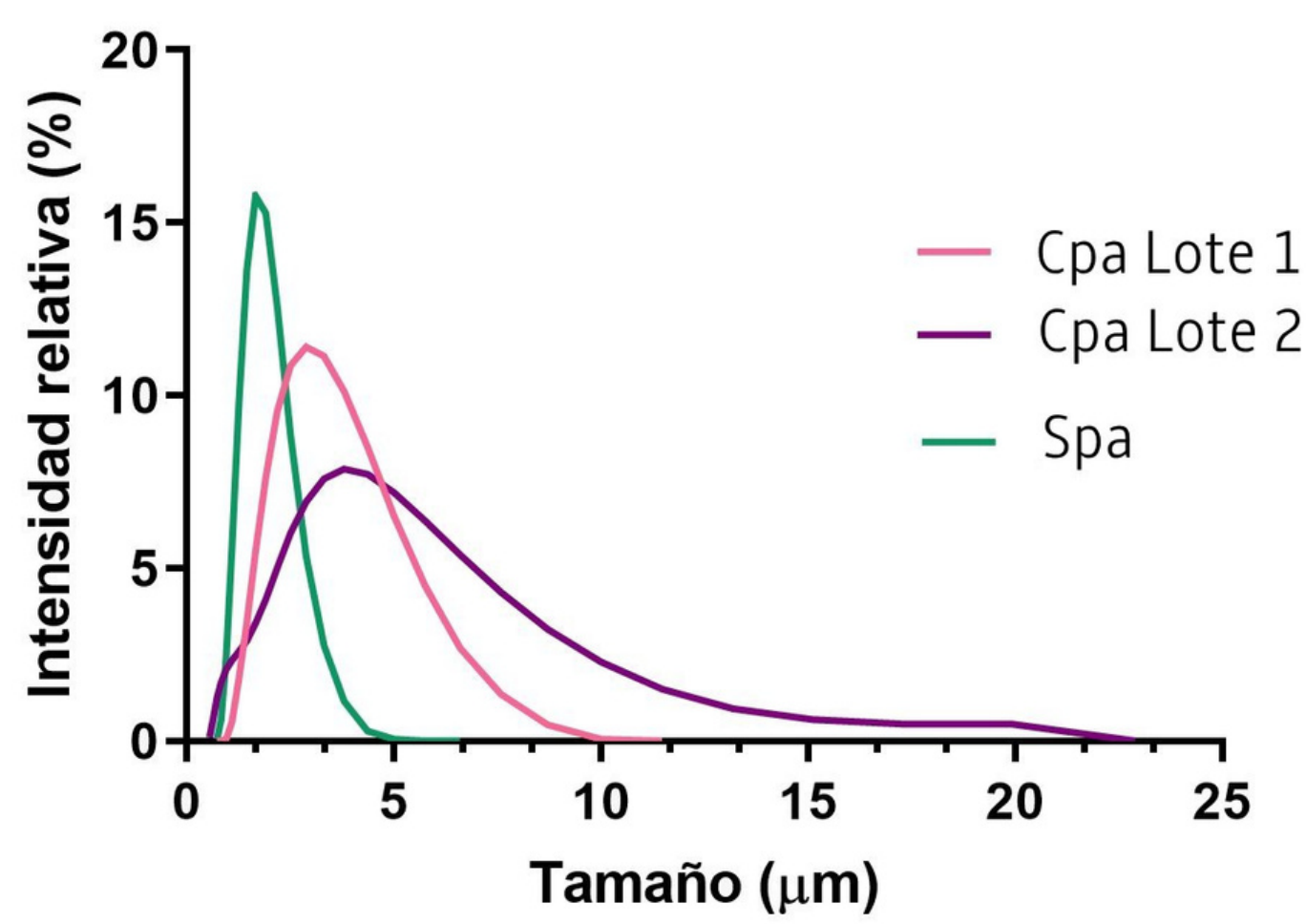


Gráfico 2.1. Dispersión dinámica de luz de las distintas condiciones ensayadas.

A través de los resultados y la argumentación expuesta, se puede determinar que se lograron obtener emulsiones o/w capaces de encapsular los pa de forma correcta, sin la pérdida de estabilidad de la misma, la cual podría darse por la incorporación de oxígeno en la emulsión dando como resultado la oxidación de lípidos. Mediante la medida de volumen obtenida con el parámetro D [4,3], el cual representa el tamaño hidrodinámico de la partícula, ayuda a evidenciar los fenómenos de desestabilización generados al haber un acercamiento entre las gotas de la emulsión. Por otro lado, el hecho de que los pa fueran incorporados correctamente en la emulsión, previene en cierta medida que al integrarlo en los films de gelatina pueda ocurrir una disminución de la biodisponibilidad en el sitio *target*.

En la **Figura 2.3** se pueden observar las distintas condiciones de los compósitos nanotecnológicos una vez finalizada su preparación. Se puede contemplar que aquellos compósitos que contenían principios activos, presentaron una estructura más robusta en comparación de aquellos que no contenían estos componentes.

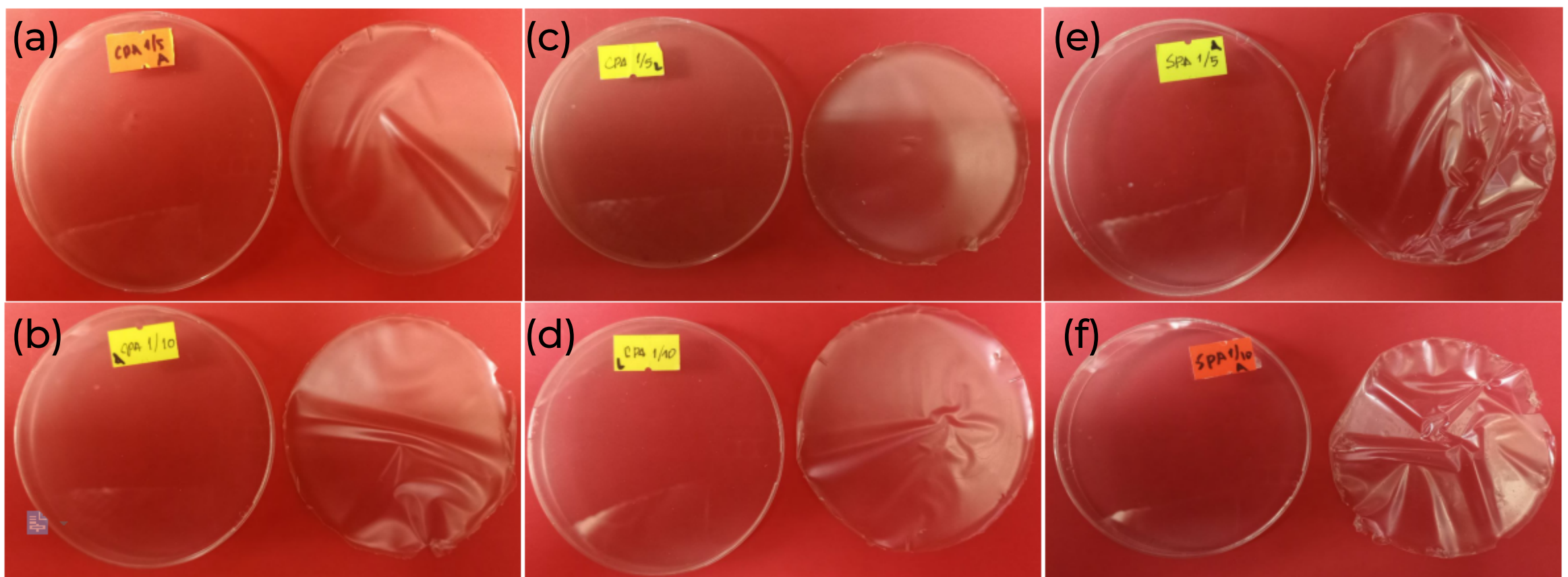


Figura 2.3. Compósitos nanotecnológicos de gelatina en placas de petri (izquierda) y sueltos (derecha).
 (a) Cpa 1:5 Lote 1. (b) Cpa 1:10 Lote 1. (c) Cpa 1:5 Lote 2. (d) Cpa 1:10 Lote 2. (e) Spa 1:5. (f) Spa 1:10.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO*

3.1. Metodología empleada

Una vez realizada la caracterización fisicoquímica de las emulsiones y la consiguiente obtención de los compósitos nanotecnológicos, es de gran importancia poder evaluar su biocompatibilidad *in vitro* tanto en células de la capa más superficial como de las capas más profundas de la piel. Para esto, se estudió la toxicidad en la línea celular HaCaT, la cual consiste en queratinocitos obtenidos a partir del tejido epitelial de la epidermis de personas adultas, con un alto potencial para diferenciarse y proliferar en cultivos celulares *in vitro* [35, 36]; y en células 3T3, que es conseguida de fibroblastos murinos, siendo representativa de los fibroblastos que se encuentran en la capa interna de la piel, específicamente en la dermis [35]. Ambas líneas celulares fueron donadas por el banco de células del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE). Este análisis se llevó a cabo mediante ensayos de citotoxicidad por cristal violeta (CV), activación metabólica por el método de reducción de MTT (MTT), y de captura de rojo neutro (RN). Dentro de la caracterización *in vitro* de los compósitos nanotecnológicos, es de gran importancia la evaluación de su capacidad; por esto se realizaron ensayos microbiológicos para la visualización de la efectividad de las AgNPs en conjunto con los pa en los nanocompósitos mediante la lectura de halos de inhibición representativos del potencial antimicrobiano del compósito.

3.1.1. Mantenimiento celular

Ambas líneas celulares se mantuvieron mediante repiques realizados tres días a la semana, para evitar el levantamiento de células por el fenómeno de inhibición por contacto. A partir de un T25 confluyente, se retiró el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS (buffer fosfato salino). Posteriormente, se adicionaron 250 mL de tripsina (en 3T3 y el doble para HaCaT) para poder romper los enlaces peptídicos y lograr que las células pasen de estar adheridas al frasco a estar en suspensión. Luego, se dejaron incubando por 3 min en estufa a 37°C para 3T3 y 15 min para HaCaT. Se procedió a inactivar la enzima con 3 mL de medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino (MEM para 3T3 y RPMI para HaCaT) por cada 1 mL de tripsina que se utilizó.

Se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 3 mL de medio de cultivo, y se sembró 1 mL en el T25; se le adicionó al frasco, medio de cultivo fresco. Finalmente, se dejó incubando a las células a 37°C en estufa gaseada con 5 % de CO₂.

3.1.2. Ensayos de toxicidad con AgNPs

Se evaluó la biocompatibilidad de las AgNPs del Lote 1 y 2 sin integrarlas a los sistemas *delivery*, a diferentes concentraciones, tanto con la línea celular HaCaT como 3T3. Se realizaron ensayos de citotoxicidad por cristal violeta, activación metabólica por el método de reducción de MTT y ensayos de captura de rojo neutro. Se comenzó por repicar un T75 confluente, el pellet resultante se resuspendió en 10 mL de medio. Se sembraron una densidad de 7000 células por *well* en placas de 96 *wells* de fondo plano. Luego, se las dejó crecer por 24 hs en estufa a 37°C hasta llegar a confluencia.

Se realizaron diluciones seriadas de las AgNPs utilizando medio de cultivo MEM para la línea celular 3T3 y RPMI para HaCaT (**Figura 3.1**).

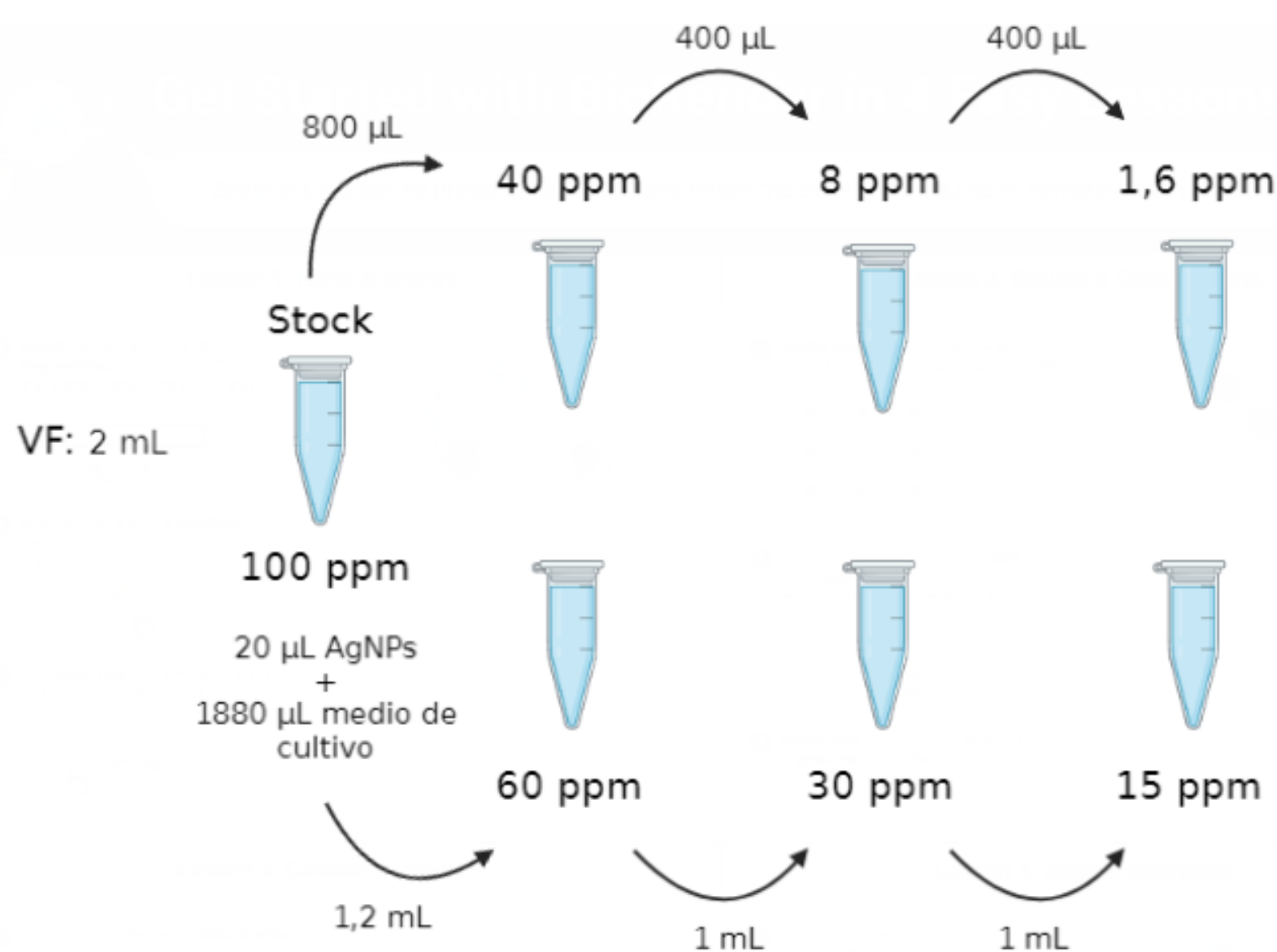


Figura 3.1. Preparación de las diluciones seriadas de las nanopartículas de plata.

Se prosiguió retirando el medio de cultivo de la placa y se sembraron 100 µL de cada dilución utilizando concentraciones crecientes de AgNPs, quedando el siguiente orden: células sin muestra, 1,6 ppm NPs, 8 ppm NPs, 15 ppm NPs, 30 ppm NPs, 40 ppm NPs, 60 ppm NPs, 100 ppm NPs, control positivo con EDTA, medio de cultivo (**Figura 3.2**).

El ácido etilen-diamino tetracécito (EDTA) es un quelante de iones que actúa como control positivo, puesto que por bibliografía se sabe que presenta un potencial efecto citotóxico en células, disminuyendo el porcentaje de viabilidad celular [55], se incubó por 24 hs en estufa a 37°C.

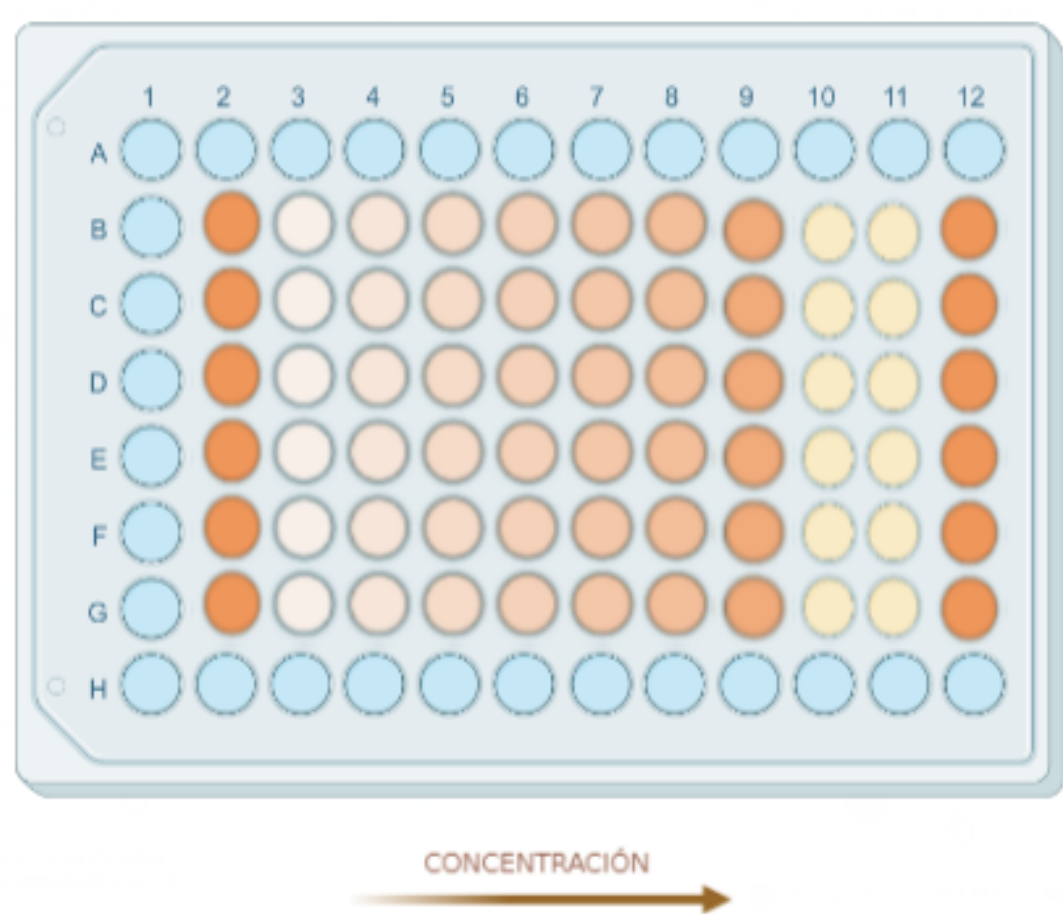


Figura 3.2. Siembra de las diluciones de nanopartículas de plata en placa de 96 wells.

Para el revelado del ensayo se utilizaron diferentes metodologías de acuerdo a los ensayos de toxicidad que se realizaron. En los siguientes apartados se verá el procedimiento implicado en el revelado de cada técnica.

3.1.3. Citotoxicidad por cristal violeta

Mediante este ensayo se obtuvo una medida de adhesión de ambas líneas celulares, permitiendo así cuantificar la viabilidad de las mismas. Para esto, se partió de un T75 confluente, y se realizaron los mismos pasos descritos en el apartado 3.1.2 "Ensayos de toxicidad con AgNPs" en lo que respecta al plaqueo de células en placas de 96 wells. Se prepararon las muestras tanto del lote 1 como del lote 2, en tubos eppendorf (Cpa 1:5, Cpa 1:10, Spa 1:5, Spa 1:10). Se añadieron 1,5 mL de medio de cultivo a 4 tubos y se los incubaron por 24 hs a 37°C con discos de film de 1 cm de diámetro previamente esterilizados bajo luz UV por 2 min (**Figura 3.3**).

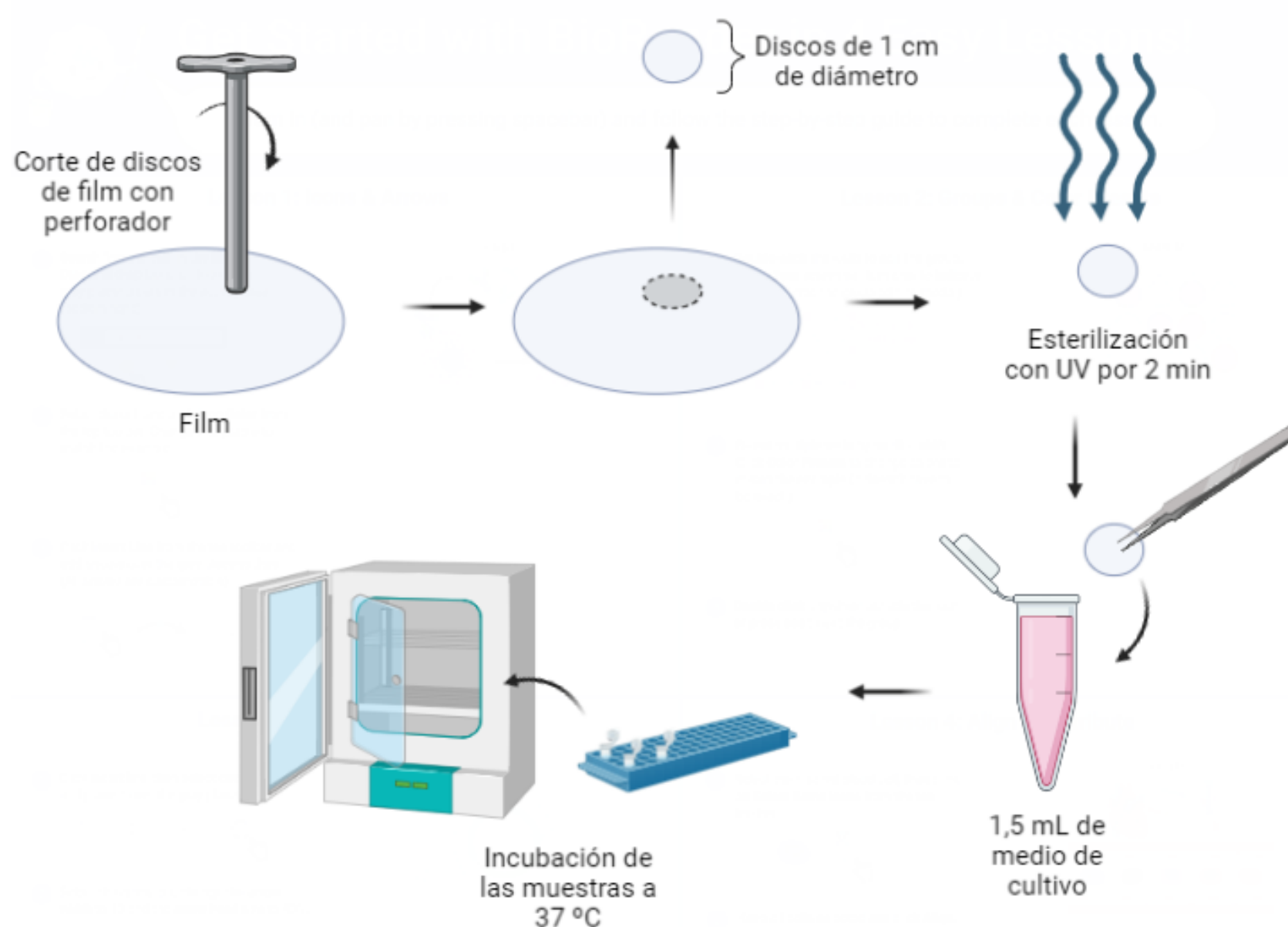


Figura 3.3. Flujo de trabajo para el preparado de las muestras a incubar.

Pasadas las 24 hs, se prepararon 4 tubos eppendorf con las mismas muestras siguiendo el mismo procedimiento, y se las dejó incubar por 3 hs; se preparó una solución de EDTA 15 mM con medio de cultivo. Se retiró el medio de cultivo de cada well y se sembraron 100 μ L del sobrenadante de la muestra sin tocar el film de cada condición, el orden de siembra fue el siguiente: células sin muestra, Spa 1:5 24 h, Spa 1:10 24 h, Cpa 1:5 24 h, Cpa 1:10 24 h, Spa 1:5 4 h, Spa 1:10 4 h, Cpa 1:5 4 h, Cpa 1:10 4 h, control positivo EDTA, medio de cultivo (**Figura 3.4**). Posteriormente, se procedió a dejar en incubación por 24 hs en estufa a 37°C.

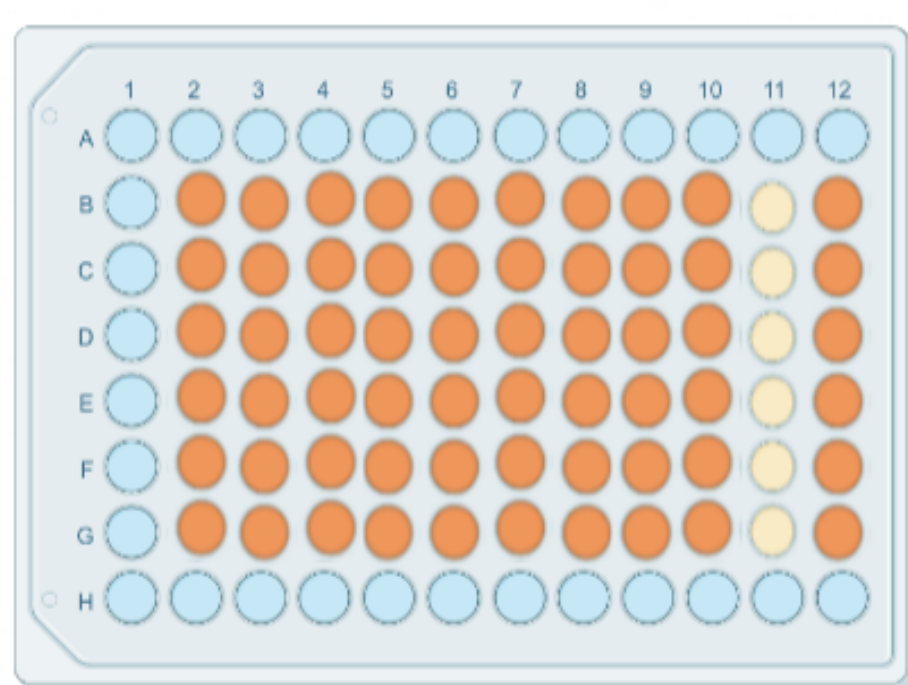


Figura 3.4. Siembra de las distintas muestras en placa de 96 wells.

Luego, para el revelado del ensayo se retiraron las muestras de la placa y se realizó un lavado con PBS. Se agregó solución de cristal violeta 0,1 %, y se dejó incubando 15 min en estufa a 37°C. Se realizó un lavado con agua destilada y se descartó por inversión.

Finalmente, se resuspendió cada well con ácido acético 30 % para solubilizar el colorante y se dejó incubando por 20 min. Se procedió a medir absorbancia a 530 nm con el lector multi-modal *Cytation*.

3.1.4. Activación metabólica por el método de reducción de MTT

Este ensayo colorimétrico aportó información cuantitativa sobre las variaciones de la actividad metabólica celular, e indirectamente de la viabilidad de ambas líneas celulares. Se partió de un T75 confluyente, y se realizaron los mismos pasos descriptos para la siembra de células en placa de 96 wells y el armado y plaqueo de las muestras. Para el revelado, se retiraron las muestras de cada well y se realizó un lavado con PBS. Luego se adicionó solución de MTT 1X y se incubó 1 hora para la línea celular 3T3 y 30 min para HaCat a 37°C en estufa. Posteriormente, se retiró el reactivo y se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) resuspendiendo hasta lograr la extracción completa del colorante. Para finalizar, en el lector de placas *Cytation* se midió absorbancia a 570 nm.

3.1.5. Ensayos de captura de rojo neutro

A partir de este ensayo se cuantificó la cantidad de células viables, estudiando la integridad de la membrana por medio de la capacidad de captura del colorante rojo neutro. Se partió de un T75 confluyente, y se realizaron los mismos pasos descriptos para la siembra de células en placa de 96 wells y el armado y plaqueo de las muestras. Para el revelado del ensayo, se retiraron las muestras de la placa y se lavó con PBS. Posteriormente, se agregó solución de rojo neutro 50 µg/mL y se dejó incubando a 37°C en estufa por 1 hora para la línea celular 3T3 y 30 min para HaCaT. Se retiró la solución de rojo neutro y se adicionaron 100 µL de solución fijadora (formaldehído 1 %, carbonato de sodio 1 %, agua desionizada) dejándola por 2 min. Se realizó un lavado con 100 µL de solución salina NaCl 0,9 % y se retiró para adicionar 100 µL de la solución de revelado (etanol 50 %, ácido acético glacial 1 %, agua desionizada) para lograr la solubilización completa del colorante. Por último, se midió absorbancia a 540 nm en el lector de placas *Cytation*.

3.1.6. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos mediante las medidas de absorbancia en cada ensayo fueron expresados como media $\pm$ desviación estándar (DE); el análisis estadístico de dichos resultados se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism 8*.

Se procedió a identificar y eliminar la presencia de *outliers* en los valores obtenidos de cada condición. Posteriormente, se utilizó la prueba de *One-Way* ANOVA siguiendo con el test de comparaciones múltiples de Dunnett [41].

3.2.7. Ensayos microbiológicos

Para la realización de los ensayos microbiológicos, se utilizó el siguiente flujo de trabajo (Figura 3.5):



Figura 3.5. Flujo de trabajo propuesto para los ensayos microbiológicos destinados a la evaluación de la actividad antimicrobiana de los compósitos nanotecnológicos.

Se realizó el armado y la esterilización por autoclave de medio líquido y sólido de Mueller Hinton (MH). Este medio de cultivo es el recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), debido a que en el mismo crecen la mayor parte de las bacterias patógenas, y la diferencia entre los distintos lotes comercializados son pocas, lo que ayuda a la estandarización entre laboratorios [56]. Al siguiente día se descongeló un stock de *E. coli* y se sembró en medio sólido MH, por la técnica de agotamiento por estría para obtener colonias aisladas; se lo dejó crecer por 24 hs en estufa a 37°C. Luego, se armó un inóculo líquido en tubo falcon con 10 mL de medio líquido MH, tomando una colonia aislada con un ansa para inocular la misma en el medio. Se dejó crecer el inóculo en estufa a 37°C por 24 hs, y luego se midió la densidad óptica (DO) del mismo.

Mediante un colorímetro (*Visible Spectrophotometer 80-5000-00, Biochrom Ltd Cambridge England*), se midió absorbancia a 600 nm, y sabiendo que según MacFarland el estándar de turbidez es de 0,5 [56], se realizó la dilución correspondiente. Una vez preparado el inóculo de DO 0,5, se sembraron 100 μ L de la misma, y con una espátula de drigalsky se lo extendió hasta lograr su absorción total. Posteriormente se colocaron discos de 1 cm de diámetro de cada condición de los compósitos nanotecnológicos (**Figura 3.6**) y se dejó en estufa a 37°C por 24 hs.

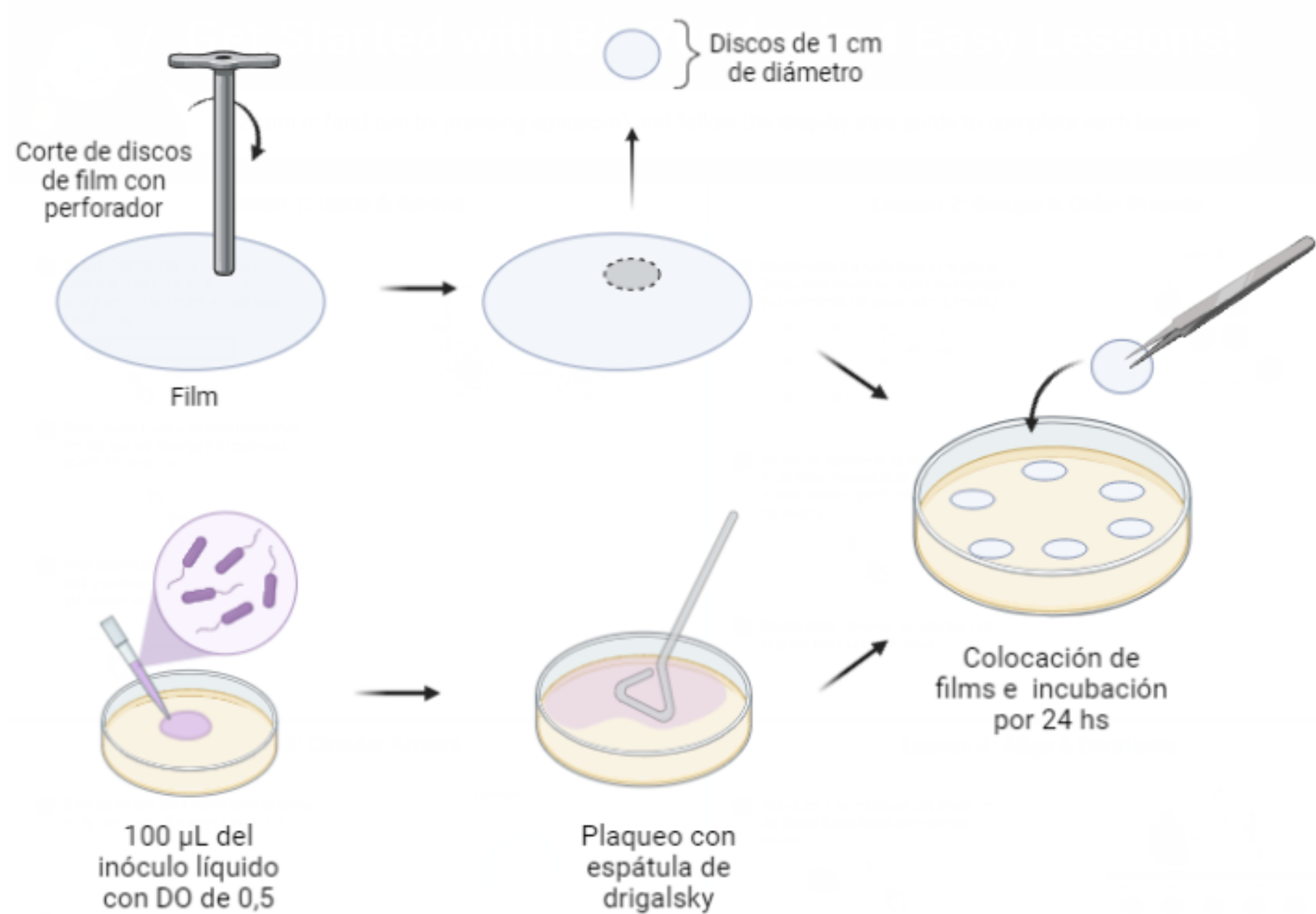


Figura 3.6. Flujo de trabajo para el sembrado de los films en cultivos bacterianos.

Se sembraron las diferentes condiciones de los compósitos siguiendo el siguiente orden (**Figura 3.7**):

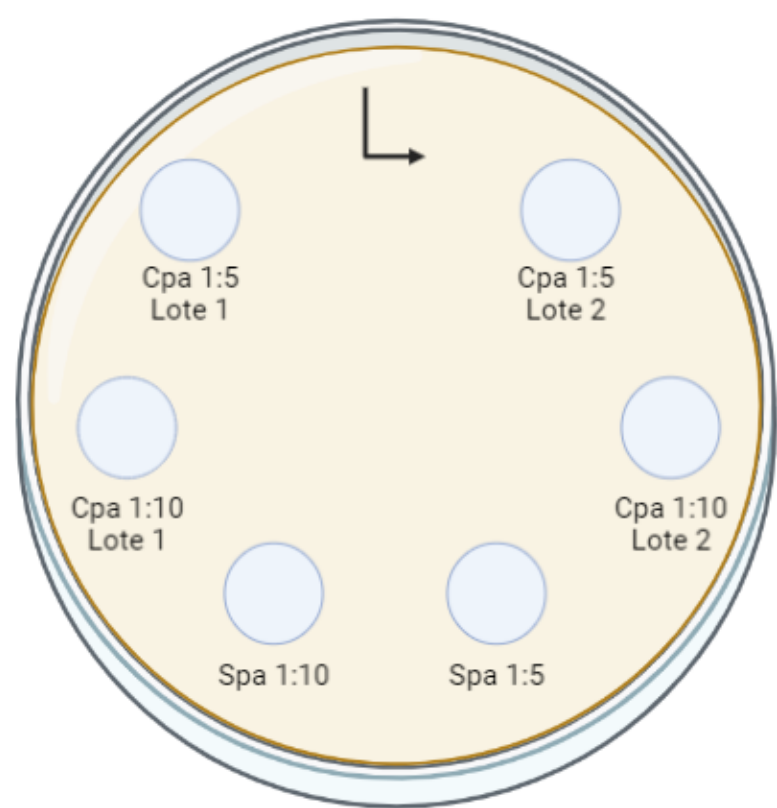


Figura 3.7. Orden de plaqueo de las diferentes condiciones de films.

Finalmente, se visualizó la presencia de halos de inhibición en el crecimiento bacteriano.

3.2. Resultados y discusión

En el análisis realizado para la evaluación de la toxicidad sobre las líneas celulares HaCaT y 3T3 con las AgNPs a distintas concentraciones, se puede constatar que específicamente estos tamaños de NPs generan un efecto altamente tóxico a medida que aumenta la concentración de las mismas (**Gráfico 3.1 y 3.2**).

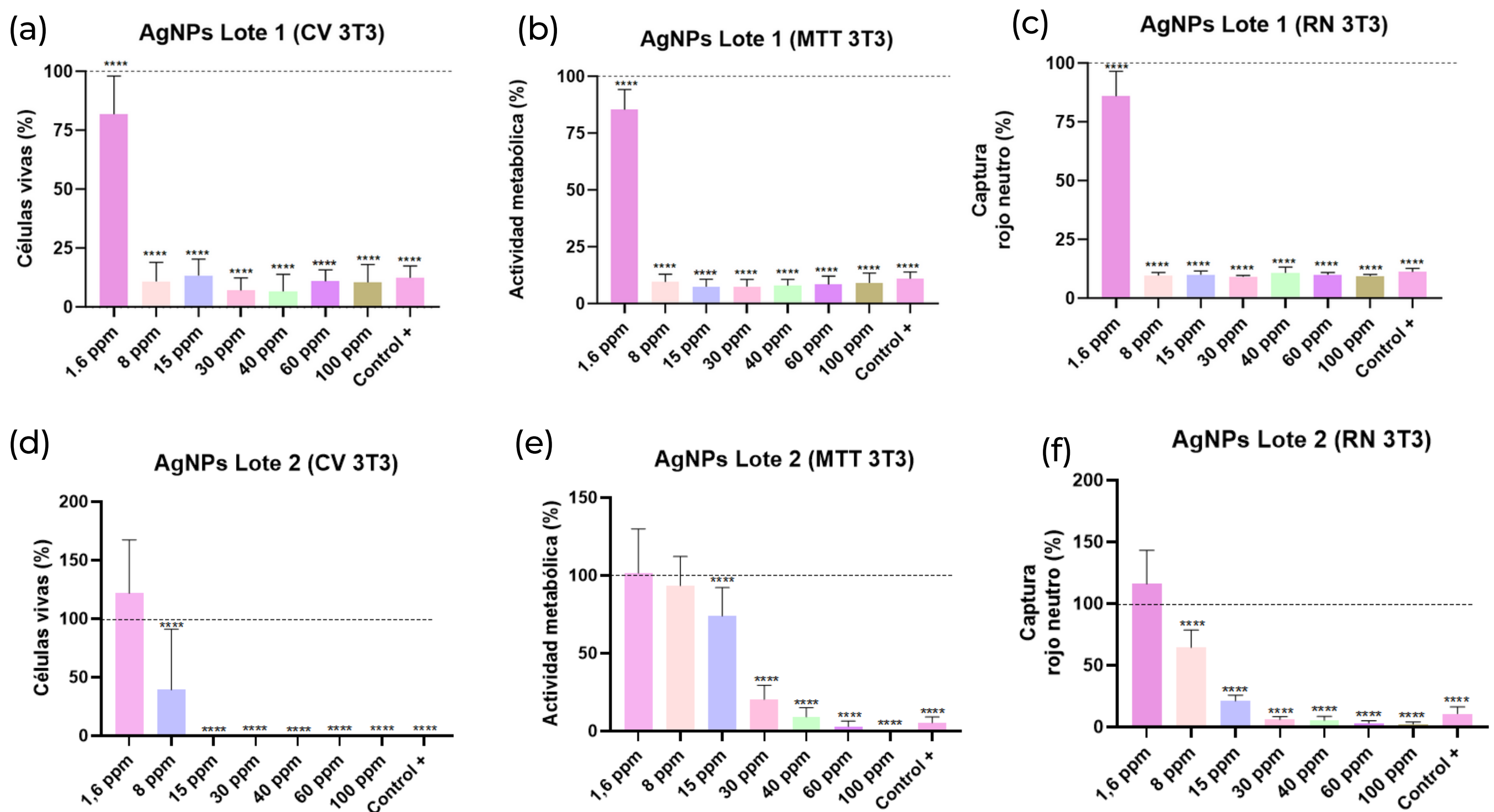


Gráfico 3.1. Ensayos de toxicidad con concentraciones de AgNPs Lote 1 y Lote 2 crecientes en 3T3. (a) Citotoxicidad por cristal violeta. (b) Actividad metabólica por el método de reducción de MTT. (c) Captura de rojo neutro. (d) Citotoxicidad por cristal violeta. (e) Actividad metabólica por el método de reducción de MTT. (f) Captura de rojo neutro. Los datos se muestran como $\pm$ DE (n=32), * $p<0,05$, ** $p<0,01$ **** $p<0,0001$.

Los gráficos 3.1 y 3.2, además de evidenciar la toxicidad *per se* que las AgNPs presentan sobre las líneas celulares HaCaT y 3T3, se puede observar que a bajas concentraciones, como 1,6, 8 e incluso a 15 ppm en ciertos casos, resulta presentar un menor grado de toxicidad las AgNPs Lote 2.

Esto se condice con lo expuesto en el primer capítulo, puesto que por bibliografía se sabe que las NPMs a medida que el tamaño de las mismas disminuye, el efecto toxicológico será mayor debido al aumento del área superficial disponible para interaccionar con, en este caso, las células eucariotas [14]. Las AgNPs del Lote 1 al poseer un tamaño más reducido, aumenta su efecto toxicológico, ya que los electrones de las NPs se encuentran menos retenidos al núcleo, y por ende más disponibles para reaccionar.

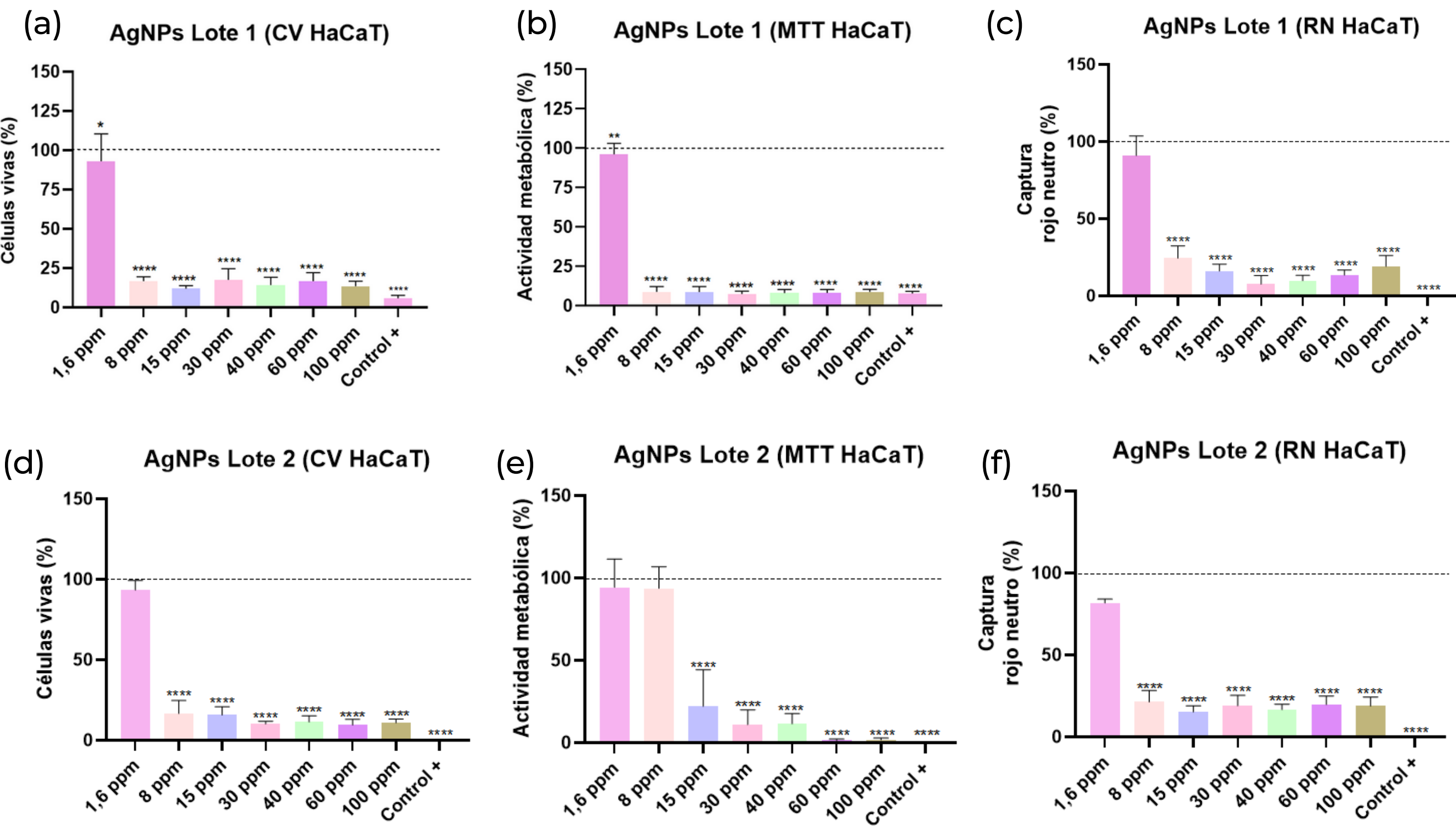


Gráfico 3.2. Ensayos de toxicidad con concentraciones de AgNPs Lote 1 y Lote 2 crecientes en HaCaT. (a) Citotoxicidad por cristal violeta. (b) Actividad metabólica por el método de reducción de MTT. (c) Captura de rojo neutro. (d) Citotoxicidad por cristal violeta. (e) Actividad metabólica por el método de reducción de MTT. (f) Captura de rojo neutro. Los datos se muestran como $\pm$ DE (n=32), ****p<0,0001.

En los ensayos de actividad metabólica por el método de reducción de MTT se puede observar esta clara diferencia en la toxicidad entre AgNPs Lote 1 y del Lote 2 (**Gráfico 3.1 y 3.2**). Esto resultados confirman nuevamente lo expuesto, puesto que las líneas celulares tratadas con AgNPs Lote 2 poseen una mayor actividad metabólica en comparación con las tratadas con el Lote 1.

Esto se debe a que las NPs de menor tamaño presentan un efecto tóxico aún mayor sobre las mitocondrias. Las AgNPs poseen varios puntos de ataque donde puede generar toxicidad, entre ellos la mitocondria; estas actuarán generando una interferencia sobre la coenzima Q, que en la mitocondria participa en el proceso respiratorio, lo que dará como resultado el desacople de la cadena respiratoria [57]. Este orgánulo es el encargado, de la reducción de MTT a formazán, demostrando en este ensayo colorimétrico la medida de la actividad metabólica e indirectamente la viabilidad celular. Por otro lado, siguiendo con la misma cuestión, comparando los ensayos de citotoxicidad por cristal violeta, el cual representa una medida de la adhesión celular y por ende de la viabilidad, se observa también este aumento de la toxicidad de las AgNPs Lote 1, lo que da como resultado que el porcentaje de células vivas disminuya considerablemente a medida que la concentración de las NPs aumenta.

Luego, en los ensayos realizados de captura de rojo neutro, se visualiza nuevamente esta toxicidad diferencial dada por la diferencia de tamaño de las AgNPs. Las NPs se distribuyen sobre todo el sistema de endomembranas alterando las vías de transporte de la misma, y por ende alcanzado entre ellos a los lisosomas [57], los cuales en este ensayo son los encargados de capturar, al colorante catiónico, rojo neutro. Al verse afectado este orgánulo, la captura de dicho colorante disminuye considerablemente a medida que el tamaño de las NPs disminuya y su concentración aumente. En otros trabajos se ha reportado esta disminución marcada de la viabilidad celular de la línea celular HaCaT y 3T3 al tratarlas con concentraciones crecientes de una solución de AgNPs [58, 59], lo cual sostiene lo obtenido en estos estudios.

A continuación, en el **Gráfico 3.3**, se presentan los resultados para los ensayos realizados con las distintas condiciones de los compósitos nanotecnológicos AgNPs Lote 1 y Lote 2 sobre la línea celular 3T3. Tanto para el ensayo de CV como el de MTT con los nanocompósitos del Lote 1, se puede observar que el porcentaje de células adheridas y el de la actividad metabólica no se encuentra alterado, y consecuentemente tampoco la viabilidad celular de 3T3. En el ensayo de RN con las muestras del Lote 1, también se logra evidenciar que no hay cambios significativos con respecto al control, lo que indica que la integridad de la membrana no se vio afectada. En lo que respecta al ensayo de CV con los compósitos nanotecnológicos del Lote 2 se puede observar que el porcentaje de la adhesión celular no presentó cambios significativos con respecto al control.

Por otro lado, para los ensayos de MTT, existe una variación para Cpa 1:10 24 hs, Cpa 1:5 y 1:10 3 hs; sin embargo esto no estaría indicando una pérdida de la viabilidad celular, ya que se observa un leve aumento en la actividad metabólica para dichas condiciones. Por último, en lo que respecta al ensayo de RN con los nanocompuestos del Lote 2, se puede deducir que la integridad de la membrana no se vio alterada de forma significativa con respecto al control.

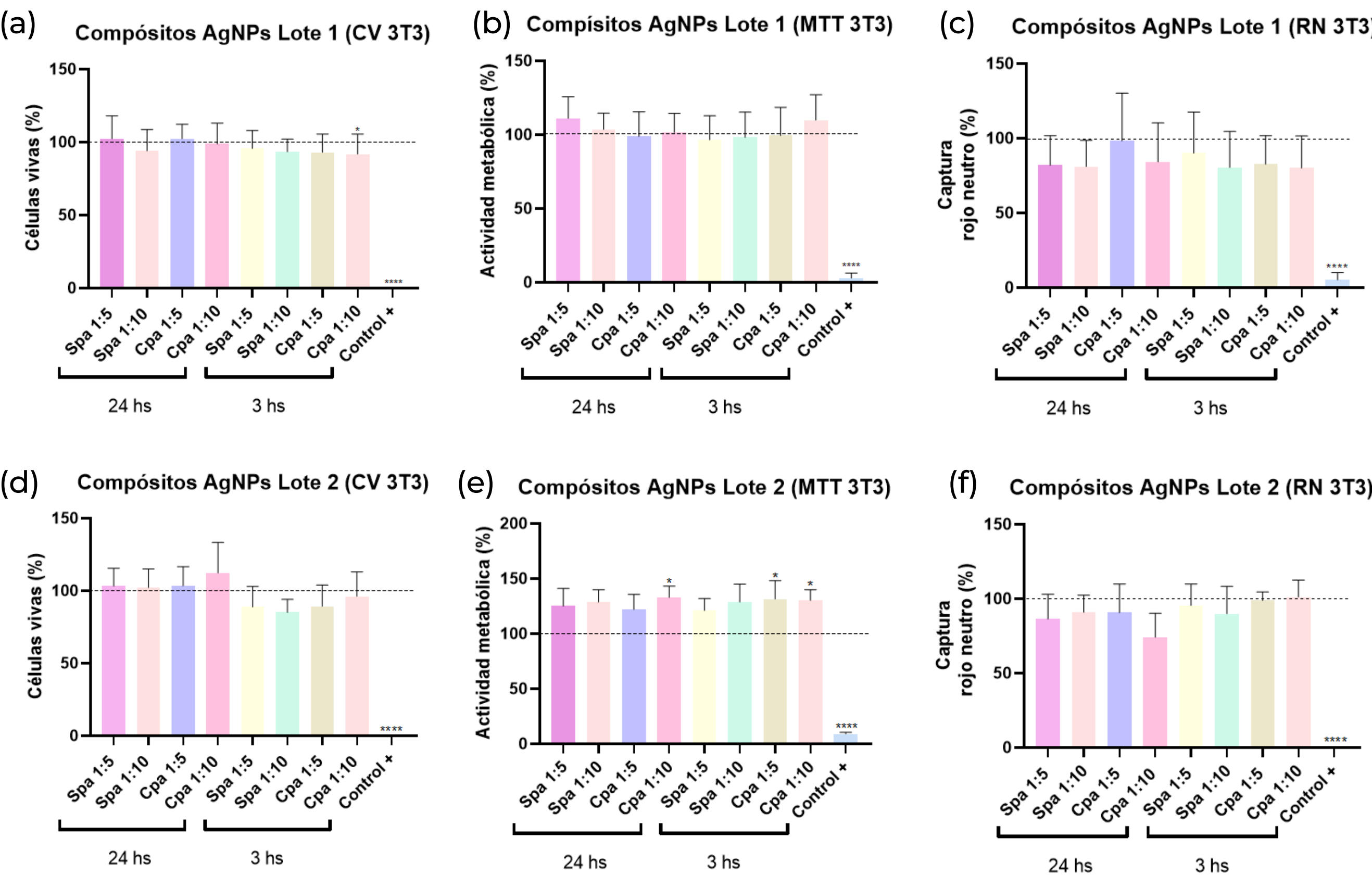


Gráfico 3.3. Ensayos de toxicidad de las distintas condiciones de los compósitos nanotecnológicos con AgNPs Lote 1 y Lote 2 sobre 3T3. (a) Citotoxicidad por cristal violeta. (b) Actividad metabólica por el método de reducción de MTT. (c) Captura de rojo neutro. (d) Citotoxicidad por cristal violeta. (e) Actividad metabólica por el método de reducción de MTT. (f) Captura de rojo neutro. Los datos se muestran como $\pm$ DE (n=32), *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001.

En el **Gráfico 3.4**, en lo que respecta a la línea celular HaCaT, en el ensayo de CV de los compósitos Lote 1, no se observaron alteraciones que disminuyan de forma considerable la viabilidad celular. Por otro lado, en el ensayo de RN no se evidencian alteraciones significativas en el porcentaje de captura de rojo neutro, lo que indica que las muestras del Lote 1 no promueven la pérdida de la integridad de la membrana y por ende tampoco la disminución de la viabilidad celular en HaCaT.

Sin embargo, en cuanto a la actividad metabólica celular para la misma muestra (**Gráfico 3.4.b**), se presentan variaciones significativas con respecto al control en Spa 1:5 24 hs y Spa 1:5 3 hs; sin embargo, estas alteraciones no se observan en los nanocompuestos con pa. En la evaluación de los nanocompuestos del Lote 2, no se han presentado cambios en el porcentaje de adhesión celular, actividad metabólica e integridad de la membrana que pudieran desencadenar una pérdida considerable de la viabilidad celular en HaCaT.

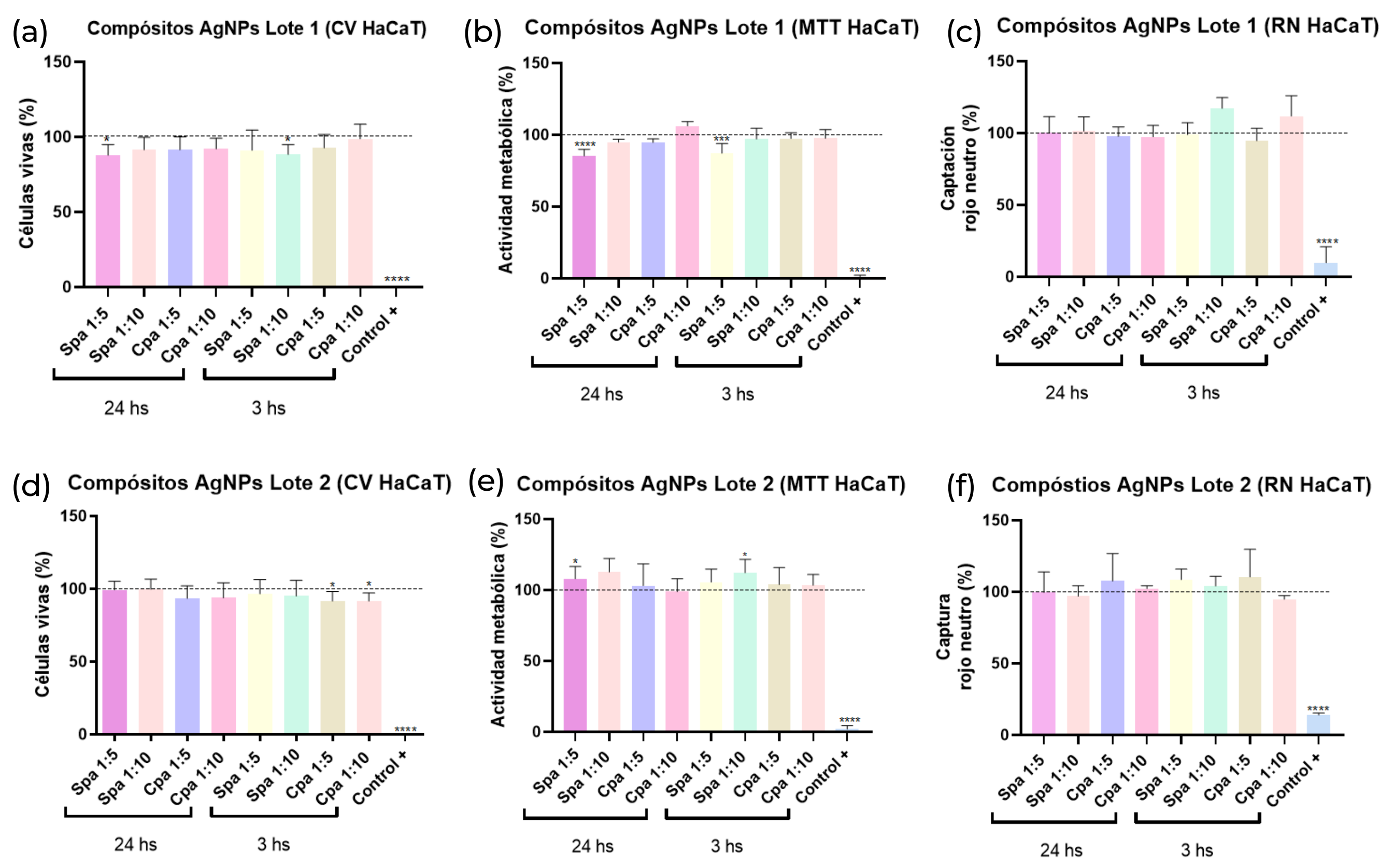


Gráfico 3.4. Ensayos de toxicidad de las distintas condiciones de los compósitos nanotecnológicos con AgNPs Lote 1 y Lote 2 sobre HaCaT. (a) Citotoxicidad por cristal violeta. (b) Actividad metabólica por el método de reducción de MTT. (c) Captura de rojo neutro. (d) Citotoxicidad por cristal violeta. (e) Actividad metabólica por el método de reducción de MTT. (f) Captura de rojo neutro. Los datos se muestran como $\pm$ DE (n=32), *p<0,05, ****p<0,0001.

Comparando los resultados obtenidos en los ensayos realizados con concentraciones crecientes AgNPs, con los realizados con los compósitos nanotecnológicos tanto los del Lote 1 como del Lote 2, se observa esta diferencia en la toxicidad de las NPs. Esto confirma que el sistema *delivery* utilizado en la encapsulación de las AgNPs, actúa como barrera disminuyendo la toxicidad de las mismas, haciendo que al encontrarse fuera del sistema sean altamente tóxicas.

Estos resultados proporcionan información importante en cuanto a que las AgNPs Lote 2 integradas al sistema *carrier*, disminuyen en gran medida su toxicidad sobre la línea celular HaCaT y 3T3, evitando producir cambios significativos sobre la viabilidad celular, al igual que sucede con las del NPMs Lote 1.

Una vez realizado los ensayos que determinaron los efectos toxicológicos de los compósitos nanotecnológicos sobre las células que componen la piel, se prosiguió a realizar un análisis de la capacidad antimicrobiana de los mismos. A través de los ensayos microbiológicos se demostró el potencial antimicrobiano que poseen los nanocompósitos desarrollados. Esto se evidenció mediante la aparición de halos de inhibición que se originaron por la interrupción del crecimiento bacteriano sobre el medio de cultivo; lo que comprueba que la capacidad bactericida de las AgNPs en conjunto con los pa es eficaz para evitar la propagación de una bacteria durante el tratamiento de lesiones cutáneas. En la **Figura 3.8** se puede observar que, tanto para Cpa del Lote 1 y 2, hay una interrupción del crecimiento bacteriano. Los resultados también evidencian una expansión del halo cuando se trata de la condición Cpa 1:5, es decir aquella que posee una mayor proporción de emulsión con pa, mientras que para Cpa 1:10 el halo de inhibición disminuye. Por último, las condiciones Spa 1:5 y 1:10, que no presentan pa no generaron una inhibición del crecimiento bacteriano, lo cual confirma que las AgNPs en conjunto con los pa actúan restringiendo el crecimiento de *E. coli*.

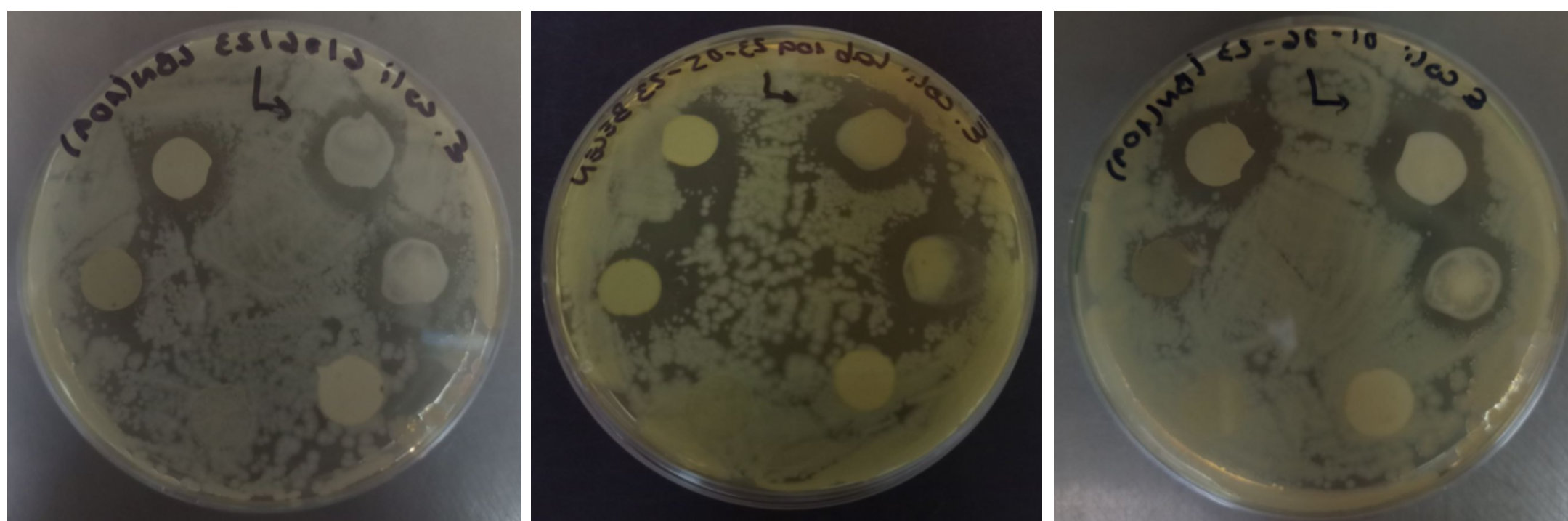


Figura 3.8. Resultados obtenidos para los ensayos de la capacidad antimicrobiana de los compósitos nanotecnológicos (n=3).

Los resultados obtenidos se condicen con estudios previos realizados en otro tipo de sistema *delivery*, como lo son los hidrogeles de colágeno, que conteniendo AgNPs siguen manteniendo su actividad antimicrobiana sobre diferentes cepas bacterianas [30].

Observando los resultados tanto de los ensayos toxicológicos en células eucariotas como los de capacidad antimicrobiana, se desprende la conclusión de que los compósitos nanotecnológicos presentan biocompatibilidad con las células que componen tanto la capa superficial como la más profunda de la piel, sin provocar efectos indeseables que desencadenen la pérdida de la viabilidad celular. Esto añadido a que la capacidad antimicrobiana de los nanocompósitos resulta ser eficaz, lleva a concluir que los mismos son óptimos para el tratamiento de lesiones cutáneas. Además de promover la regeneración celular por la acción de sus pa, evitará la complicación del cuadro clínico por la aparición de infecciones bacterianas, sin un potencial efecto tóxico que pueda desencadenar sobre las células de la zona a tratar.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN *IN VIVO*

4.1. Metodología empleada

Luego de realizar los ensayos *in vitro* se continuó con estudios de toxicidad en modelo *in vivo*, para evaluar la biocompatibilidad en un organismo completo, con sus órganos y su complejidad. La información proporcionada por los estudios toxicológicos en modelos *in vivo* considera información relevante, como las posibles consecuencias neurológicas, reproductivas, cardiovasculares y carcinogénicas causada por la administración de NPs [40]. Por tales motivos, es indispensable proceder con una caracterización *in vivo* de los compósitos nanotecnológicos para su evaluación de biocompatibilidad en células de la piel. En el presente trabajo se procedió a realizar ensayos toxicológicos en larvas de *zebrafish*. Los procedimientos realizados fueron aprobados por el comité de bioética.

4.1.1. Obtención de huevos fertilizados

Para la obtención del organismo modelo *zebrafish* se procedió a realizar el sexado. Aquellos peces que presentan una morfología mas alargada con una coloración amarillenta son características propias de un macho, mientras que una tonalidad más plateada y un abdomen abultado indica que se trata de una hembra, ya que aún posee los huevos que no fueron fecundados. Luego, los peces se separaron en canastas distintas dentro de una pecera de puesta, en donde tienen las condiciones propicias para que tenga lugar el desove. Al día siguiente al comenzar el ciclo de luz, se incorporaron los peces machos a las canastas de las hembras, las cuales cuentan con piedras que al rozar el abdomen de las hembras favorecen el desove. Esta especie comúnmente lleva a cabo la puesta de huevos en la orilla del río cuando está amaneciendo, y es por esto que se procedió a disminuir el nivel del agua hasta 3 cm por encima de las piedras para simular el entorno propicio para el desove. Finalmente, se dejó 1 hora para que ocurra la puesta y la posterior fecundación de los huevos (**Figura 4.1**).

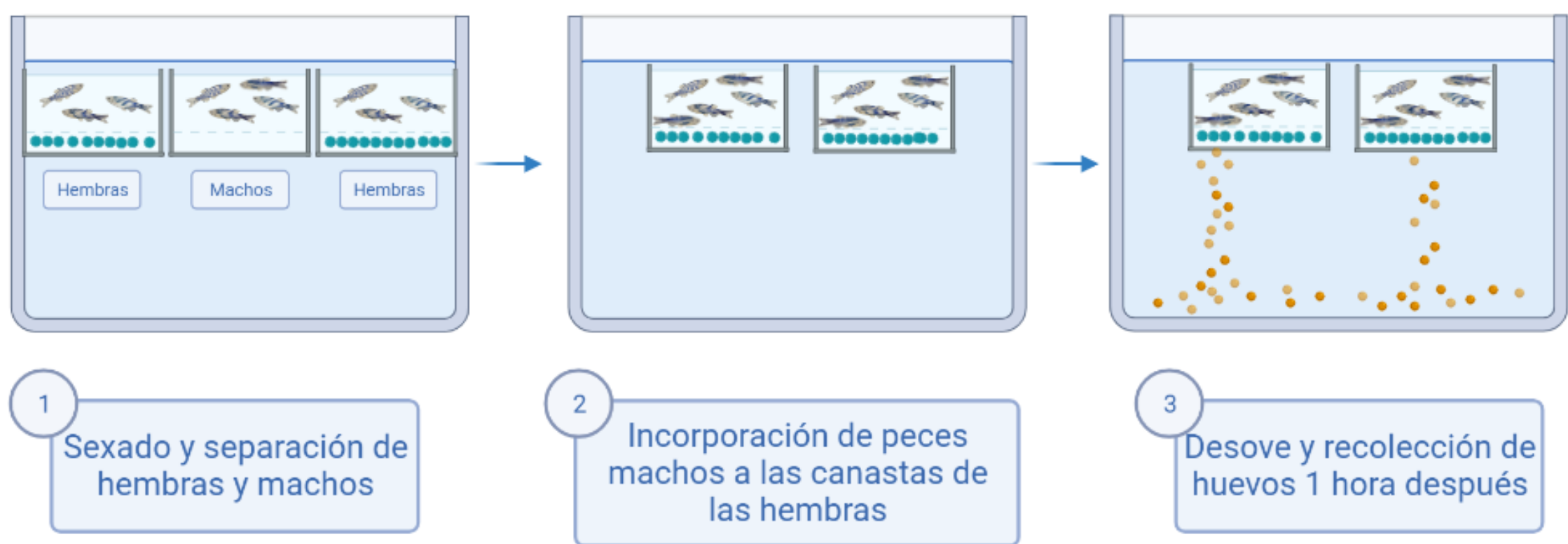


Figura 4.1. Procedimiento para la obtención de huevos fertilizados de *zebrafish*.

Se recolectaron los huevos y se los dejó por 4 hs en incubadora a 28°C para el fortalecimiento del corion. Se procedió a limpiar y a plaquear con medio E3 en placa de 6 wells los huevos fecundados que se encontraban en óptimas condiciones, y se los dejó en incubadora por 24 hs a 28°C. Se plaqueo en placa de 96 wells 3 huevos por pocillo adicionando 225 µL de medio E3. Se los dejó en incubación a 28°C por 4 días.

Se utilizaron como muestras las siguientes condiciones: Cpa 1:5 y Cpa 1:10 con las AgNPs del lote 1, Cpa 1:5 y Cpa 1:10 con las AgNPs del lote 2, Spa 1:5, Spa 1:10 y films de gelatina. En tubos eppendorf se añadieron 1,5 mL de medio E3, y se les incorporaron discos de 1 cm de diámetro de cada condición de los compósitos, previamente esterilizados por radiación UV por 2 min. Se los dejó incubando en estufa a 28°C durante 24 hs. Luego, se incubaron las muestras con el organismo modelo, adicionando 25 µL de cada condición quedando el siguiente orden de siembra: medio E3, Cpa 1:5 AgNPs lote 1, Cpa 1:10 AgNPs lote 1, Spa 1:5, Spa 1:10, Cpa 1:5 AgNPs lote 2, Cpa 1:10 AgNPs lote 2, film de gelatina; posteriormente se dejó en incubación por 4, 24 y 48 hs. A partir de este procedimiento se llevó a cabo la evaluación toxicológica de forma general y órgano-específica en larvas de *zebrafish* (**Figura 4.2**).

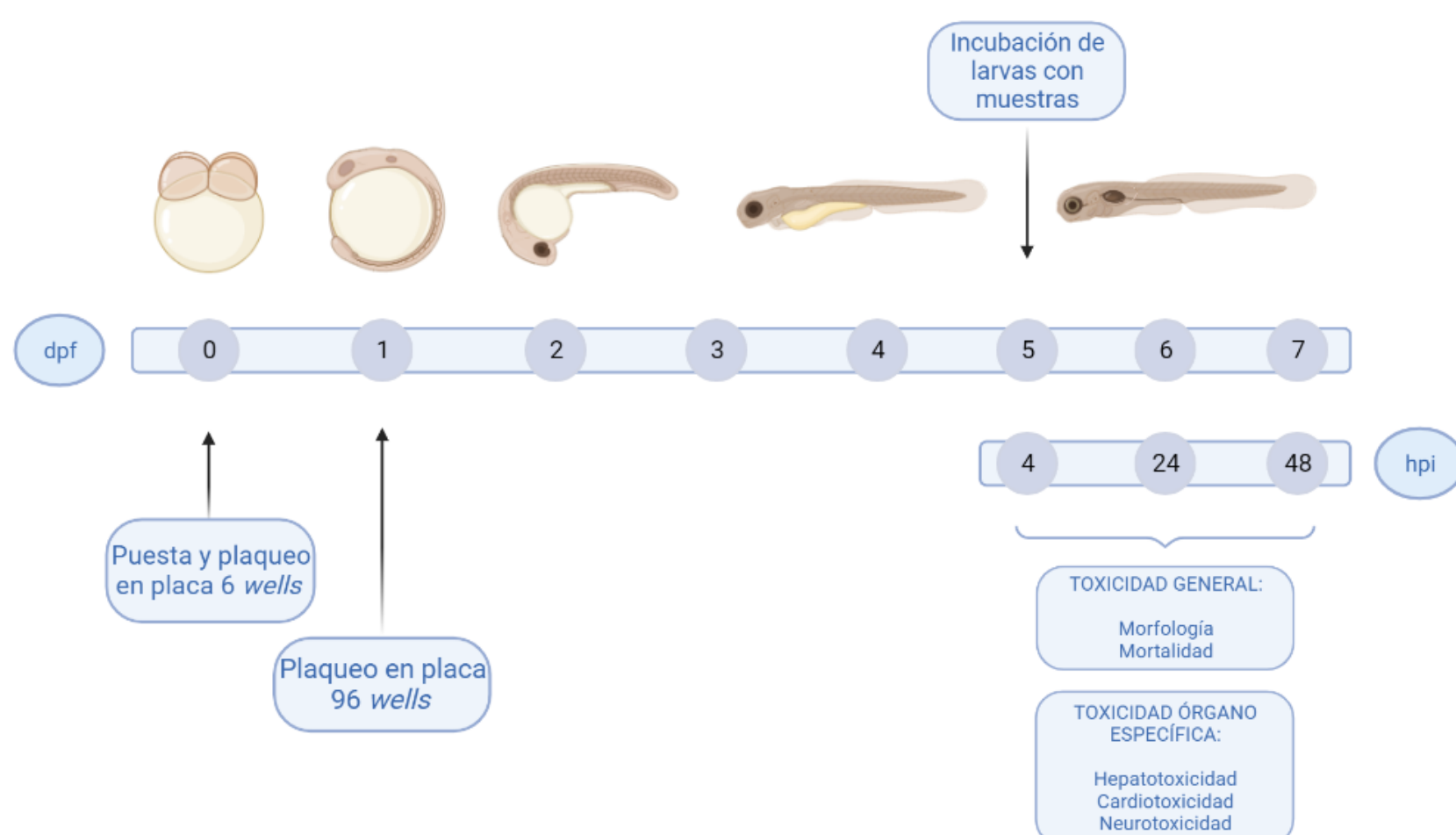


Figura 4.2. Flujo de trabajo para la evaluación de efectos toxicológicos en larvas de *zebrafish* como organismo modelo. Imagen adaptada de referencia [52].

4.1.2. Efecto toxicológico general

Una vez que se adicionaron las muestras en cada *well*, se procedió a evaluar la mortalidad a 4, 24 y 48 horas post-incubación (hpi). Utilizando una cámara Nikon SMZ800 acoplada a lupa binocular se contaron las larvas vivas y muertas de cada condición y se realizó una comparación respecto al control. Para este punto también se evaluaron los cambios morfológicos de las larvas a las 48 hpi con las diferentes muestras. Se seleccionaron cinco larvas al azar de cada condición y se las colocó en un portaobjetos, a cada uno se les adicionó una gota de carboximetilcelulosa de sodio (20 mg/L) para la inmovilización de la larva. Con la cámara digital del microscopio, se tomaron fotografías en un aumento 4X en posición dorsolateral, y se realizaron videos de 15 segundos en un aumento de 6,3X enfocando el corazón en la misma posición. Los cambios morfológicos se estudiaron por medio del análisis de las fotografías tomadas, siguiendo un sistema de puntuación numérica que determina el grado de alteración morfológica [54]:

- 0 (no hay alteración): se les asignaron este puntaje a larvas que no presentaron ningún cambio morfológico.
- 1 (alteración menor): se les asignaron este puntaje a larvas con 1 o 2 cambios morfológicos.
- 2 (alteración moderada): se les asignaron este puntaje a larvas con 3 o 4 cambios morfológicos.
- 3 (alteración elevada): se les asignaron este puntaje a larvas con más de 4 cambios morfológicos.
- 4 (alteración letal): se les asignaron este puntaje a larvas que no presentaron latidos cardíacos.

A cada una de las cinco larvas tomadas al azar se les asignó un puntaje de acuerdo al sistema descrito, y se analizó el nivel de toxicidad por medio del promedio de cambios morfológicos obtenidos para cada condición ensayada. Dichas alteraciones, se pueden manifestar de varias formas, afectando diversos órganos y tejidos (**Figura 4.3**).

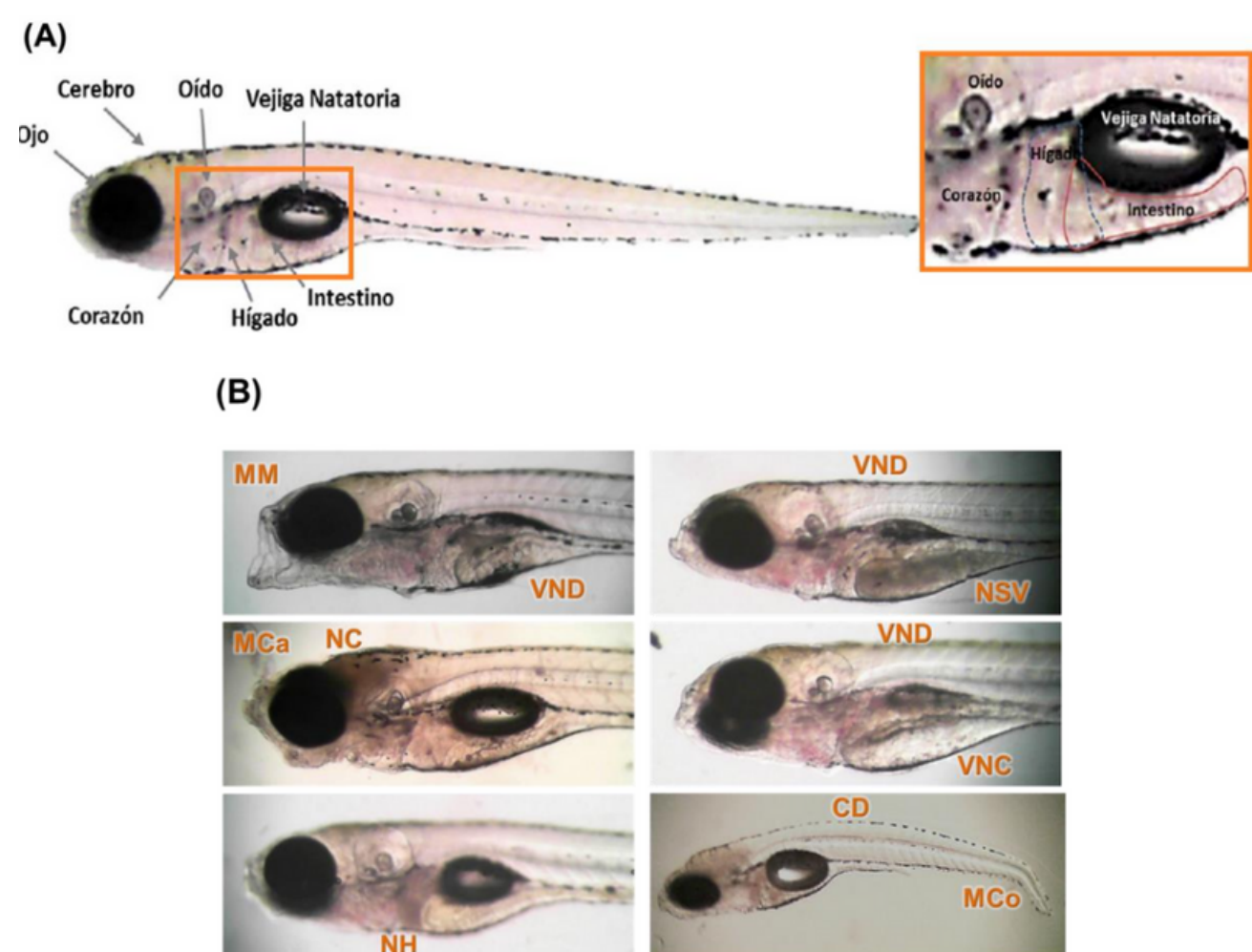


Figura 4.3. Vista dorsolateral de una larva de *zebrafish*. (A) Morfología de una larva control de 7 dpf. (B) Cambios morfológicos generados en larvas de 7 dpf. MM, malformación de mandíbula; VND, vejiga natatoria desinflada; NSV, necrosis del saco vitelino; MCo, malformación de cola; NH, necrosis hepática; CD, columna doblada; VNC, vitelo no consumido; NC, necrosis en la cabeza; VND, vejiga natatoria desinflada; NSV, necrosis del saco vitelino [54].

4.1.3. Efecto toxicológico órgano-específico

Los efectos neurotoxicológicos se estudiaron a 4, 24 y 48 hpi mediante la capacidad de locomoción del organismo modelo. El movimiento espontáneo de las larvas fue cuantificado durante 15 min a las diferentes hpi mediante el sistema de medición WMicrotracker, el cual está basado en un arreglo de haces infrarrojos que detecta la refracción de luz por la interrupción del haz generada por el movimiento del pez [60]. Por otro lado para llevar a cabo el análisis de la cardiotoxicidad, a partir de los videos tomados, con un contador manual se analizó el ritmo cardíaco contando los latidos durante 15 segundos, y se llevó a cabo 3 réplicas por cada larva de cada condición.

Los efectos de cardiotoxicidad también pueden presentarse mediante la formación de un edema pericárdico, lo cual se puede evidenciar por el desarrollo de inflamación ocasionada por la acumulación de líquido alrededor del corazón (**Figura 4.4**) [61].

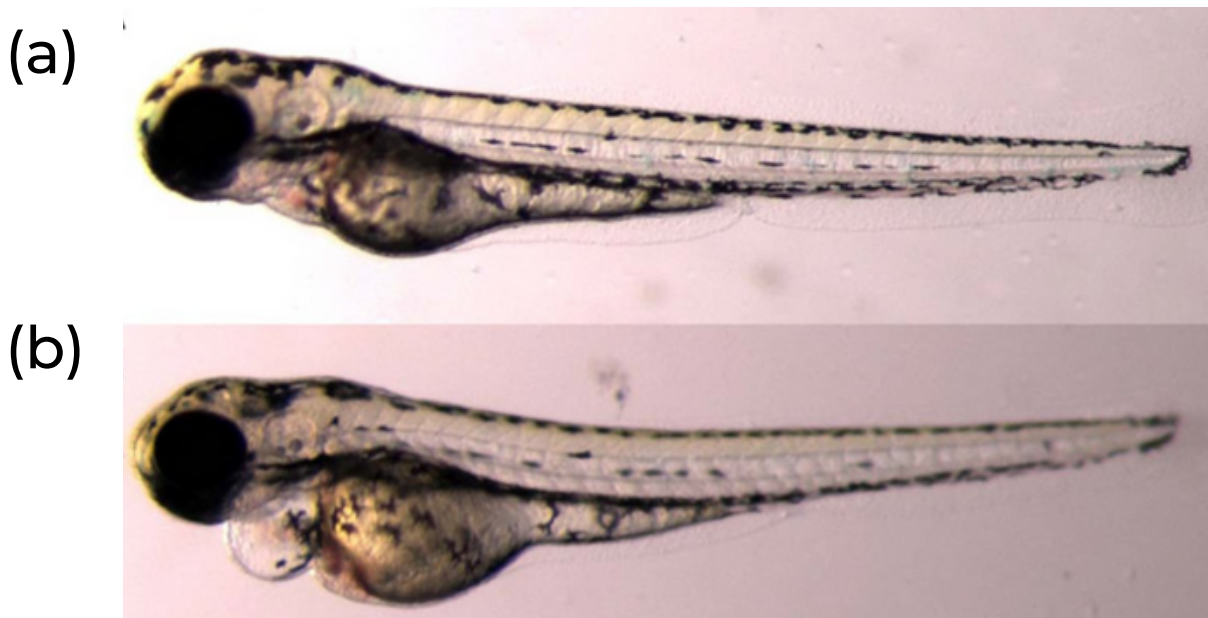


Figura 4.4. (a) Morfología de larva control de *zebrafish*.
(b) Morfología de larva de *zebrafish* que presenta un edema pericárdico [62].

Por último, en lo que respecta a la hepatotoxicidad, a partir de las mismas fotografías tomadas para el análisis de los cambios morfológicos, se ha realizado un estudio de las anomalías generadas en el hígado. Para esto, se evaluó la aparición de necrosis o degeneración del órgano, lo cual se evidencia por medio de la transición de un hígado claro y translúcido a uno opaco y oscuro (**Figura 4.5**) [54].

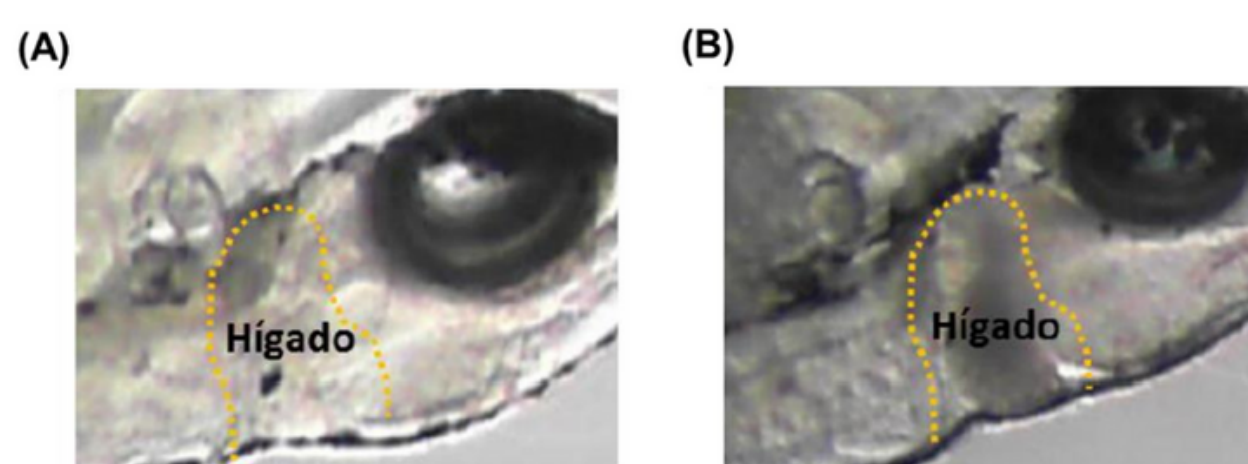


Figura 4.5. (A) Morfología de un hígado sano de larva control de *zebrafish*.
(B) Morfología del hígado de larva de *zebrafish* que presenta hepatotoxicidad [54].

4.1.4. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad órgano-específica, específicamente en el parámetro correspondiente al movimiento espontáneo y el ritmo cardíaco, fueron expresados como media $\pm$ desviación estándar (DE); el análisis estadístico de dichos resultados se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism* 8. Se procedió a identificar y a eliminar la presencia de *outliers* en los valores obtenidos de cada condición. Posteriormente, se utilizó la prueba de *One-Way ANOVA* siguiendo con el *test* de comparaciones múltiples de Dunnett [41].

4.2. Resultados y discusión

El porcentaje de viabilidad del organismo modelo tanto a 4 como a 24 y 48 hpi, no se vio alterado en las diferentes condiciones de compósitos nanotecnológicos; por lo cual se podría inferir en un principio, que la toxicidad de las muestras ensayadas es reducida, siendo NO LETAL para las larvas.

Luego se procedió a ensayar las muestras de compósitos con y sin pa. En el ensayo con los films de gelatina, a los cuales no se les incorporó la emulsión o/w con los pa, se observó un alto porcentaje de mortalidad a las 48 hpi en dicho organismo, haciendo que sea letal para las larvas. En lo que respecta al movimiento espontáneo, se pueden observar en el **Gráfico 4.1** los porcentajes obtenidos de dicho parámetro para las distintas muestras ensayadas.

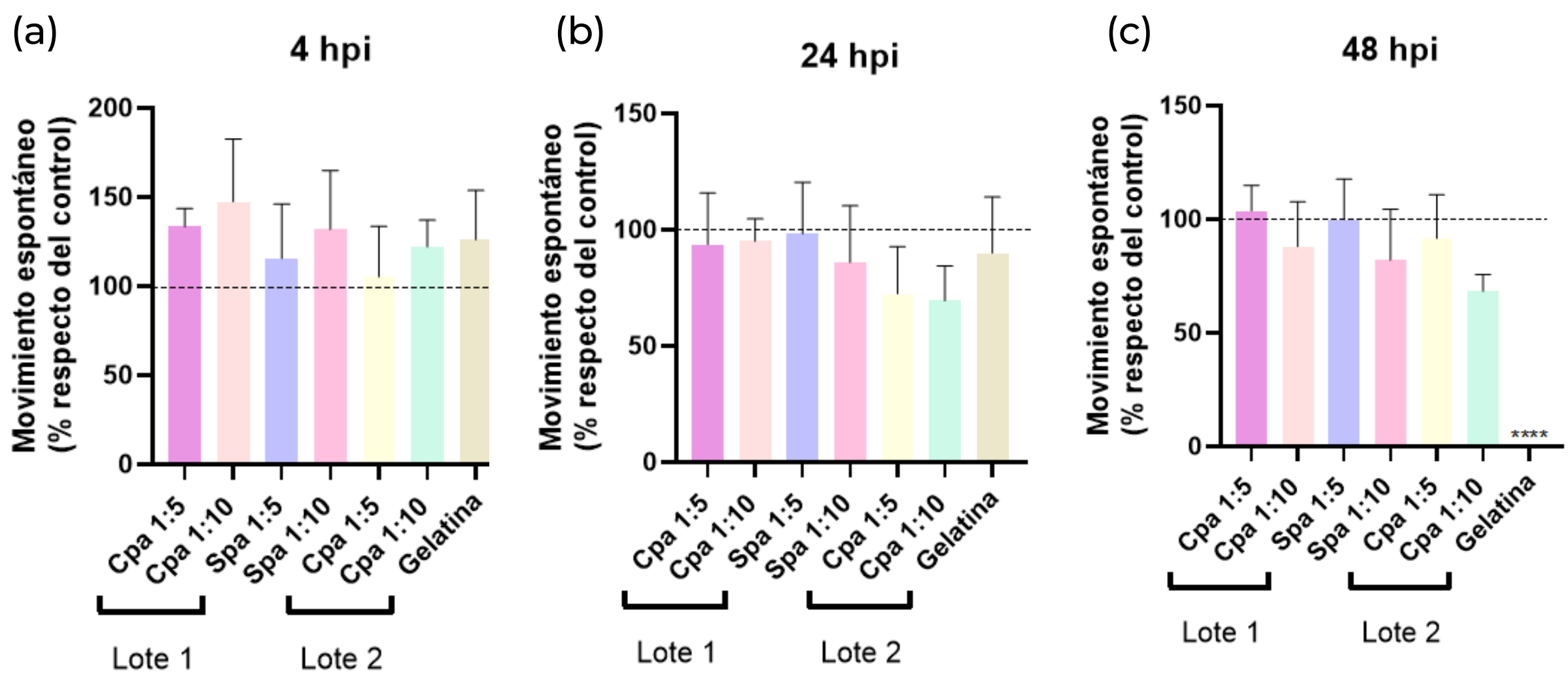


Gráfico 4.1. Neurotoxicidad reflejada en el movimiento espontáneo en larvas de *zebrafish* a 4, 24 y 48 hpi puede las muestras. Los datos se muestran como $\pm$ DE (Spa 1:5, Spa 1:10, gelatina n= 10; Cpa 1:5, Cpa 1:10 Lote 1 y 2 n=5), **** p<0,0001.

En los valores obtenidos en las distintas condiciones con respecto al control, no se observaron cambios significativos en los porcentajes de la actividad locomotora, por lo cual se puede deducir que las muestras ensayadas no ejercen un efecto neurotoxicológico sobre el organismo modelo. El único tratamiento que presenta una disminución significativa en el movimiento espontáneo, es el film de gelatina. Para este caso se logra evidenciar un efecto toxicológico sobre las larvas a las 48 hpi, llegando a perder su capacidad locomotora por completo; pero estos resultados, al incorporar la emulsión o/w en el film de gelatina, se alcanza a revertir este efecto.

Es importante remarcar que diversos estudios han demostrado que las medidas del movimiento espontáneo permite predecir el desarrollo de efectos neurotóxicos en larvas de *zebrafish*, ya sea si existe una disminución o un incremento en los valores de dicho parámetro; si los cambios morfológicos o la letalidad son descartados, puesto que la red neuronal de las larvas controla el sistema locomotor de las mismas, se podría adjudicar en un principio a un efecto neurotóxico [63].

En base a este criterio y a los resultados obtenidos, se puede deducir que las variaciones en el porcentaje del movimiento espontáneo con respecto al control no son significativos como para desarrollar efectos neurotoxicológicos en larvas de *zebrafish*.

En el **Gráfico 4.2**, se puede observar de forma resumida los cambios morfológicos generados de acuerdo al *scoring* asignado a cada larva para cada condición. Como se vio en apartados anteriores, un puntaje de 4 representa el grado de toxicidad mas alto, mientras que para los valores que rondan en un *scoring* de 1, la toxicidad atribuida es leve. Como se evidencia en dicho gráfico, las alteraciones que presentaron las larvas analizadas son menores, lo cual se condice con los resultados obtenidos en el movimiento espontáneo. Por otro lado, en lo que respecta a los films de gelatina, el 100 % de larvas ensayadas presentaron un *scoring* de 4, lo cual indica ausencia de latidos cardíacos, siendo letal para el organismo modelo; esto también reafirma lo obtenido en la actividad locomotora a 48 hpi.

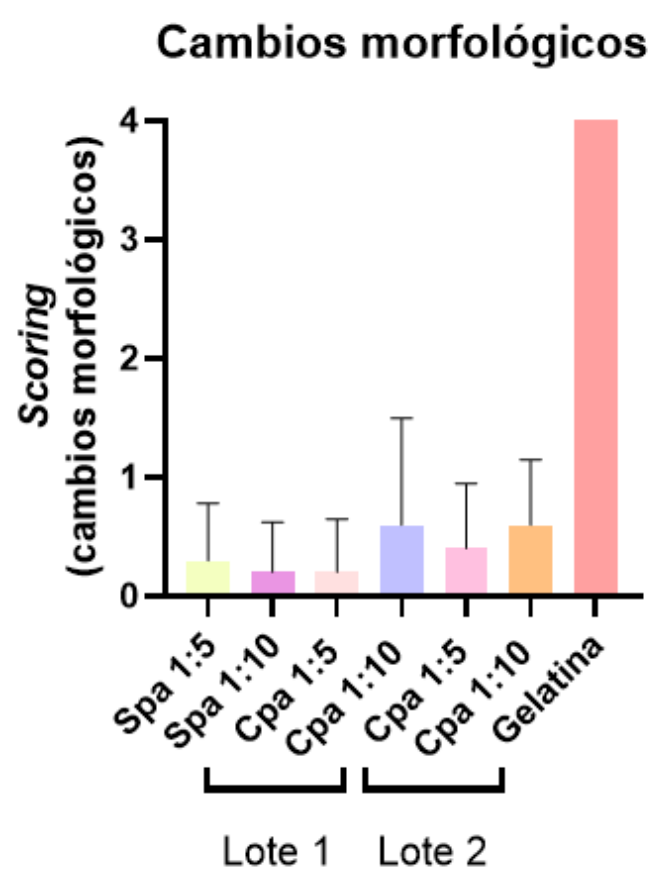


Gráfico 4.2. *Scoring* asignados en larvas de *zebrafish* para cada condición evaluada.

Luego, se procedió a evaluar la posible hepatotoxicidad de las muestras. Para ello, se observó el estado de necrosis del hígado en cada una de las larvas estudiadas. El 40 % de las larvas analizadas para Cpa 1:10 Lote 2 presentaron alteraciones en el hígado, mientras que para las condiciones de Cpa 1:5 y Cpa 1:10 Lote 1 fue de un 20 %, y un 10 % para Spa 1:5 y Spa 1:10. Esta transición de un hígado claro y translucido a uno opaco y oscuro indica el desarrollo de una necrosis hepática; teniendo en cuenta el bajo porcentaje que representa esta anomalía en la mayoría de las condiciones, se puede decir que las muestras no presentan una elevada hepatotoxicidad. En lo que respecta al tratamiento que presentó un 40 % de larvas con hígado necrosado respecto del total de larvas ensayadas, es necesario aumentar el número de réplicas para confirmar estos resultados (**Cuadro 4.1**). Por otro lado, si bien esta muestra parece estar indicando hepatotoxicidad, es fundamental resaltar que el objetivo de los nanocompósitos es su aplicación ectópica para el tratamiento de lesiones cutáneas.

	Cpa 1:5 Lote 1	Cpa 1:10 Lote 1	Spa 1:5	Spa 1:10	Cpa 1:5 Lote 2	Cpa 1:10 Lote 2
Total de larvas	5	5	10	10	5	5
Total de larvas con NH	1	1	1	1	-	2
Porcentaje	20 %	20 %	10 %	10 %	-	40 %

Cuadro 4.1. Porcentaje del total de larvas de *zebrafish* con necrosis hepática.

Una vez determinada la hepatotoxicidad de las muestras, se prosiguió a evaluar la cardiotoxicidad de las mismas mediante la presencia de edemas pericárdicos y alteraciones en el ritmo cardíaco con respecto al control.

En la **Figura 4.6** se puede evidenciar la presencia de un edema pericárdico en el 20 % de las larvas representativas de la condición Cpa 1:5 Lote 2 y en el 10 % de Spa 1:5. En primera instancia se podría decir que las muestras no son cardiotóxicas, pero para poder confirmar esto se comprobó la ausencia de variaciones en los latidos del corazón de las larvas.

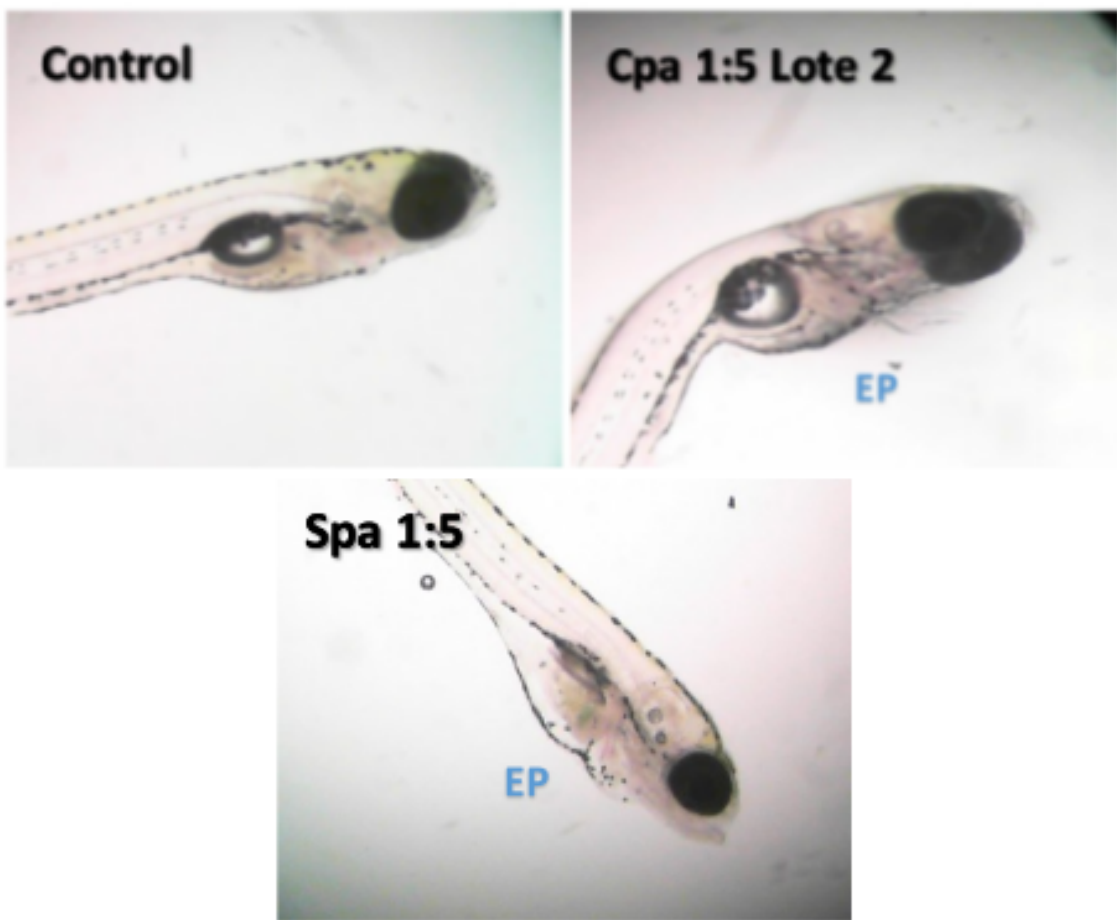


Figura 4.6. Formación de edema pericárdico en larvas tratadas con las muestras Cpa 1:5 Lote 2 y Spa 1:5.

En el **Gráfico 4.3**, se logra evidenciar que la frecuencia cardíaca de las larvas no se vio afectada en la mayoría de las condiciones con respecto al control; lo que indicaría que estas muestras ensayadas no presentan cardiotoxicidad en este organismo modelo.

En Cpa 1:5 Lote 2 se logra observar una disminución con respecto al control en el porcentaje del ritmo cardíaco, lo cual se condice con la presencia del edema pericárdico que dio como resultado dicha alteración. Por otro lado, la muestra correspondiente al film de gelatina, se observó que el porcentaje del ritmo cardíaco disminuyó drásticamente con respecto al control. Este decrecimiento se condice con el valor de *scoring* asignado en los cambios morfológicos, el cual representa ausencia de latidos cardíacos en las larvas ensayadas. Nuevamente, se logra observar que este resultado obtenido para la muestra de gelatina, es revertido al incorporar la emulsión, sea que la misma tenga o no, los pa.

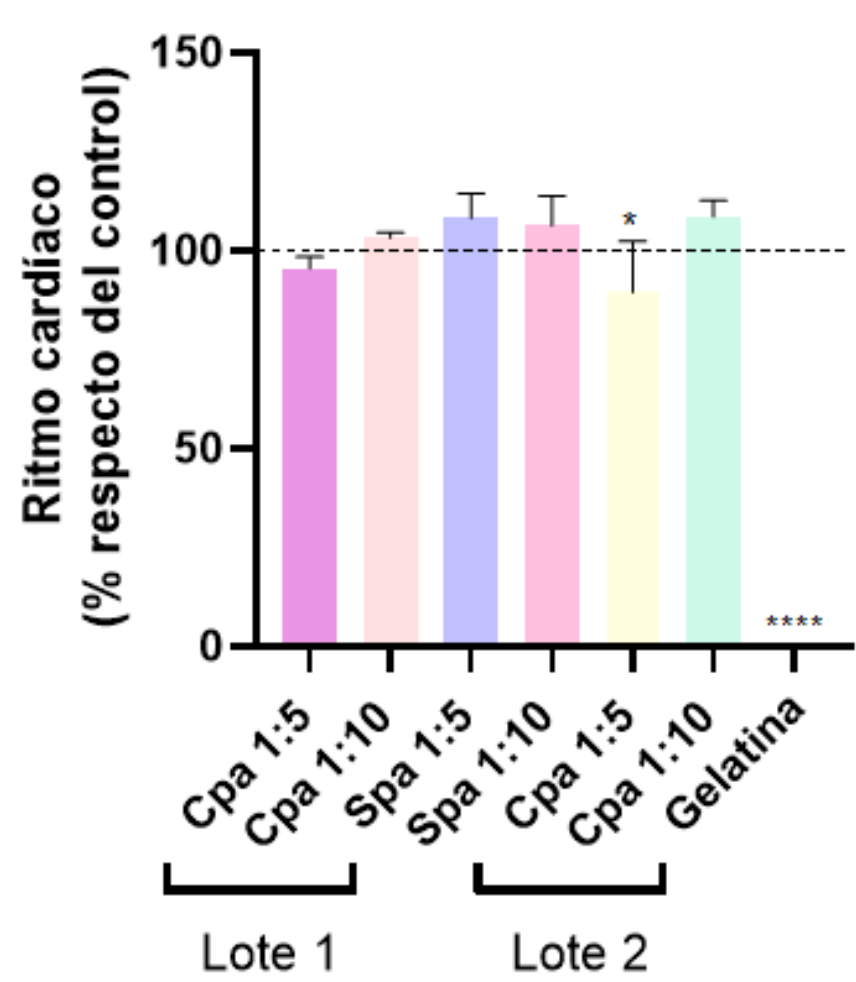


Gráfico 4.3. Ritmo cardíaco con respecto al control en larvas de *zebrafish* a 48 hpi de las muestras. Los datos se muestran como $\pm$ DE (Spa 1:5, Spa 1:10, gelatina n= 10; Cpa 1:5, Cpa 1:10 Lote 1 y 2 n=5), *p<0,05 , ****p<0,0001.

En un principio se propuso realizar un análisis de la viabilidad y la presencia de los cambios morfológicos en el organismo modelo para descartar la adjudicación de las alteraciones significativas a un efecto neurotóxico. En lo que respecta a la muestra de film de gelatina no se podría adjudicar la pérdida del porcentaje del movimiento espontáneo a un efecto neurotoxicológico, puesto que hubo una pérdida total del ritmo cardíaco en las larvas ensayadas, obteniendo un efecto letal para las mismas. Comparando los resultados obtenidos, observando esta importante diferencia entre las distintas condiciones y la muestra de film de gelatina, se podría decir que la incorporación de la emulsión o/w en dichos films, permite una mejora en la biocompatibilidad del sistema en este organismo modelo, contrarrestando este efecto letal que presenta la gelatina en los mismos.

Por otro lado, en estudios previos llevados a cabo en el laboratorio de Bio-Nanotecnología, se han probado tanto las AgNPs del Lote 1 como las del Lote 2 en concentraciones crecientes sin incorporarlas al sistema *delivery*, demostrando así que las NPs son altamente letales en larvas de *zebrafish* a partir de una concentración de 10 ppm. La comparación de lo obtenido en el análisis de los efectos toxicológicos, tanto de forma general como órgano-específica, con los nanocompuestos permitió evidenciar nuevamente que el sistema *carrier* utilizado, logran revertir de forma eficaz la toxicidad *per se* de las AgNPs.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES FINALES

Conclusiones y perspectivas a futuro

Los estudios realizados para la caracterización de emulsiones o/w revelaron que dicho sistema es ideal para la encapsulación de las distintas NPMs, asimismo para la contención de los pa favorecidos por la unión a la parte lipofílica de las emulsiones, lo que da como resultado la conservación de la biodisponibilidad en el sitio *target* a tratar. Esto promoverá de forma eficaz la cicatrización y regeneración celular del tejido dañado por la acción de las vitaminas A y E, la sulfadiazina y lidocaína.

Los ensayos de toxicidad realizados sobre las distintas líneas celulares representativas de las capas de la piel, mostraron que el sistema *delivery* que conforma a los compósitos nanotecnológicos resultan ser una buena barrera para la disminución de la toxicidad que las AgNPs presentan sobre las células eucariotas. Esto se observó al ensayar las AgNPs, sin incorporarlas al sistema *carrier*, en diferentes concentraciones, lo cual impactó considerablemente sobre la viabilidad celular. Mientras que al realizar los ensayos con las NPs incorporadas a los nanocompósitos se revirtió de forma exitosa esta elevada toxicidad que presentaban las mismas, haciendo que sean biocompatibles con las líneas celulares que componen a la piel. Por otro lado, los nanocompósitos, además de ofrecer una protección para la zona lesionada, mediante los estudios microbiológicos se concluyó que la capacidad bactericida de los mismos es eficiente, lo que ayudará así a controlar posibles infecciones producidas por patógenos que pueden encontrarse en la piel y que podrían generar lesiones crónicas.

Mediante los estudios efectuados en *zebrafish* para la evaluación de la toxicidad órgano-específica y general, se puso en evidencia que los compósitos nanotecnológicos no generaron efectos severos ni letales sobre el organismo modelo. Por otro lado, las larvas ensayadas con el tratamiento de film de gelatina exhibió un efecto letal para las mismas. Es importante destacar que este decremento en la viabilidad del organismo al ensayar los films de gelatina, se ve corregida cuando se incorpora la emulsión o/w. Esto puede deberse a una mejora de la estructura inicial del polímero, lo cual favorece como resultado, las propiedades mecánicas y de permeabilidad del nanocompósito. Por último, el sistema *carrier* que conforma al producto final, cuenta con la ventaja de prevenir la desestabilización de las AgNPs frente a factores fisicoquímicos, puesto que las mismas pueden oxidarse haciendo que pierdan su funcionalidad.

Finalmente, para ampliar la caracterización de los compósitos nanotecnológicos, se proponen como perspectivas futuro: aumentar el número de ensayos de toxicidad sobre el modelo de *zebrafish* y estudiar la cicatrización en mamíferos como organismo modelo.

Bibliografía

- [1] Llorente, B., Carlos, Junquera, C., Elena, Gago, M., José Ángel, Domingo, S., Pedro Amelio (2009). Nanociencia y nanotecnología: Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro (pp. 20,22). Fundación española para la Ciencia y la Tecnología.
- [2] Angelomé Paula, Angelomé C. Juan (2019). Nanotecnología en la industria de la construcción. 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : FODECO.
- [3] Borja M. Johnny, Rojas-Oviedo S. Byron (2020). *Nanomateriales: métodos de síntesis*. Pol. Con. (Edición núm. 48) Vol. 5, No 08.
- [4] Coppo JA. 2009. Nanotecnología, medicina veterinaria y producción agropecuaria. Rev. Vet. 20: 1, 61–71.
- [5] Gómez, Arley (2017). Nanomedicina y su impacto en la práctica médica. Repertorio de medicina y cirugía, 26(3), p. 129-130.
- [6] Moreno S. Minerva (2017). Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos. Departamento de química orgánica y química técnica.
- [7] Morel Andrea. Clasificación de nanomateriales.
- [8] Eréndira Santana Suárez, Bryan Daniel Herrera Lozada, Enrique Cuauhtémoc Samano Tirado (2020). Nano: el futuro entre átomos.
- [9] Rai M, Yadav A, Gade A. *Silver nanoparticles as a new generación of antimicrobials*. Biotechnol Adv. 2009 Jan-Feb;27(1):76-83.
doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002. Epub 2008 Sep 30. PMID: 18854209.
- [10] Díaz, P., Marco (2013). Síntesis de nanopartículas de plata biológicamente asistida con *Opuntia* sp. y su incorporación en membranas poliméricas nanofibrosas (p. 14). Centro de investigación en química aplicada.
- [11] Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MMQ. Partículas de nanoplata en aplicaciones médicas: síntesis, rendimiento y toxicidad. Int J Nanomedicina . 2014;9(1):2399-2407
<https://doi.org/10.2147/IJN.S55015>
- [12] Kahru, A., & Dubourguier, H. C. (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. Toxicology, 269(2–3), 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.016>
- [13] Moritz Michal, Moritz Malgorzata (2013). The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles, (pp. 596-613), Chemical Engineering Journal.

- [14] Betancur Henao, Claudia Patricia, Hernández Montes, Vanessa, & Buitrago Sierra, Robison. (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(4), 387-402.
- [15] Verma A, Stellacci F. *Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. Small*. 2010 Jan;6(1):12-21. doi: 10.1002/smll.200901158. PMID: 19844908.
- [16] González Adela, García Ana (2020). *Silver nanoparticles as antibacterial agents in bone tissue infections*. *FarmaJournal*, Vol. 5, núm. 1 (pp. 27-36).
- [17] Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, Galdiero M. *Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. Molecules*. 2015 May 18;20(5):8856-74. doi: 10.3390/molecules20058856. PMID: 25993417; PMCID: PMC6272636.
- [18] López, Anthony, Herazo, Katherine, & Sotomayor, Reinaldo G.. (2019). Diseño y desarrollo de un sistema de entrega de fármaco autoemulsificable líquido de ibuprofeno incorporado por el método de adsorción por portador en una forma farmacéutica sólida (comprimidos). *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas* , 48 (3), 589-614. Epub 03 de noviembre de 2020. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n3.84960>
- [19] Huck Iriart, Cristián. (2013-11-20). *Propiedades fisicoquímicas de microemulsiones estabilizadas con caseinato de sodio*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- [20] Ochoa-Anaya G, Aguirre-Ibarra CP, Franco-Cabrera M. Lidocaína: aspectos generales y nuevas implicaciones en la inflamación. *Rev Mex Anest*. 2017;40 (3):220-225.
- [21] Llopis-González A, Rubio-López N, Pineda-Alonso M, Martín-Escudero JC, Chaves FJ, Redondo M, Morales-Suarez-Varela M. *Hypertension and the fat-soluble vitamins A, D and E. Int J Environ Res Public Health*. 2015 Mar 4;12(3):2793-809. doi: 10.3390/ijerph120302793. PMID: 25749317; PMCID: PMC4377933.
- [22] Javad Tavakoli. *Physico-mechanical, morphological and biomedical properties of a novel natural wound dressing material. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2017;373-382.
- [23] Arredondo Peñaranda, Alejandro & Londoño López, Marta Elena. (2009). Hidrogeles: potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica* , 3 (5), 83-94. Recuperado el 13 de abril de 2023.
- [24] Ruiz T. David (2021). *Hidrogeles basados en polisacáridos para aplicaciones biomédicas*. Universidad del País Vasco.
- [25] Ramirez, Arnaldo, Benítez, José Luis, Rojas de Astudillo, Luisa, & Rojas de Gáscue, Blanca. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36(2), 108-130.

- [26] Phakawat Tongnuanchan, Sootawat Benjakul, Thummanoon Prodpran. *Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants*. Food Hydrocolloids 41 (2014) 33-43
- [27] Anne Duconseille, Thierry Astruc, Naira Quintana, Filip Meersman, Veronique Sante-Lhoutellier. *Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review*. Food Hydrocolloids 43 (2015) 360-376
- [28] Valencia-Gómez, L.E., Martel-Estrada, S.A., Vargas-Requena, C.L., Rodriguez-González, C.A., & Olivas-Armendariz, I.. (2016). Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. Revista mexicana de ingeniería biomédica, 37(3), 235-249. <https://doi.org/10.17488/rmib.37.3.4>
- [29] Patiño A. Angélica, Morales A. Camilo. Microbiota de la piel: el ecosistema cutáneo. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2013; 21: 2 (Abril-Junio), 147-158
- [30] Antezana PE, Municoy S, Pérez CJ, Desimone MF. Hidrogeles de Colágeno Cargados con Nanopartículas de Plata y Aceite de Cannabis Sativa. antibióticos _ 2021; 10(11):1420. <https://doi.org/10.3390/antibióticos10111420>
- [31] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2015). *Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales*.
- [32] Balam Muñoz Soto Rodrigo (2018). La nanotoxicología y el uso de la nanotecnología en el diagnóstico molecular. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).
- [33] Pérez Albaladejo Elisabet (2017). Uso de líneas celulares como modelos *in vitro* para la evaluación de toxicidad y mecanismos de acción de contaminantes ambientales. Departamento de química ambiental.
- [34] Fernández González A, Lizana Moreno AM, de Pablos Ramos MM, Ruiz García A, Espinosa Ibáñez O, Fernández Porcel Net al. *Optimization of human keratinocyte culture to develop an artificial human skin model: cell alternatives as feeder layer of Advanced Therapies*. Actual. Med. 2016; 101: (798): 85-94 DOI: 10.15568/am.2016.798.or04
- [35] Alitalo K, Kuismanen E, Myllylä R, Kiistala U, Asko-Seljavaara S, Vaheri A. *Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells*. J Cell Biol. 1982 Sep;94(3):497-505. doi: 10.1083/jcb.94.3.497. PMID: 6182145; PMCID: PMC2112228.
- [36] D'Aiuto, Natali, Hochmann, Jimena, Sotelo-Silveira, José, Bologna-Molina, Ronell, & Arocena, Miguel. (2022). Estudio de los efectos de un microambiente hipóxico en queratinocitos humanos in vitro y su correlato con alteraciones del microambiente en la patología de liquen plano oral. Odontoestomatología, 24(40), e223. Epub 01 de diciembre de 2022. <https://doi.org/10.22592/ode2022n40e223>

- [37] Blázquez-Castro, Alfonso & Juarranz, Angeles & Sanz-Rodriguez, Francisco. (2011). Modulación de la proliferación de queratinocitos humanos por especies reactivas de oxígeno generadas mediante tratamiento fotodinámico.
- [38] Dulce María del Carmen Delgadillo Álvarez. (2021). *Cell cultures: historical reduction in the use of laboratory animals*. Revista Fesahancccal, vol. 7, Num. 1 17-24 ISSN: 2448-7252
- [39] Fernández González, Ana; Lizana Moreno, Antonio Manuel; De Pablos Ramos, María del Mar; Ruíz García, Antonio; Espinosa Ibáñez, Olga; Fernández Porcel, Natividad; Guerrero Calvo, Jorge; Arrabal, Miguel; López-Carmona, F.; Arias-Santiago, Salvador. Optimización del cultivo de queratinocitos humanos para el desarrollo de un modelo de piel artificial humana: alternativas celulares como capa alimentadora. Actualidad médica, ISSN 0365-7965, T. 101, N°. 798, 2016, págs. 85-94
- [40] Lozano-Velasco, Estefanía & Ruiz Estrada, Amalia & Marín, Marta. (2017). Nanotoxicidad en los tiempos de la nanotecnología. SEBBM. 2017. 192.
- [41] Daniela E. Igartúa, Carolina S. Martinez, C. Facundo Temprana, Silvia del V. Alonso, M. Jimena Prieto, *PAMAM dendrimers as a carbamazepine delivery system for neurodegenerative diseases: A biophysical and nanotoxicological characterization*, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 544, Issue 1, 2018, Pages 191-202, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.032>.
- [42] García Franco, Susana Nora. (2003). Citotoxicidad y genotoxicidad de dos extractos naturales (p. 44). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- [43] Badr Mohamed (2012). *The ribosome-inactivating protein gelonin and parts thereof to be employed for a potential treatment of cancer* (p. 31).
- [44] López-Peropadre Ana. (2014). Estudio *in vitro* de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes.
- [45] Campos Maira, Guerrero Luis, Ancona David (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (p. 51).
- [46] Vargas-Vargas, Rafael Antonio. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. Anestesia en México, 29 (Supl.1), 86-96.
- [47] Valiña Gerpe Claudia (2020). Revisión bibliográfica: El pez cebra como organismo modelo para el estudio del Síndrome Alcohólico Fetal.
- [48] Panzica-Kelly JM, Zhang CX, Danberry TL, Flood A, DeLan JW, Brannen KC, Augustine-Rauch KA. *Morphological score assignment guidelines for the dechorionated zebrafish teratogenicity assay*. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010 Oct;89(5):382-95. doi: 10.1002/bdrb.20260. PMID: 20836125.

- [49] Bortagaray, Viviana & Rodríguez-Ithurralde, Daniel. (2013). Evaluación de las propiedades embriotóxicas y teratogénicas de herbicidas a base de glifosato mediante el bioensayo de toxicidad embrio-larval en pez cebra (*Danio rerio*).
- [50] Howe K et al.. *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome*. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):498-503. doi: 10.1038/nature12111.
- [51] Steven Cassar, Isaac Adatto, Jennifer L. Freeman, Joshua T. Gamse, Iñaki Iturria, Christian Lawrence, Arantza Muriana, Randall T. Peterson, Steven Van Cruchten y Leonard I. Zon *Investigación química en toxicología* 2020 33 (1), 95-118
DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00335
- [52] C. S. Martinez, D. E. Igartúa, I. Czarnowski, D. A. Feas, S. del V. Alonso, M. J. Prieto (2019). *Biological response and developmental toxicity of zebrafish embryo and larvae exposed to multi-walled carbon nanotubes with different dimension*.
- [53] Guijin Sun, Kechun Liu, *Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos*, *Aquatic Toxicology*, Volume 192, 2017, Pages 165-170, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.020>.
- [54] Igartúa, D. E. (2019). Nanotecnología Farmacéutica basada en Dendrímeros aplicada al tratamiento del Alzheimer. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina.
- [55] De la Cruz Rocha, Edwin, Figueredo, Luisa Paola, Gómez, Johana, Jiménez, Idalith, Montes, Ilinka, Roca, Sergio, & Vergel, Gabriela. (2012). Comparación del efecto citotóxico de tres agentes quelantes sobre fibroblasto del ligamento periodontal humano. Estudio *in vitro*. *Revista Salud Uninorte*, 28(3), 402-410. Retrieved May 28, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522012000300007&lng=en&tlng=es.
- [56] José A. García Rodríguez Rafael Cantón J. Elías García Sánchez M^a Luisa Gómez-Lus Luis Martínez Martínez Carmen Rodríguez-Avil Jordi Vila. Procedimientos en microbiología clínica: métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.
- [57] Elda María del Rocío Coutiño, Lucerito Ávila Lagunes, Omar Arroyo Helguera. Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 36(2):39-54, 2017
- [58] Yepes Acevedo Natalia. (2019). Evaluación de la biocompatibilidad y aplicabilidad de un material compuesto en un liner protésico de miembro inferior.
- [59] Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. *The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells*. *Toxicol Lett*. 2008 Jul 10;179(3):130-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.04.015.

- [60] Feas, DA, Igartúa, DE, Calienni, MN et al. Emulsión nutracéutica que contiene ácido valproico (NE-VPA): un sistema de administración de fármacos para la reversión de las convulsiones en el modelo de epilepsia de larvas de pez cebra. *Revista de Investigación Farmacéutica* 47 , 429–437 (2017). <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0316-x>
- [61] Wiegand J, Avila-Barnard S, Namarugommula C, Lyons D, Zhang S, Stapleton HM, Volz DC. *Triphenyl phosphate-induced pericardial edema in zebrafish embryos is dependent on the ionic strength of exposure media*. *Environ Int.* 2023 Feb;172:107757. doi: 10.1016/j.envint.2023.107757. Epub 2023 Jan 16. PMID: 36680802; PMCID: PMC9974852.
- [62] Scherz, P.J., Huisken, J., Sahai-Hernandez, P., and Stainier, D.Y. (2008) *High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function*. *Development* (Cambridge, England). 135(6):1179–1187.
- [63] Daniela Edith Igartúa, Pamela Liliana Azcona, Carolina Soledad Martinez, Silvia del Valle Alonso, Verónica Leticia Lassalle, María Jimena Prieto, *Folic acid magnetic nanotheranostics for delivering doxorubicin: Toxicological and biocompatibility studies on Zebrafish embryo and larvae*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 358, 2018, Pages 23–34, ISSN 0041-008X, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.009>.