



**UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI**

ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEUROTOXICOS  
INDUCIDOS POR LA EXPOSICION ORAL  
CRONICA A LAS NANOPARTICULAS DE PLATA  
EN RATAS SPRAGUE DAWLEY

Andrés Alarcón López

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGIA

Tutor académico: Jordi Blanco Pérez, Grado de Medicina, Fisioterapia e Ingeniería Biomédica, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, [jordi.blanco@urv.cat](mailto:jordi.blanco@urv.cat)

En cooperación con: Unidad de Fisiología URV,

Supervisor: Ricardo Román Cordero Otero, Grado Biotecnología, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, [ricardo.cordero@urv.cat](mailto:ricardo.cordero@urv.cat)

15/07/2020

André Alarcón López

S3652941C

Jo, "Nom i cognoms", amb DNI "XXXX", sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 09 de 07 de 2020



(signatura)

# Índice

1. Datos del centro.....	4
2. Resumen .....	4
3. Introducción .....	5
3.1. Nanomateriales.....	5
3.2. Nanopartículas de plata .....	7
3.3. Vías de exposición a las nanopartículas de plata .....	8
3.4. Pro-oxidación derivada de las nanopartículas de plata .....	9
3.5. Mecanismos de defensa contra el daño oxidativo .....	10
4. Hipótesis y objetivos .....	15
5. Materiales y métodos.....	16
5.1 Preparación de las nanopartículas de plata .....	16
5.2 Animales .....	16
5.3 Diseño experimental .....	16
5.4 Procesado de las muestras.....	17
5.5 Cuantificación de proteína.....	17
5.6 Determinación de enzimas antioxidantes .....	18
5.6.1 Catalasa .....	18
5.6.2 GPx.....	18
5.6.3 GR .....	19
5.7. Análisis Western Blot .....	20
5.7.1 Preparación de muestras .....	20
5.7.3 Transferencia.....	22
5.7.4 Inmunodetección.....	22
5.8. Estadísticas.....	23
6. Resultados.....	23
6.1 Evaluación de actividades del sistema enzimático antioxidante .....	23

6.2 Evaluación de la expresión proteica de MnSOD .....	25
6.3 Evaluación de la activación proteica de CREB y de la expresión de BDNF.....	26
7. Discusión .....	29
8. Conclusiones .....	32
9. Bibliografía.....	33
10. Autoevaluación .....	37

# 1. Datos del centro

Este trabajo fue realizado a partir de las practicas externas realizadas en la Unidad de Fisiología del departamento de Ciencias Médicas Básicas (DCMB) de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de Reus, Universitat Rovira i Virgili (URV). Tutorizadas por el Dr. Jordi Blanco. Iniciadas en junio de 2017 y finalizadas en julio de 2017.

## 2. Resumen

**Introducción:** Las **nanopartículas de plata** (AgNPs) son un producto cada vez más en auge y a día de hoy se usan en envases de alimentos, productos cosméticos o dentro del campo de la medicina. Múltiples fuentes relacionan las nanopartículas con generación de **ROS** y alteraciones en la correcta función celular. Existe incertidumbre sobre si la ingesta de este tipo de nanopartículas podría generar alteraciones sobre el sistema nervioso. Por este motivo, el objetivo principal de este estudio es evaluar cambios en marcadores de producción de ROS, y de proteínas fundamentales para la supervivencia y **viabilidad neuronal** en cerebro de **ratas** expuestas **oralmente** a diferentes concentraciones de AgNPs.

**Metodología:** La población de estudio se dividió en 4 grupos (n=6) de ratas machos que fueron expuestas vía gavage a 0, 50, 100 y 200 mg/kg/día de AgNPs durante 90 días. Posterior al periodo de tratamiento, se realizó la extracción de cerebro y se determinó la actividad enzimática del enzima catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPx), mediante espectrofotometría, y la expresión proteica de la superóxido dismutasa (MnSOD), la proteína de unión en respuesta a cAMP (CREB), CREB fosforilada y BDNF, mediante la técnica Western Blot. Se realizó un análisis estadístico de los datos para evaluar cambios significativos inducidos por la exposición de AgNPs, respecto al grupo control.

**Resultados:** No se encontraron diferencias significativas de las actividades enzimáticas de CAT, GR y GPx, aunque si se encontró una tendencia a la reducción de la actividad de CAT y un aumento de la actividad de GR y GPx en el grupo expuesto a 100 mg/kg/día. Tampoco hubo diferencias en los niveles de MnSOD respecto al grupo control. Sin embargo, si se observó un aumento dosis dependiente en los niveles de CREB fosforilado y BDNF.

**Conclusión:** Las AgNPs no generaron graves efectos neurotóxicos, aunque si generaron un aumento de la activación y expresión de los factores relacionados con el crecimiento, la supervivencia y la plasticidad neuronal como son CREB y BDNF. Este

aumento podría darse como respuesta a un incremento de leve de ROS, pero más estudios son necesarios para poder llegar a esta conclusión.

### 3. Introducción

#### 3.1. Nanomateriales

La comisión europea define a los nanomateriales o nanopartículas como un material natural, accidental o manufacturado que contiene partículas en estado libre, como un agregado o un conglomerado, del cual el 50% o más de las partículas tienen un tamaño entre 1-100 nm (1). Estas características hacen que sean extremadamente versátiles, llevándolos a ser catalogadas como el material del siglo XXI (2). Se estima que su volumen de facturación alcanzará un valor de mercado global de 55 billones de dólares para el 2022 (3).

Debido a su versatilidad y su superficie por área de volumen, los nanomateriales presentan una gran variedad de tipos de uso. Por ejemplo, en la industria alimentaria se utilizan nanopartículas como protección del empaquetado, debido a las propiedades antimicrobianas de algunos de sus materiales de composición. También se utilizan nanopartículas para lograr un aumento del sabor o encapsular sustancias orgánicas(4).

A nivel farmacéutico, las nanopartículas también están siendo utilizadas para la liberación de compuestos de forma específica en los tejidos diana, permitiendo incluso que ciertos compuestos puedan atravesar la barrera hematoencefálica. (2,3). Otra área importante de aplicación de las nanopartículas engloba el desarrollo de técnicas dentro del ámbito de la biotecnología, siendo estas fundamentales en procesos de regeneración tisular o en la ingeniería de tejidos. Por ejemplo, se ha observado que las nanopartículas de oro aumentan la proliferación de células del tejido óseo y la diferenciación de las células hematopoyéticas a osteoclastos, llegando incluso a ser un posible sustituto al uso de proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (5).

Existen múltiples tipos de nanopartículas, entre estas destacan:

- Nanopartículas de carbono

Son formadas átomos de carbono en forma pentagonal o hexagonal, generalmente dispuestos como una hoja que posteriormente adopta una forma tubular o esférica. Se caracterizan por su conductividad eléctrica, alta fuerza y por su versatilidad. También se clasifican según el número de "hojas" que contienen pudiendo ser simple, dobles, múltiples y se usan comercialmente como filtros o refuerzos. (6)

- Nanopartículas de cerámica

Son partículas sólidas. Se forman mediante calentamiento e enfriamiento. Tienen una gran variedad de formas (densas, porosas, huecas o policristalinas) y son valoradas por su alta resistencia a la temperatura y su baja reactividad. Actualmente se está estudiando su uso como catalizadores, fotodegradadores de tintes o herramientas para visualizado en software. (7)

- Nanopartículas de metal

Son nanopartículas formadas a partir de metales. Su principal atractivo recae en su resonancia de superficie plasmática (SPR), que consiste en la excitación de los átomos por el campo electromagnético que la luz ejerce sobre estos. Un ejemplo de su aplicabilidad sería su uso en la obtención de imágenes SEM de alta calidad en el caso de las nanopartículas de oro. (6)

- Nanopartículas semiconductoras

Tienen propiedades que se hayan entre metales y no-metales. Su característica principal es que son funcionales en intervalos muy superiores a los semiconductores normales. Se utilizan principalmente en dispositivos eléctricos, como foto ópticos o fotocatalizadores. (6)

- Nanopartículas de polímeros

Son sistemas coloidales generalmente en forma de esfera sólida o de capsula. Se diferencian en que las esferas sólidas llevan la sustancia activa en la superficie o en el interior, mientras que las capsulas suelen estar rellenas de algún tipo de líquido que lleva la sustancia activa. Los polímeros pueden estar formados de sustancias naturales como el almidón o la quitina, o sustancias artificiales como el polietileno (PE) o la polivinilpirrolidona (PVP). Generalmente se utilizan para drug delivery ya que son asimiladas fácilmente por las células, tiene gran calidad de encapsulado y la capacidad de conservar las propiedades de la sustancia activa que contienen. (8)

- Nanopartículas lipídicas

Tienen formas esféricas en las cuales las moléculas lipofílicas envuelven a un centro activo lipídico, similar a una monocapa lipídica. Generalmente son utilizadas para el drug delivery de ciertos compuestos como por ejemplo el RNA en las terapias contra el cáncer. Para poder estabilizar la burbuja lipídica generalmente se hace uso de emulsionantes o surfactantes que se unen a la capa exterior.(6)

En este trabajo nos centraremos en nanopartículas compuestas de metal, concretamente en las nanopartículas de plata (AgNPs). (6)

### 3.2. Nanopartículas de plata

Actualmente hay una gran demanda de AgNPs debido principalmente a sus propiedades antibacterianas, dada su menor toxicidad en comparación con otros bactericidas. Por ejemplo, se ha observado que el uso de AgNPs es efectivo como antibiótico para tratar patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* o *Serratia marcescens* que hacen uso del quorum sensing o requieren de la formación de biofilms. (9). Debido a su variedad polimórfica, los usos de las AgNPs son múltiples en este campo de aplicación.

Hoy en día encontramos AgNPs como aditivos en los materiales de envasado de alimentos, los suplementos nutricionales, pinturas, los artículos textiles y electrónicos, los electrodomésticos, los cosméticos, prótesis médicas, los desinfectantes de agua, ambientadores en spray, y una gran variedad de productos de consumo cotidianos. Además, fuera de su uso como antibacteriano también son utilizadas a la hora de fabricar antenas, tinta imprimible para hacer dispositivos electrónicos o detección de proteínas mediante espectrometría líquida de electrones plasmático-atómica. (9)

Una de las características más importantes de las AgNPs se encuentra en su morfología, dado que esta modifica sus propiedades físicas (6). Las AgNPs pueden tener múltiples formas entre las cuales se incluyen, cúbicas, esféricas, estrelladas, cónicas o hexagonales.

Las AgNPs usualmente son tratadas con coatings para generar repulsiones electromagnéticas entre las nanopartículas, estabilizándolas y evitando así la formación de agregados. Los coatings suelen ser de tipo orgánico, como por ejemplo polisacáridos, proteínas o citratos, pero también pueden ser de tipo inorgánico como sulfitos, cloritos o carbonatos. Entre los distintos tipos de coatings los más comunes son los citratos y polivinilpirrolidona (PVP)(10).

Actualmente uno de los mayores dilemas que afronta el uso y aplicación de AgNPs es su seguridad sobre la salud en humana y el medio ambiente. La exposición a AgNPs por contaminación de alimentos y agua tras su liberación del material que lo contiene, podrían generar procesos de toxicidad tras ser asimilados. Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito las posibles alteraciones que una exposición crónica o aguda a

AgNPs podría generar sobre el correcto funcionamiento de los procesos homeostáticos. (2,3,6,10–12)

### 3.3. Vías de exposición a las nanopartículas de plata

Existen diferentes vías de exposición humana a AgNPs. La ingesta y posterior absorción a nivel intestinal representa la principal vía mediante la cual los humanos se encuentran expuestos a las AgNPs (3). No obstante, las AgNPs pueden ser también asimiladas por inhalación, por contacto dérmico o por su desprendimiento progresivo de prótesis y catéteres de uso clínico que contengan estas nanopartículas como aditivos.

Tras su absorción, las AgNPs entran al riego sanguíneo, en donde pueden distribuirse a diferentes órganos y tejidos, siendo estas mayormente acumuladas en hígado y riñones. Se ha descrito que nanopartículas pequeñas (menores a 10nm de diámetro) pueden penetrar en el interior celular mediante endocitosis, macropinocitosis, fagocitosis e incluso por difusión mediada a través de canales o de forma pasiva por fuerzas de Van der Waals (11).

En el interior celular, las AgNPs pueden localizarse en los endosomas y posteriormente lisosomas, donde su pH ácido fomenta su disolución y la permeabilización y liberación de iones de plata y nanopartículas de tamaño más reducido. Finalmente, pueden ser excretadas mediante exocitosis. (12)

Los mecanismos de endocitación dependen de las propiedades de las nanopartículas como el coating, su forma o su tamaño. Por ejemplo, aquellas nanopartículas de menor tamaño tienen una menor dificultad para atravesar la membrana celular, así como la que están recubiertas con coatings lipídicos (11).

Una de las características descritas en estudios sobre su biodistribución es que las AgNPs tienen capacidad para atravesar la membrana hematoencefálica (BHE), penetrando así al sistema nervioso central (2). Otros estudios han descrito que las AgNPs pueden generar una desestabilización de la BHE. Uno de los posibles mecanismos de esta desestabilización es la generación de estrés oxidativo en las células que forman esta barrera de protección. Las nanopartículas pueden entrar en la mitocondria, generando alteraciones en el proceso de respiración celular, incrementando la producción de ROS. Por otra parte, también han sido localizadas en el interior del núcleo celular o el retículo endoplasmático generando daño al DNA y estrés de retículo endoplasmático, respectivamente (12).

### 3.4. Pro-oxidación derivada de las nanopartículas de plata

El incremento de generación de ROS por las AgNPs a nivel celular es en parte consecuencia de la generación de iones  $\text{Ag}^+$  en los lisosomas a pH inferiores de 4.5, y su posterior liberación por la permeabilización de sus membranas (13). Una vez en el citoplasma, los iones  $\text{Ag}^+$  y AgNPs pueden interactuar con diferentes componentes celulares, ya sea uniéndose a proteínas o aminoácidos mediante interacciones con grupos thiol o amino, o interacciones electrostáticas. (14)

El incremento de ROS generado por AgNPs puede colapsar el sistema antioxidante endógeno, reduciendo los niveles de glutatión reducida (GSH) y la producción de ATP mitocondrial. Además, los altos niveles de ROS generados también causan la peroxidación de lípidos, generando daño en la membrana celular. Diferentes estudios han reportado que la exposición a AgNPs produce carboxilación de proteínas, daño en el ADN, alteraciones epigenéticas y del ARN no codificante, lo que en su conjunto conduce a la muerte celular (10,12).

La muerte celular por exposición a AgNPs puede ser mediada de distintas formas, como puede observarse en la figura 2. Primeramente, por el exceso de daño en las estructuras de la célula a causa del incremento de ROS. También puede ser causada por la inducción de la vía de las caspasas, a través de la activación de la vía JNK y el descenso de la función de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, que genera la permeabilización de la membrana mitocondrial, la salida al citosol del citocromo C y la formación del apoptosoma (10).

Otro de los motivos es la disrupción de la función mitocondrial. Las AgNPs pueden romper la homeostasis del retículo endoplasmático. Esto genera la liberación de calcio al citosol, que a su vez causa su almacenamiento en la mitocondria. Una vez el calcio penetra en la mitocondria causa de la disociación del citocromo C, ralentizando la transmisión de electrones entre el complejo III y el complejo IV del ciclo Q, generando un aumento de ROS. A más a más, altos niveles de calcio en el citosol causan la activación de la proteína de membrana mPTP (mitochondrial permeability transition pore).(15) La proteína mPTP generalmente facilita la asimilación de calcio en el citosol para favorecer el ciclo de los ácidos carboxílicos y la fosforilación oxidativa. Pero niveles muy elevados de calcio genera la apertura de muchas proteínas mPTP, lo que causa la despolarización de la mitocondria deformando la morfología de la mitocondria, finalmente causando apoptosis. (15). Otro de los efectos de las AgNPs se da directamente sobre las proteínas, interfiriendo en su correcto plegamiento. Esto es

debido al medio pro-oxidativo que generan o a la agregación de las AgNPs en las proteínas, lo que genera que parte de sus estructuras se encuentren desnaturalizadas.

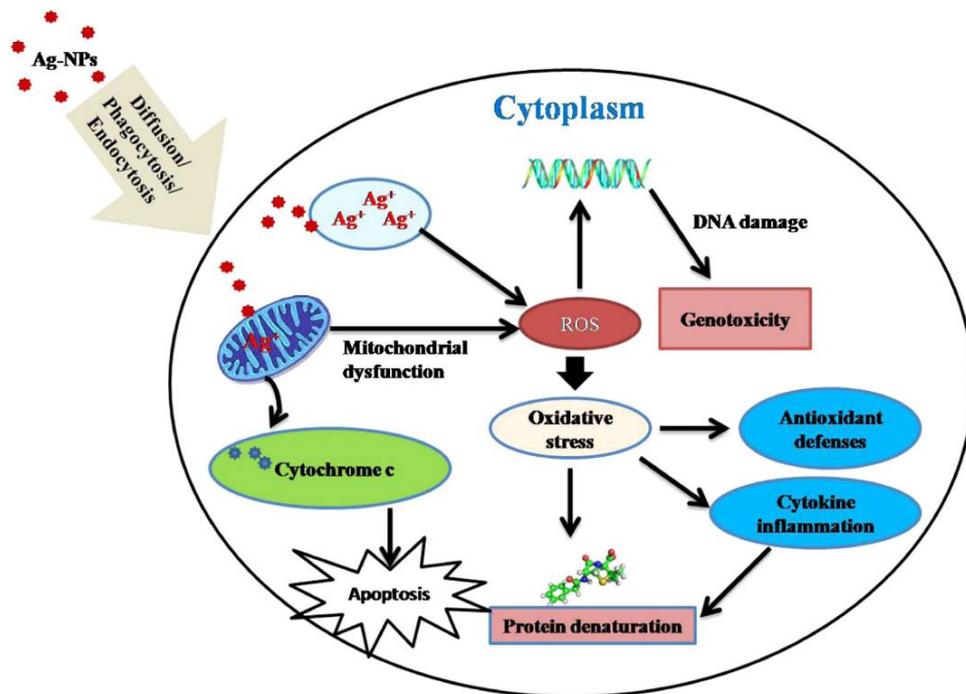


Figura 2: Resumen de los posibles procesos y mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas de plata en distintas líneas celulares. Imagen extraída de (Akter et al (10).

### 3.5. Mecanismos de defensa contra el daño oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio de la relación de pro-oxidantes y antioxidantes, a favor de los componentes pro-oxidantes (16). Este desbalance es generalmente provocado por un incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS) que a su vez generan los denominados radicales libres.

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre. Son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica.

La aparición de ROS puede producirse de forma endógena o por factores exógenos. A nivel endógeno, ROS son producidas principalmente como subproducto de reacciones metabólicas o por un ineficiente funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. Mientras que, a nivel exógeno, pueden ser producidas por el alcohol, los metales

pesados, solventes industriales, la luz ultravioleta, el humo del tabaco, la polución del aire y ciertas drogas o medicamentos.

Para poder contrarrestar el incremento de ROS, el cuerpo humano ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante. Los principales mecanismos de defensa endógenos son enzimas, entre las que destacan la acción de la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). El mecanismo de reacción por el cual estas enzimas neutralizan los radicales libres se describe a continuación, y también puede verse reflejado en la figura 3:

Superoxido-dismutasa (SOD): Cataliza la conversión del ion superoxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). Realiza esta reducción mediante la oxidación de un cofactor de metal que puede ser cobre, manganeso o zinc, según la localización en la que se encuentra este enzima a nivel celular.

Catalasa (CAT): Tiene la función de neutralizar el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) mediante la formación de moléculas de agua y oxígeno, tiene una alta eficiencia catalítica, pero poca afinidad por el sustrato. Siendo especialmente efectiva cuando hay altas concentraciones de  $H_2O_2$ .

Glutatión peroxidasa (GPx): Es una enzima dependiente de selenio que realiza las mismas funciones que CAT, pero tiene una mayor afinidad y especificidad por el peróxido de hidrogeno. Además, requiere oxidar una molécula de glutatión reducido (GSH) formando glutatión oxidado (GSSG).

Glutatión reductasa (GR): Reduce las moléculas GSSG a GSH mediante el poder reductor de NADPH. Esto permite reestablecer la molécula de GSH, haciendo que la actividad de GPx dependa en gran medida de la actividad catalítica de GR.

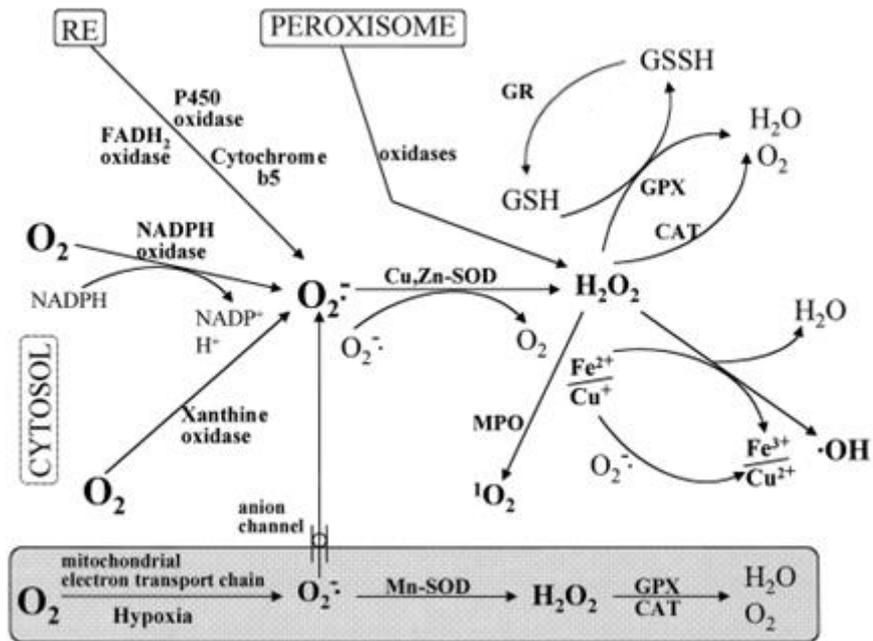


Figura 3: Esquema de los mecanismos de defensa endógeno contra las especies reactivas del oxígeno. Se pueden distinguir dos partes que representan la mitocondria y el citosol. También se puede observar que SOD utiliza manganeso como cofactor a nivel mitocondrial, mientras que en el citosol hace uso del cobre o del zinc. Figura modificada de Matés et al. (17)

Por otra parte, existen también mecanismos no enzimáticos de defensa para la neutralización de radicales libres. Estos son moléculas antioxidantes asimiladas a través de la dieta, como por ejemplo el ácido ascórbico (vitamina C) o la vitamina E.

La vitamina C o la vitamina E actúan como antioxidantes ya que tienen la capacidad de ceder electrones de sus grupos hidroxilo, que luego se estabilizan por resonancia (figura 4). (18)

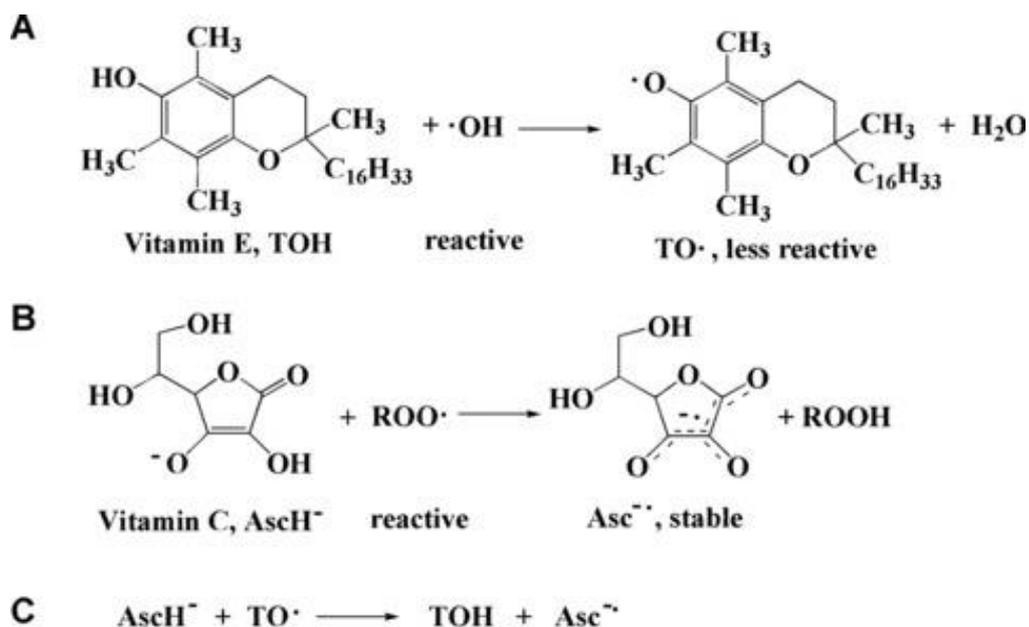


Figura 4: Representación gráfica de los procesos de antioxidantes de las moléculas de vitamina E y C. En el apartado A podemos observar como la vitamina E (TOH) cede un protón para convertirse en (TO·). En el apartado B observamos como la vitamina C (AscH<sup>·</sup>) cede un protón a un lípido con un radical peróxido(ROO·). Finalmente, en el apartado C observamos como la vitamina C cede protones a la vitamina E recuperándola a su estado pre-oxidada. (Jian-Ming Lü et al.2009) (18)

### 3.6. Factor de activación CREB en el cerebro

La proteína de unión en respuesta a cAMP (CREB) es un factor de transcripción regulado por la fosforilación de sus residuos. Una vez activa, se une a la secuencia CRE de los promotores, regulando la transcripción de genes relacionados con la supervivencia celular. Sus funciones en el cerebro se han relacionado con proliferación, diferenciación, neurogénesis o plasticidad neuronal (19). Sus funciones son de vital importancia para la viabilidad de un organismo en desarrollo. Se observó que ratas knockout para CREB no eran viables (19).

Al estudiar su importancia en ratas adultas, vieron que su inhibición produjo degeneración neuronal tanto en el hipocampo como en el cuerpo estriado, fomentando muerte celular mediante la activación de vías de señalización pro-apoptóticas. En este mismo sentido, una disminución de su actividad se relaciona con el desarrollo y progreso de enfermedades como la depresión o la enfermedad de Alzheimer (19). De forma

inversa, también se ha descrito los efectos de un aumento constituyente de CREB en cerebro de ratas. En este caso, un aumento de CREB se genera un incremento de la densidad sináptica y la complejidad dendrítica. Esto muestra que CREB es imprescindible para un correcto establecimiento sináptico y el mantenimiento de los procesos cognitivos, como son el aprendizaje y la memoria.

Existen diferentes rutas metabólicas que pueden activar CREB a través de su fosforilación del residuo Ser-133 (Figura 5). (19)

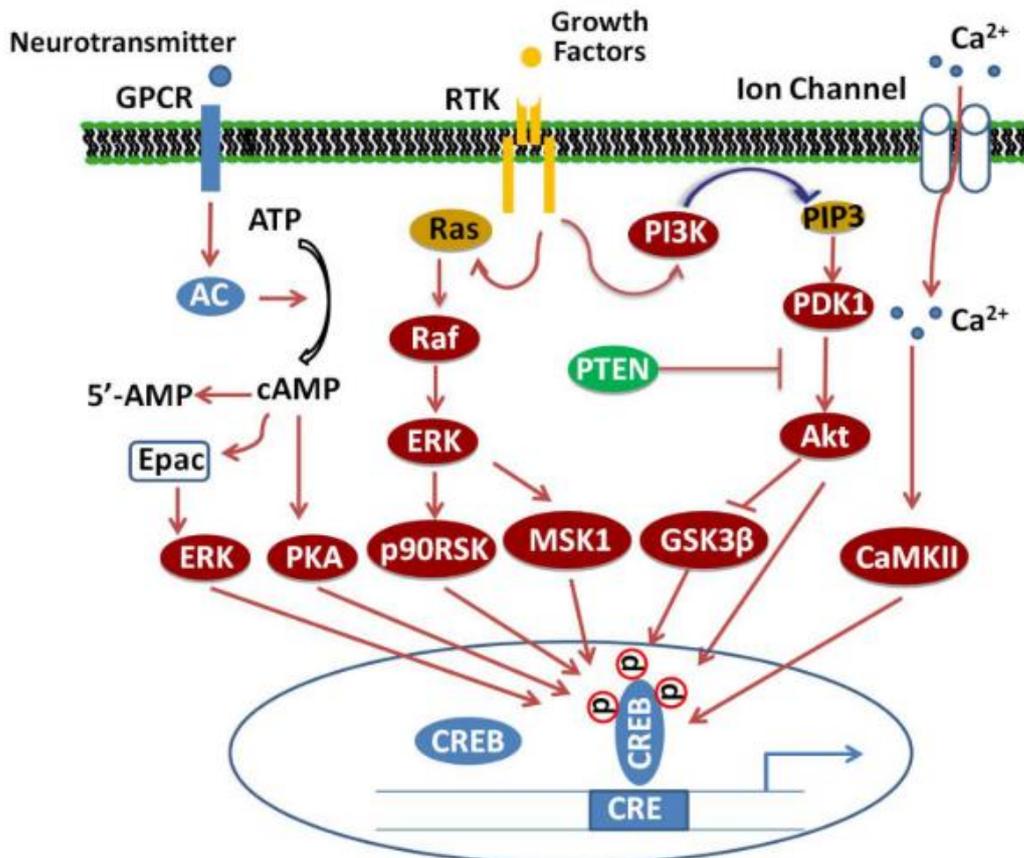


Figura 5: Representación de las distintas cascadas de activación de CREB, que consisten en la activación de PKA por un aumento de cAMP mediante la estimulación de GPCR, la unión de factores de crecimiento al receptor tirosina quinasa (RTK) que activa las rutas PI3K/Akt/GSK3β, Ras/Raf/MEK/ERK/p90/RSK y ERK/MSK1 y finalmente la activación de los receptores NMDA de las neuronas que fosforilan CREB mediante la ruta Ca<sup>2+</sup>/CaMK-dependiente. Wang et al. (19).

Uno de los efectos observados del aumento de CREB es la transcripción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que a su vez fomenta el aumento de la fosforilación de CREB en la Ser-133, tras la unión a su receptor TrkB (19). BDNF es un potente factor implicado en procesos de plasticidad neuronal, fomenta la supervivencia

celular, el desarrollo neuronal y tiene efectos neuroprotectores. (19–21). También es asociado con la memoria a largo plazo. Se ha observado que pacientes con depresión tienen bajos niveles de BDNF, siendo una prometedora molécula para el tratamiento de estas y muchas otras enfermedades neurodegenerativas (20).

## 4. Hipótesis y objetivos

Durante los últimos años el grupo de investigación TecnaTox ha evaluado la toxicidad derivada tras una exposición oral subcrónica a AgNPs. En el presente trabajo, se explorada las posibles alteraciones por toxicidad inducida por AgNPS en cerebro de ratas tras ser expuestas de forma oral durante 3 meses a diferentes concentraciones de estas nanopartículas. En base a los resultados previos obtenidos de otros estudios la hipótesis de este trabajo es:

“La exposición subcrónica oral a AgNPs induce estrés oxidativo y el descenso de la activación del factor de transcripción CREB y de BDNF en cerebro de rata”

Para llevar a cabo la comprobación de esta hipótesis, se han marcado los siguientes objetivos específicos dentro de este estudio:

- 1- Evaluar las actividades enzimáticas de diferentes marcadores de estrés oxidativo como son la CAT, GPx y GR mediante determinaciones espectrofotométricas
- 2- Evaluar cambios en la expresión proteica del enzima MnSOD, mediante la técnica de Western Blot.
- 3- Evaluar la activación del factor de transcripción CREB (niveles de CREB fosforilados respecto a su valor total), mediante la técnica Western Blot.
- 4- Por último, evaluar la expresión proteica del precursor de BDNF mediante la técnica Western Blot.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Preparación de las nanopartículas de plata

Las AgNPs cubiertas de PVP (99.95% Ag, 0.2wt% PVP coated) fueron obtenidas de SKySpring Nanomaterials (Inc., Houston, USA) en forma de polvo seco, y de un tamaño medio de entre 20 y 30 nm. Para su administración, las AgNPs fueron resuspendidas en solución fisiológica (0.9% NaCl) y fueron administradas vía gavage a concentraciones de 0, 50, 100 y 200 mg/kg/día durante 3 meses (22). La suspensión de AgNPs para el tratamiento fue preparada diariamente antes de su administración y sonicada en hielo durante 30 min (entre 35-40W), para asegurar su correcta dispersión y evitar la formación de agregados.

### 5.2 Animales

Para la realización del estudio se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley ( $262 \pm 17.70\text{g}$ ) adquiridas a Charles River (Sant Germain-L'Arbresle, Francia). Estas fueron ubicadas en una habitación equipada con un ciclo automático de luces de 12h (luz/oscuridad), una temperatura constante de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , y una humedad relativa de entre 40-60%. Se administró *ad libitum* comida (Panlab, Barcelona, España) y agua del grifo durante todo el estudio. La experimentación con animales del presente estudio fue aprobada por el comité ético de investigación animal de la universidad "Rovira i Virgili" (Tarragona, España).

### 5.3 Diseño experimental

Tras 10 días de aclimatación (para evitar que la generación de estrés, debido a la nueva ubicación, pudiera afectar al experimento), las ratas fueron pesadas y distribuidas al azar en 4 grupos de 6 individuos. A cada grupo se le administro 0, 50, 100 o 200 mg/kg/día de PVP-AgNPs vía gavage durante 90 días. El volumen de administración de la dosis diaria fue de 4ml de solución salina (0.9%) por kg de peso de rata.

Durante el periodo experimental de tratamiento se observó diariamente la mortalidad y cualquier signo clínico de las ratas. Además, se realizó un seguimiento semanal del peso y la ingesta de comida.

Finalmente, al acabar el periodo experimental las ratas se pesaron y se les administro anestesia vía intraperitoneal de una combinación de 75 mg/kg de ketamina y 0.5mg/kg

de xilacina. Posteriormente se extrajo el cerebro, se anotó su peso, se dividió en dos mitades, y se congeló en nitrógeno líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

## 5.4 Procesado de las muestras

Para el análisis de las actividades enzimáticas de las muestras de cerebro, se escindió una parte del área del córtex frontal izquierdo y se pesó. A continuación, las muestras fueron homogenizadas en una solución 0.2M de tampón fosfato salino (pH 7.4, 1:10 peso/vol). Se utilizó un homogeneizador Potter-Elvehjem con pistilo de mortero Teflon (Braun, Melsungen, Germany). Posteriormente los homogenados se centrifugaron a  $105000 \times g$  durante una hora. Se recogió el sobrenadante, se realizaron diferentes alícuotas y se congelaron para su posterior análisis.

Para el análisis de la expresión proteica, se realizó el mismo procedimiento, pero realizando algunos cambios de protocolo. Se escindió una parte del área del córtex frontal izquierdo y se pesó. A continuación, las muestras fueron homogenizadas en RIPA buffer (1:10 peso/vol) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Posteriormente los homogenados se dejaron en hielo y en agitación rotatoria durante una hora, para garantizar la completa lisis celular, de organelas y del núcleo. Posteriormente las muestras se centrifugaron a  $20000 \times g$  durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante y se congelaron para su posterior análisis.

## 5.5 Cuantificación de proteína

Se determinó la concentración de proteína mediante el método Lowry utilizando un kit comercial "DC Protein Assay" de la casa Bio-Rad. La determinación se realizó en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadió  $5\mu\text{l}$  de muestra o patrón y  $25\mu\text{l}$  de sol A' (que es una combinación de  $20\mu\text{l}$  de solución S, que evita la interferencia de detergentes en la reacción, por cada mililitro de solución A, solución alcalina de tartrato de cobre (II)). A continuación, se añadieron  $200\mu\text{l}$  de una solución B (una dilución de reactivo de Folin). Transcurridos 15 minutos de incubación, se determinó su absorbancia a  $750\text{nm}$  mediante un espectrofotómetro de placas.

Para realizar los patrones se utilizó BSA (suero fetal bovino) a 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mg BSA/ml sol. Se realizó una recta patrón y se extrapoló la concentración de las muestras.

## 5.6 Determinación de enzimas antioxidantes

### 5.6.1 Catalasa

Para determinar la actividad enzimática de CAT se hizo acorde al método descrito por Cohen et al. (23). Este método permite la determinación indirecta de CAT mediante la degradación de  $H_2O_2$  que la propia catalasa realiza.

En una cubeta de cuarzo se mezclaron una solución de fosfato potásico 100mM (con un pH de 7.5) y una solución  $H_2O_2$  al 17%. A continuación, se añadió la muestra en la cubeta de cuarzo y se monitorizó la actividad enzimática durante 30s en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 35) a una longitud de onda de 240 nm. Los resultados se expresaron en mmol  $H_2O_2$ /minuto/mg de proteína (haciendo referencia a los mmols d' $H_2O_2$  transformados).

### 5.6.2 GPx

Tampón fosfato 100 mM 1mM EDTA pH 7.0	
$PO_4HK_2$ (básico)	1.361 g
EDTA	0.029 g
$H_2O$	100 ml
$PO_4H_2K$ (ácido)	1.742 g
EDTA	0.029 g
$H_2O$	100 ml

NADPH 2.25 mM	
NADPH	4 mg
Tampón fosfato	2 ml

Reactivo GSH	
GSH	0.0575 g
Tampón fosfato	5 ml

Reactivo SR-1 = t-BuOOH	
t-BuOOH	20 µl
H <sub>2</sub> O	9.98 ml

Reactivo de ensayo GPx	
Tampón fosfato	11.1 ml
NADPH	1.5 ml
GR	0.3 ml
GSH	0.36 ml

Para determinar GPx se realizó una dilución de la muestra 1:2 en reactivo de ensayo GPx. Su determinación se realizó en el autoanalizador Cobas Mira automatic analyzer (Roche Pharmaceuti- cals, Basel, Switzerland). Este autoanalizador añadió a la muestra los reactivos SR-1 = t-BuOOH y el reactivo GSH y analizó los valores de la reacción cada 15s, durante 5 min, a una longitud de onda de 340nm. En la reacción, el T-BuOOH actúa como un peróxido catalizando la reacción de GPx, consumiendo GSH, y generando GSSG. Los valores obtenidos se expresaron en U/mg proteína.

### 5.6.3 GR

Tampón fosfato 0.25M 2mM EDTA pH 7.4	
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> (básico)	4.355 g
EDTA	0.058 g
H <sub>2</sub> O	100 ml
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K (acido)	3.4 g
EDTA	0.058 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

Reactivo SR-1 = GSSG 20mM	
GSSG	61.2 mg
Tampón fosfato	5 ml

Reactivo SR-2 = NADPH 2mM	
NADPH	8 mg
Tampón fosfato	2.4 ml

Reactivo de ensayo GR	
Tampón fosfato	24 ml
H <sub>2</sub> O	18.72 ml

La determinación de GR se realizó diluyendo la muestra 1:2 en reactivo de ensayo GR. Se añadieron los reactivos SR-1 = GSSG 20mM, SR-2 = NADPH 2mM, en el autoanalizador junto a la muestra. Se analizaron sus valores cada 15, durante 5 min, a una longitud de onda de 340nm. Se estudió la actividad de GR mediante la desaparición de NADPH por ello se añadió el GSSG y NADPH necesarias para su actividad, generando GSH y NADP<sup>+</sup>. Los resultados fueron expresados en U/mg de proteína.

## 5.7. Análisis Western Blot

### 5.7.1 Preparación de muestras

Para realizar el análisis mediante la técnica de Western Blot se utilizaron 30 µg de proteína de cada muestra disueltas en sample buffer. El sample buffer contiene SDS, un detergente que otorga carga negativa a las proteínas. Al tener todas las proteínas la misma carga permite la separación de las proteínas proporcionalmente a su peso molecular.

- Sample buffer

0.275 ml	2X
TRIS HCL 1 M pH 6.8	0.625 ml
SDS 10%	2 ml
Glicerol	1 ml
β-mercaptoetanol 100%	0.5 ml
Azul de bromofenol al 0.1%	0.6 ml
H <sub>2</sub> O Milli-Q	0.275 ml

## 5.7.2 Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada para separar las muestras en un gel mediante la utilización de un campo eléctrico que desplaza las proteínas. Una de las propiedades del gel es que forma una especie de red, a causa de contener acrilamida y bisacrilamida. Esto permite la separación de las proteínas por su peso molecular una vez han sido mezcladas con SDS y contienen carga negativa. Además, el gel de poliacrilamida se separa en dos partes distintas con porcentajes de poliacrilamida y pH diferentes, denominados resolver y stacker.

El gel stacker contiene un bajo nivel de pH y poca cantidad de poliacrilamida y sirve para acumular las proteínas antes de pasen al gel resolver. Corren rápidamente a través de él, ya que tan solamente tiene un 5% de poliacrilamida. El gel resolver es el gel en el cual se realiza la separación de proteínas. Su cantidad de poliacrilamida dependerá del tamaño de las proteínas que queramos separar, a mayores niveles de poliacrilamida más denso será el gel y mejor separa proteínas pequeñas. En nuestro estudio, utilizamos un kit comercial de BioRad (TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit) para preparar los geles, con un resolver del 12%, ya que nos interesaba separar proteínas de bajo peso molecular. Estos geles son de alta resolución. Se añade TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) y APS (Persulfato de amonio) según las indicaciones del kit, para iniciar el proceso de polimeración.

Una vez tenemos preparados los geles y las muestras, se colocaron los geles en una cubeta de electroforesis (Trans-Blot Cell) y se añadió el tampón de electroforesis. Posteriormente se introdujeron las muestras y el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) en los pocillos del gel. Finalmente aplicamos un campo eléctrico de voltaje 210v de forma constante hasta que las proteínas llegaron al final del gel (aproximadamente 40 min).

- Solución stock de tampón de migración 10X

	Concentración a 1X	Concentración a 10X
TRIS BASE	25mM	30 g
GLICINA	192 mM	144 g
SDS <sup>+</sup>	0.1%	10 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	qs	Qsp 1 L

- Tampón de migración 1X

	500 mL	1L
Tampón 10X	50 ml	100 ml
H <sub>2</sub> O Milli-Q	450 ml	900 ml

### 5.7.3 Transferencia

La transferencia es una técnica que permite migrar las proteínas del gel a un soporte mucho más estable como una membrana de nitrocelulosa o PVDF para su posterior análisis.

Para realizar transferencia utilizamos el kit “Trans-Blot Turbo RTA Transfer kit, PVDF” de Bio-Rad. Primeramente, activamos la membrana Immobilon-P PVDF de 0.45 µm utilizando etanol y posteriormente la dejamos reposar durante 5 min, para estabilizarla, en el buffer de transferencia que incluye el kit.

Una vez la membrana esta activada, preparamos el sándwich. Finalmente, introducimos el sandwich entre el cassette superior (cátodo) y el cassette inferior (ánodo) de la cubeta Trans-Blot. Seguidamente la transferencia se realizó utilizando el Transblot Turbo Transfer (Bio-Rad, Madrid, Spain), aplicando un programa para transferencia del total de proteínas durante 10 min a 25V y 2.5A.

### 5.7.4 Inmunodetección

Una vez se ha realizado la transferencia a la membrana de PVDF, la bloqueamos durante una hora en una solución de bloqueo compuesta por TBS-Tween (50mM Tris, 1.5% NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) con leche en polvo desnatada al 5%. Esto evita la unión inespecífica de anticuerpos a la membrana PVDF. Transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron la misma solución, añadiendo anticuerpos monoclonales primarios para MnSOD, CREB, phospho-CREB (Ser-133), β-actina y GAPDH. Las membranas fueron incubadas a 4°C en agitación toda la noche. Posteriormente las membranas fueron lavadas en buffer TBS-Tween e incubados durante una 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo con anticuerpo inmunoglobulina G (anti-rabbit o anti-mouse) conjugado con una peroxidasa.

Para revelar las membranas utilizamos el aparato ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, Madrid, Spain). Se utilizaron líquidos comerciales con sustrato para la peroxidasa, Clarity™ and Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates de Bio-Rad.

Para cuantificar la señal se utilizó el programa Image Lab de Bio-Rad, que permite realizar la cuantificación de los blots mediante la densitometría de intensidad de señal quimioluminiscente obtenida durante el revelado. Se utilizó la  $\beta$ -actina para corregir los valores de BDNF y MnSOD, y se utilizó GADPH para corregir los valores de CREB y fosfo-CREB.

## 5.8. Estadísticas

El análisis estadístico ha sido realizado mediante el software estadístico Package for the Social Sciences (SPSS v.22). Se realizó un test ANOVA unidireccional seguido de un test Bonferroni. La significación estadística se estableció en  $p < 0.05$ , y los resultados se presentaron como valores medios  $\pm$  SD.

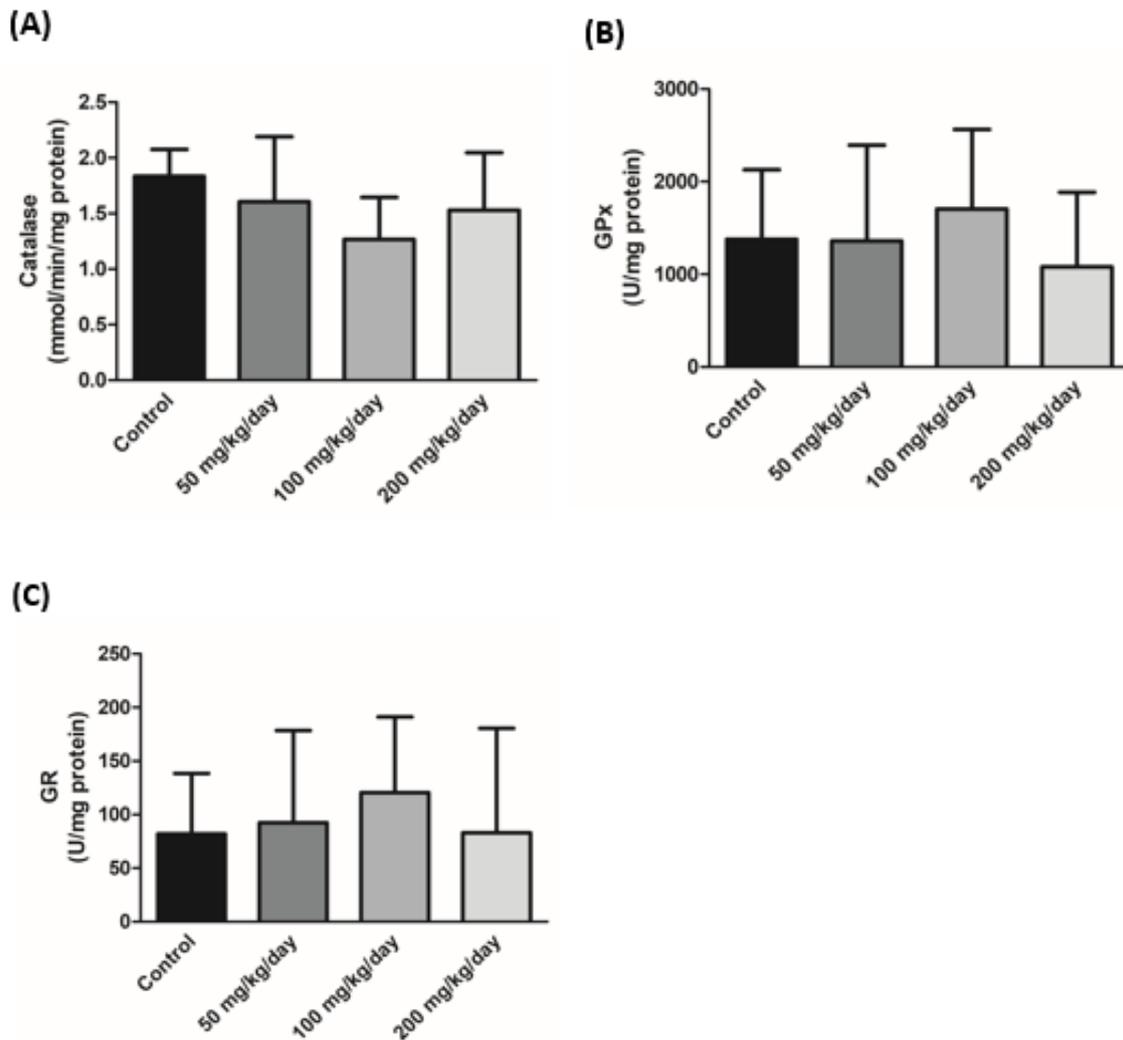
## 6. Resultados

### 6.1 Evaluación de actividades del sistema enzimático antioxidante

El sistema antioxidante enzimático es el principal encargado de catalizar reacciones para neutralizar radicales libres y ROS. Dentro de este sistema destaca la actividad de la enzima catalasa y GPx, que son las principales encargadas del neutralizar el  $H_2O_2$  y transformarlo en  $H_2O$  y  $O_2$ , y la enzima GR, que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) el cual será utilizado por la GPx para la reducción del  $H_2O_2$  y de lipoperóxidos.

La evaluación de las actividades enzimáticas del enzima catalasa, GPx y GR (figura 6) no mostraron diferencias significativas en ningunos de los grupos tratados con PVP-AgNPs, respecto al grupo control. Se puede observar en la figura 6A un descenso de la actividad media de la catalasa ( $1.25 \pm 0.26$ ) en el grupo tratado con 100 mg/kg/día, respecto a su control ( $1.72 \pm 0.37$ ). Por el contrario (figura 6B y 6C), las actividades medias de GPx ( $1861 \pm 494$ ) y GR ( $124 \pm 43$ ) en el grupo 100 mg/kg/día de AgNPs se muestran incrementadas respecto a sus controles ( $1393 \pm 434$  y  $87 \pm 30$ ;

respectivamente). Esto sugiere una probable activación del sistema glutatión y posible afectación de la actividad catalasa por generación de ROS tras el tratamiento de 100 mg/kg/día de PVP-AgNPs. Este incremento no sería generalizado, ya que no existen diferencias significativas debido a la gran dispersión de resultados.



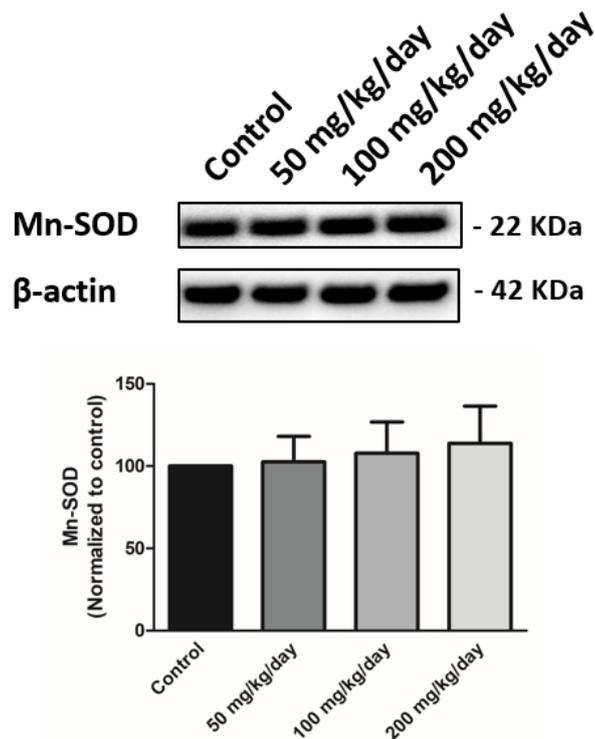
**Figura 6:** Actividad enzimática de (A) catalasa, (B) GPx y (C) GR en cerebro de rata tras ser expuestas oralmente a 0, 50, 100 y 200 mg/kg/día de AgNPs durante 90 días. Las diferencias significativas respecto al grupo control fueron analizadas mediante una ANOVA unidireccional seguida de una prueba POST HOC de Bonferroni, siendo \* $p < 0.05$ .

## 6.2 Evaluación de la expresión proteica de MnSOD

La isoforma MnSOD, o SOD2, requiere de manganeso en su centro catalítico y se caracteriza por estar situada en la membrana mitocondrial interna. Su principal función es neutralizar los productos oxidativos que se producen durante la respiración mitocondrial (24).

La MnSOD es vital para la regulación de niveles de ROS en el sistema nervioso. Diferentes estudios han descrito una regulación positiva de MnSOD en los estadios iniciales de la enfermedad de Alzheimer, posiblemente como respuesta compensatoria a un estrés oxidativo elevado en el cerebro. También se ha observado un efecto sinérgico entre el estrés oxidativo mitocondrial y la aparición de placas amiloides, en ratas con niveles reducidos de MnSOD. Por otra parte, la actividad de MnSOD resulta vital para la correcta recuperación de los pacientes que han sufrido un derrame cerebral. (25).

En el presente estudio, se evaluó la expresión proteica de MnSOD mediante la técnica Western Blot. Tal y como se puede observar en la figura 7, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y el grupo control. Este resultado puede sugerir dos cosas, o que a nivel mitocondrial no hay un incremento de producción de ROS lo suficientemente alto para activar mecanismos de regulación que ayuden a incrementar la expresión de este enzima como medida de protección para contrarrestar posible daño de sus estructuras, o que los mecanismos moleculares responsables de este incremento puedan verse afectados por la presencia de PVP-AgNPs.



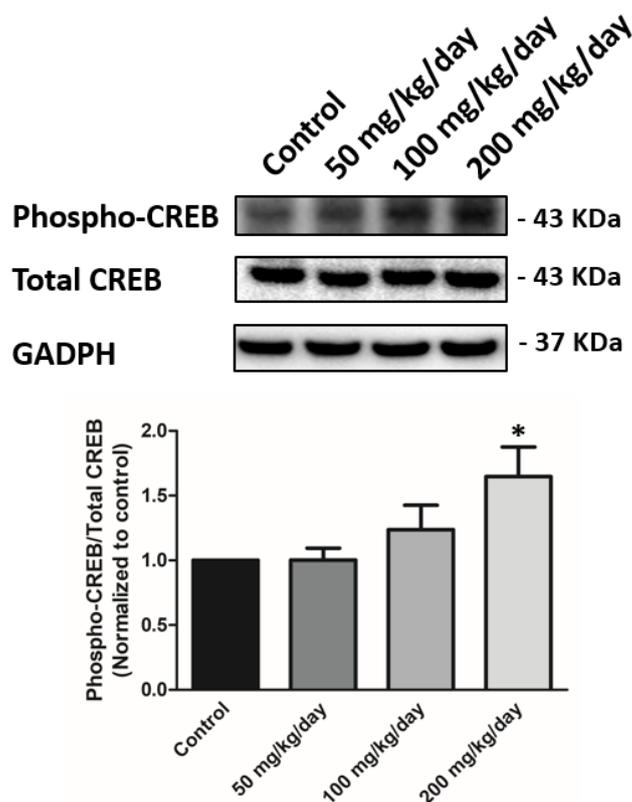
**Figura 7:** Expresión proteica de Mn-SOD y  $\beta$ -actina en cerebro de rata, tras una exposición oral a 0, 50, 100 y 200 mg/kg/día de PVP-AgNPs durante 90 días. La expresión proteica fue obtenida mediante la técnica Western Blot. Se cuantificó la intensidad de los Blots y se normalizaron los resultados utilizando  $\beta$ -actina como control. Las diferencias significativas respecto al grupo control fueron analizadas mediante una ANOVA unidireccional seguida de una prueba POST HOC de Bonferroni, siendo  $*p < 0.05$ .

### 6.3 Evaluación de la activación proteica de CREB y de la expresión de BDNF

El factor de transcripción CREB es vital para la supervivencia y plasticidad neuronal. Entre los muchos transcritos que regula destaca BDNF. Esta neurotrofina es imprescindible para el proceso de plasticidad y supervivencia neuronal, así como el correcto establecimiento de las sinapsis. Un descenso de los niveles de BDNF se ha visto relacionada con enfermedades como el Parkinson, la depresión o la demencia.

Tal y como se muestra en la figura 8, la ratio de la fosforilación de CREB fosforilado respecto CREB total se vio incrementado de manera dosis-dependiente. Este incremento fue significativo ( $P = 0.000$ ) en el grupo de 200 mg/kg/día de PVP-AgNP,

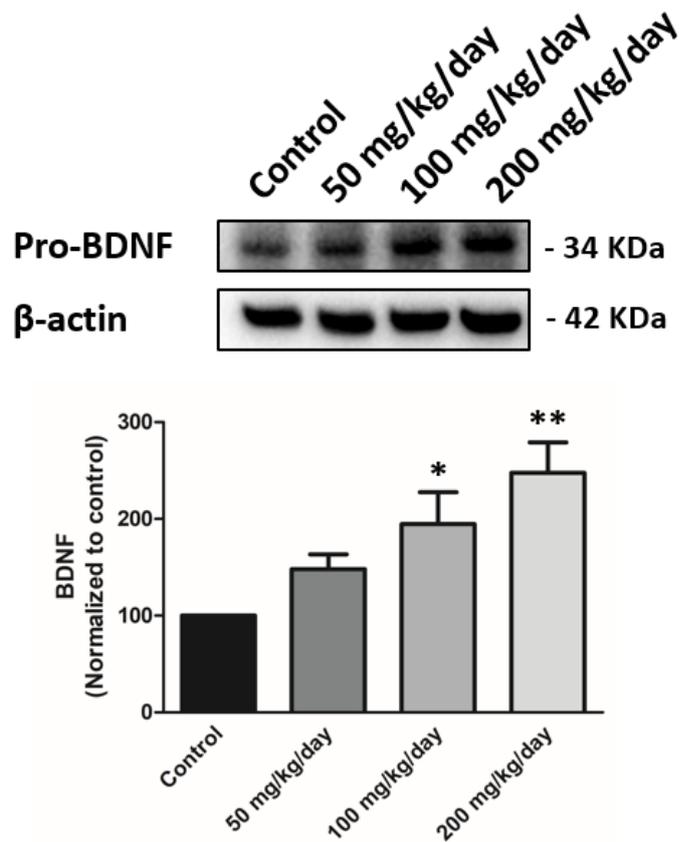
donde la ratio de fosforilación se vio incrementada en un  $64 \pm 22 \%$ , respecto a su grupo control.



**Figura 8:** Expresión proteica de CREB fosforilada, CREB total y GADPH en cerebro de rata, tras una exposición oral a 0, 50, 100 y 200 mg/kg/día de PVP-AgNPs durante 90 días. La expresión proteica fue obtenida mediante la técnica Western Blot, posteriormente se analizó la intensidad de los blots densitométricamente normalizando los resultados utilizando GADPH como control. Las diferencias significativas respecto al grupo control fueron analizadas mediante una ANOVA unidireccional seguida de una prueba POST HOC de Bonferroni, siendo  $*p < 0.05$ .

Este resultado se encuentra relacionado con el incremento de expresión proteica del precursor de BDNF. En la figura 9 se observa un aumento de la expresión de esta proteína de forma dosis dependiente. El incremento se produjo de forma significativa en el grupo 100 mg/kg/día ( $94 \pm 33\%$ ;  $p = 0.001$ ) y 200 mg/kg/día ( $147 \pm 29 \%$ ;  $P = 0.000$ ), respecto al grupo control.

Estos resultados indican una mayor actividad del factor CREB, incrementando la expresión del precursor de BDNF.



**Figura 9:** Expresión proteica del precursor de BDNF y  $\beta$ -actina. Se realizó un tratamiento subcrónico vía oral a distintas dosis de PVP-AgNPs (0, 50, 100 y 200 mg/kg/día) durante 90 días. La expresión proteica fue obtenida mediante la técnica Western Blot. Se analizó la intensidad densitométrica de los blots y se normalizó utilizando la proteína  $\beta$ -actina como control. Las diferencias significativas respecto al grupo control fueron analizadas mediante una ANOVA unidireccional seguida de una prueba POST HOC de Bonferroni, siendo  $*p < 0.05$  y  $**p < 0.01$ .

## 7. Discusión

El reciente interés y uso de las AgNPs en campos como la biomedicina, la industria alimentaria o textil (Chellaram et al 2014)(4) ha generado una gran preocupación debido a sus posibles efectos sobre la salud humana. Diferentes estudios han reportado que las nanopartículas pueden travesar la barrera gastrointestinal y hematoencefálica, acumulándose en los tejidos y órganos, incrementando los niveles de ROS, y generando alteraciones en el correcto funcionamiento celular (García et al 2016; Kim et al 2010; Lee et al 2013)(26–28).

Uno de los principales objetivos del presente estudio era evaluar los efectos de las AgNPs en cerebro relacionados con el daño oxidativo. Sorprendentemente, los resultados obtenidos no pueden concluir que se haya dado variaciones significativas de los diferentes marcadores de estrés oxidativo estudiados, como son las actividades enzimáticas de catalasa, GPx, GR o la expresión proteica de MnSOD. Estos resultados contrastan con los obtenidos por el mismo grupo de investigación en estudios previos en ratas bajo las mismas condiciones de tratamiento con AgNPs. En uno de estos estudios (Blanco et al. (29), se observó un incremento significativo en hígado de la actividad catalasa y SOD1, así como de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Estos resultados eran acordes por lo observado en otro estudio del mismo grupo de investigación (García et al. (26) en donde se observó la acumulación de AgNPs a nivel mitocondrial en hígado. Dentro de ese mismo estudio se analizó la biodistribución de Ag en diferentes órganos. El cerebro mostró unos niveles de acumulación inferiores a los encontrados en hígado. Una de las posibles causas de esta menor acumulación podría ser la función restrictiva de la BHE, tal y como se describe en otros estudios (30).

Por otra parte, en el estudio de García et al. (26), también se describe que existe una disminución de los niveles de zinc y cobre en cerebro en el grupo de exposición a 100 mg/kg/día de AgNPs. Esa disminución podría tener una afectación sobre la actividad de SOD1, ya que son metales imprescindibles para su actividad. La disminución de actividad de SOD 1 en el grupo 100 mg/kg/día de AgNPs podría estar relacionada con la tendencia al incremento de actividad de GPx y GR observada en ese mismo grupo en el presente estudio.

Teniendo todo esto en cuenta, una de las principales limitaciones del presente estudio ha sido el no haber complementado los análisis con determinaciones de la actividad y los niveles de SOD1, o los niveles de GSH, GSSG y TBARS. Además, también se ha

reportado que existen diferencias de generación de ROS en función de las diferentes áreas del cerebro, siendo mucho más susceptibles unas regiones que en otras. Hay que tener en cuenta la diferente composición de las áreas cerebrales, en donde existe diferencias del número de las células gliales que dan soporte a las neuronas. Se ha reportado que astrocitos y microglía en presencia de concentraciones bajas de AgNPs, generan la liberación de sustancias neuroprotectoras y antiinflamatorias, mitigando así el daño neuronal causado por las AgNPs (Skalska et al.(31); Gonzalez-Carter et al. (32)). Un ejemplo de estas diferencias estructurales se refleja en el estudio de Skalska et al. (31) que observaron un mayor daño por estrés oxidativo en el hipocampo que en otras áreas del cerebro tras una exposición a AgNPs. Es muy probable que, en el presente estudio, al evaluar las muestras de cerebro en su conjunto y no haberlo hecho de forma aislada, esto haya generado un apantallamiento de incremento de ROS en regiones específicas, generando así una gran dispersión en los resultados.

Por otra parte, el incremento de BDNF y CREB observado en los resultados podría tener su origen en la activación de diferentes vías, generando incluso un efecto sinérgico entre estas. Abdal et al. (33) observó que al exponer la línea neuronal humana SH-SY5Y a diferentes concentraciones de AgNPs, aumentaban los niveles de las quinasas AKT y ERK, siendo ambas vías activadoras de CREB. También encontró un descenso de la expresión génica de fosfatasas de especificidad dual relacionadas con la desfosforilación de estas quinasas (33). Diferentes artículos reflejan el incremento de AKT y ERK a dosis bajas de AgNPs. Este incremento de su activación muchas veces se encuentra correlacionado a un incremento no muy alto de la producción de ROS (34). Por lo tanto, un incremento leve de los niveles de ROS podría estar generando la activación de CREB, y consecuentemente de BDNF, previa estimulación de AKT y ERK.

Otro de los sucesos por los que las AgNPs podrían promover el incremento de CREB es la estimulación de salida de  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplasmático. El aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol estimularía la activación de diferentes rutas de la señalización metabólica como la CaMKII, PKA o MAPK que finalmente fomentarían la activación de CREB y el aumento de expresión de BDNF(15). Li et al. (35) describió el incremento de calcio en células SH-SY5Y debido a estrés del retículo endoplasmático, lo cual inducía un incremento de calcio a nivel mitocondrial y la inducción de apoptosis neuronal.

Otro posible factor que podría estar contribuyendo al aumento de la activación de CREB podría ser un aumento de TNF- $\alpha$ . Este aumento es debido a que la presencia de AgNPs genera un ambiente inflamatorio(36). Se observó que el incremento de TNF- $\alpha$  por

AgNPs inducía la señalización de la vía MAPK-CREB en la línea de células hipocámpales HT22 (37). Este efecto también se observó en neuronas humanas, mostrando un aumento de la fosforilación de CREB al subministrarles TNF- $\alpha$  (37). Es importante indicar que un factor principal implicado en el proceso de inflamación es el factor nuclear kappa B (NF-kB). Los niveles de activación de esta proteína al encontrarse aumentados junto a los de CREB, induce la expresión de genes antiapoptóticos, estimulando una mayor expresión de BDNF. Además, la propia expresión y liberación de la proteína BDNF también fomenta la activación de NF-kB y CREB al unirse y activar su receptor TrkB (38). La activación del receptor TrkB fomenta el aumento de AKT y ERK, que a su vez activa CREB, y más salida de BDNF, generando un proceso de feedback positivo o de retroalimentación positiva. Esto podría explicar la co-relación positiva que encontramos en los resultados, donde se interrelaciona un mayor incremento de fosforilación de CREB con un aumento de niveles del precursor de BDNF. Teniendo en cuenta estos resultados se podría pensar que AgNPs a pequeñas dosis podrían generar un efecto similar al que produce el litio en procesos neuronales, aumentando la activación de CREB y BDNF en cerebro a partir de la inhibición de GSK3 $\beta$  (la cual inhibe la activación de CREB). Así que la evaluación de la activación de GSK3 $\beta$  sería un factor a tener en cuenta en próximos análisis. El aumento de AKT e inhibición de actividad de GSK3 $\beta$  ha sido reportado por otros estudios a dosis bajas de AgNPs. No obstante, estudios recientes muestran que la exposición pre-natal a AgNPs genera depresión (39,40). Así que harían falta muchos más estudios para determinar dosis que no generen procesos de neurotoxicidad y pudieran ser beneficiosos en circunstancias donde se requiera un incremento de CREB y BDNF.

## 8. Conclusiones

Los resultados experimentales no muestran diferencias significativas en las actividades enzimáticas de CAT, GR y GPx y de los niveles de MnSOD tras una exposición subcrónica a AgNPs. Teniendo en cuenta estos resultados, no se puede concluir que una exposición subcrónica a AgNPs genere un incremento significativo de marcadores de estrés oxidativo en cerebro. No obstante, un incremento sustancial de GPx i GR parece producirse en el grupo de 100 mg/kg/ día, a pesar de no darse diferencias significativas debido a la gran dispersión de los resultados.

Por otra parte, si se observa un aumento considerable de forma dosi-dependiente de los niveles proteicos del precursor de la neurotrofina BDNF y del grado de fosforilación y activación del factor de transcripción CREB, posiblemente por un incremento de ROS o de la generación de un estado de inflamatorio.

Esto nos lleva a concluir que una exposición subcrónica a AgNPs no genera graves efectos neurotóxicos al no darse un aumento significativo de marcadores de estrés oxidativo. Por otra parte, propicia la activación de vías de crecimiento, supervivencia y plasticidad neuronal. No obstante, debido a las limitaciones del estudio más experimentación es requerida para evaluar de manera más profunda el efecto neurotóxico en cerebro de las AgNPs.

## 9. Bibliografía

1. POTOČNIK J. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial, Official Journal of the European Union (L225), 38-40 (2011). [Internet]. 2011 [cited 2020 Mar 22]. Available from: [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/)
2. Sharma HS, Hussain S, Schlager J, Ali SF, Sharma A. Influence of nanoparticles on blood-brain barrier permeability and brain edema formation in rats. In: *Acta Neurochirurgica, Supplementum*. Springer-Verlag Wien; 2009. p. 359–64.
3. Kovvuru P, Mancilla PE, Shirode AB, Murray TM, Begley TJ, Reliene R. Oral ingestion of silver nanoparticles induces genomic instability and DNA damage in multiple tissues. *Nanotoxicology*. 2015;9(2):162–71.
4. Chellaram C, Murugaboopathi G, John AA, Sivakumar R, Ganesan S, Krithika S, et al. Significance of Nanotechnology in Food Industry. *APCBEE Procedia*. 2014;8:109–13.
5. Hasan A, Morshed M, Memic A, Hassan S, Webster TJ, Marei HES. Nanoparticles in tissue engineering: Applications, challenges and prospects. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:5637–55.
6. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Vol. 12, *Arabian Journal of Chemistry*. Elsevier B.V.; 2019. p. 908–31.
7. Thomas S, Harshita BSP, Mishra P, Talegaonkar S. Ceramic Nanoparticles: Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2015 Dec 7 [cited 2020 Jun 8];21(42):6165–88. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=21&issue=42&spage=6165>
8. Lu XY, Wu DC, Li ZJ, Chen GQ. Polymer nanoparticles [Internet]. 1st ed. Vol. 104, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2011. 299–323 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3>
9. Singh A, Kaur K. Biological and Physical Applications of Silver Nanoparticles with Emerging Trends of Green Synthesis. In: *Silver Nanoparticles - Health and Safety* [Working Title]. IntechOpen; 2019.

10. Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. Vol. 9, *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V.; 2018. p. 1–16.
11. Ahlberg S, Antonopoulos A, Diendorf J, Dringen R, Epple M, Flöck R, et al. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. Vol. 5, *Beilstein Journal of Nanotechnology*. Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften; 2014. p. 1944–65.
12. Cameron SJ, Hosseinian F, Willmore WG. A current overview of the biological and cellular effects of nanosilver. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1–40.
13. De Matteis V, Malvindi MA, Galeone A, Brunetti V, De Luca E, Kote S, et al. Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: The role of Ag<sup>+</sup> ion release in the cytosol. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015;11(3):731–9.
14. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chemie - Int Ed*. 2013;52(6):1636–53.
15. Peng TI, Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1201:183–8.
16. Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(2):188–94.
17. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem [Internet]*. 1999 Nov [cited 2020 Mar 31];32(8):595–603. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912099000752>
18. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*. 2010 Apr;14(4):840–60.
19. Wang H, Xu J, Lazarovici P, Quirion R, Zheng W. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Front Mol Neurosci*. 2018 Aug 30;11:255.
20. Residente E, Castañeda GA, Eduardo R, Jares P, Alberto J, Medina V. Factor neurotrófico derivado del cerebro en el trastorno depresivo mayor. *El Resid*. 2010;5(1):19–21.

21. Devin K. B. Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Encycl Horm.* 2003 Dec 6;209–14.
22. Lafuente D, Garcia T, Blanco J, Sánchez DJ, Sirvent JJ, Domingo JL, et al. Effects of oral exposure to silver nanoparticles on the sperm of rats. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2016;60:133–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.02.007>
23. Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* [Internet]. 1970 [cited 2020 Jul 8];34(1):30–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5440916/>
24. Nojima Y, Ito K, Ono H, Nakazato T, Bono H, Yokoyama T, et al. Superoxide Dismutases, SOD1 and SOD2, Play a Distinct Role in the Fat Body during Pupation in Silkworm *Bombyx mori*. 2015;
25. Flynn JM, Melov S. SOD2 in Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Free Radic Biol Med.* 2013;
26. Garcia T, Lafuente D, Blanco J, Sánchez DJ, Sirvent JJ, Domingo JL, et al. Oral subchronic exposure to silver nanoparticles in rats. *Food Chem Toxicol.* 2016;92:177–87.
27. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:1–11.
28. Lee JH, Kim YS, Song KS, Ryu HR, Sung JH, Park JD, et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part Fibre Toxicol.* 2013 Aug 1;10(1).
29. Blanco J, Tomás-Hernández S, García T, Mulero M, Gómez M, Domingo JL, et al. Oral exposure to silver nanoparticles increases oxidative stress markers in the liver of male rats and deregulates the insulin signalling pathway and p53 and cleaved caspase 3 protein expression. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2018;115(March):398–404. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.039>
30. Skalska J, Frontczak-Baniewicz M, Strużyńska L. Synaptic degeneration in rat brain after prolonged oral exposure to silver nanoparticles. *Neurotoxicology.* 2015;46:145–54.
31. Skalska J, Dąbrowska-Bouta B, Strużyńska L. Oxidative stress in rat brain but not in liver following oral administration of a low dose of nanoparticulate silver.

- Food Chem Toxicol. 2016 Nov 1;97:307–15.
32. Gonzalez-Carter DA, Leo BF, Ruenraroengsak P, Chen S, Goode AE, Theodorou IG, et al. Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity through induction of H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes. *Sci Rep*. 2017 Mar 2;7.
  33. Dayem AA, Kim B, Gurunathan S, Choi HY, Yang G, Saha SK, et al. Biologically synthesized silver nanoparticles induce neuronal differentiation of SH-SY5Y cells via modulation of reactive oxygen species, phosphatases, and kinase signaling pathways. *Biotechnol J*. 2014;9(7):934–43.
  34. Murata H, Hresko RC, Mueckler M. Reconstitution of phosphoinositide 3-kinase-dependent insulin signaling in a cell-free system. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Jun 13 [cited 2020 Jul 7];278(24):21607–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12682058/>
  35. Li L, Cui J, Liu Z, Zhou X, Li Z, Yu Y, et al. Silver nanoparticles induce SH-SY5Y cell apoptosis via endoplasmic reticulum- and mitochondrial pathways that lengthen endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites and alter inositol-3-phosphate receptor function. *Toxicol Lett* [Internet]. 2018 Mar 15 [cited 2020 Jul 7];285:156–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29306025/>
  36. Orr SE, Gokulan K, Boudreau M, Cerniglia CE, Khare S. Alteration in the mRNA expression of genes associated with gastrointestinal permeability and ileal TNF- $\alpha$  secretion due to the exposure of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2019 May 13 [cited 2020 Jul 7];17(1):63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32811113/>
  37. Jensen P, Myhre CL, Lassen PS, Metaxas A, Khan AM, Lambertsen KL, et al. TNF $\alpha$  affects CREB-mediated neuroprotective signaling pathways of synaptic plasticity in neurons as revealed by proteomics and phospho-proteomics. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jul 3];8(36):60223–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28111113/>
  38. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation [Internet]. Vol. 56, *Molecular Neurobiology*. 2019 [cited 2020 Jul 3]. p. 3295–312. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1283-6>
  39. Amiri S, Yousefi-Ahmadipour A, Hosseini MJ, Haj-Mirzaian A, Momeny M,

Hosseini-Chegeni H, et al. Maternal exposure to silver nanoparticles are associated with behavioral abnormalities in adulthood: Role of mitochondria and innate immunity in developmental toxicity. *Neurotoxicology* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2020 Jul 7];66:66–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29550386/>

40. Tabatabaei SRF, Moshrefi M, Askaripour M. Prenatal Exposure to Silver Nanoparticles Causes Depression Like Responses in Mice. *Indian J Pharm Sci* [Internet]. 2015 [cited 2020 Jul 7];77(6):681. Available from: </pmc/articles/PMC4778227/?report=abstract>

## 10. Autoevaluación

La realización de las practicas externas y posteriormente el trabajo de final de grado en la Unidad de Fisiología de la URV, me ha permitido observar lo difícil que es llevar a cabo investigación, tanto la multitud de pasos que pueden llegar a tener algunas técnicas, como los errores que pueden surgir o como a veces los resultados pueden ser contrarios a lo que esperabas inicialmente y pese a ello tener sentido.

A nivel personal este trabajo me ha permitido ver, aprender y catar el esfuerzo que requiere hacer una pequeña investigación. Me ha permitido cuestionar las ideas preconcebidas que tenía, investigar, buscar y finalmente llegar a las conclusiones correctas. Además, he podido aprender a trabajar bajo estrés y telemáticamente, pero siempre con atenta ayuda de mi tutor.

También es importante destacar que he aprendido mucho acerca de las nanopartículas, desde que son, a como se hacen, donde se utilizan y que efectos negativos podrían tener sobre mí. Incluso afectando ciertos hábitos de consumo que tenía.

Para concluir este trabajo también me ha permitido aprender sobre las nanopartículas de plata, su afectación el sistema antioxidante y sobre CREB y BDNF y lo importantes que son para el correcto desarrollo neuronal.