



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE
BIO(NANO)MATERIALES CONTRA MICROORGANISMOS
PATÓGENOS PRODUCTORES DE MASTITIS BOVINA**

Lic. Anike Paula Virginia Ferreyra Maillard

DIRECTOR: Dr. Matías Santiago Pellegrino

CODIRECTOR: Dr. Pablo Roberto Dalmasso

Río Cuarto, Mayo 2019

COMISIÓN ASESORA

Dra. María Alejandra Passone	Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto
Dra. Inés Edith Yslas	Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto
Dra. María Gabriela Paraje	Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Universidad Nacional de Córdoba

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Río Cuarto, Córdoba- 28 de Junio de 2019

Calificación:.....

JURADO

.....

Dra. María Alejandra Passone

.....

Dra. Inés Edith Yslas

.....

Dra. Mónica Azucena Nazareno

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar a donde estoy hoy y nunca soltar mi mano.

A mi familia, mi apoyo incondicional en todo lo que emprendo.

A mi marido Nicolás, por su amor y aguante, sobre todo en estos meses de escritura. Te amo mi amor!!!

A mi hijo Valentino, mi más grande amor, por alegrar mi vida con esa sonrisa que nunca pierde y hacerme inmensamente feliz. Te amo con el alma Hijito!!!

A mis padres, Susana y Marcelo, que gracias a ellos me convertí en la persona que soy.

A mis hermanos, Agustín, Josefina y Agustina, por ser las maravillosas personas que son y llenarme de orgullo día a día.

A mi abuela Susy, por su compañía y amor a lo largo de toda mi vida y especialmente en esta etapa.

A mi abuelo Cacho que sigue aquí conmigo, siempre.

A mi familia “prestada”: suegros, cuñados, sobrinas, tías, abuelas, que siempre tuvieron un lugar para mí en su corazón.

A mi gran familia (tíos, primos, abuelos) por acompañarme siempre.

A mi Director, Dr. Matías Pellegrino, por su tiempo invertido y los conocimientos transmitidos a lo largo de estos 5 años.

Al mi Co-Director, Dr. Pablo Dalmasso, por su dedicación, paciencia absoluta y sobre todo calidez humana.

A los Jurados, por su tiempo y dedicación a lo largo de esta etapa y sus valiosas sugerencias.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Vir, Lau, Sumi, Axel, Rita, Gastón, Dai, Dani, por sumar lo más lindo a esta etapa.

A mis amigos de toda la vida, que estuvieron, están y sé que estarán siempre: Marianella, Flor, Alex, José, Gabi, Fabi, Celi, Fer, Ale.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por haber permitido mi formación en el marco del Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al INBIONATEC-CONICET-UNSE, por permitirme desarrollar mis actividades de investigación en este lugar.

A CONICET, por otorgarme la beca doctoral que me permitió llevar a cabo mis estudios y formación de posgrado.

A los entes que financiaron este trabajo de tesis doctoral: CONICET, ANPCyT, FONCyT y CICyT-UNSE.

A todos los que de alguna manera estuvieron presentes en esta etapa de crecimiento tanto personal como profesional.

A todos ellos, GRACIAS!!!!

RESUMEN

La mastitis bovina se define como una inflamación en la glándula mamaria y es considerada la enfermedad infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico en la explotación láctea argentina y mundial.

Si bien existe una gran variedad de medidas de control de la enfermedad, en la actualidad, la aplicación intramamaria de antibióticos es la medida más efectiva para prevenir nuevas infecciones y tratar las existentes, lo que conlleva a un uso indiscriminado de antibióticos, incluso con fines profilácticos. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de la terapia con antibióticos es que favorece la selección de cepas resistentes en la población microbiana e influye negativamente en el tratamiento de la enfermedad. El mayor desafío de la industria lechera moderna es reducir el uso de antibióticos en animales productores de alimentos para el consumo humano. En este contexto, la investigación se ha orientado hacia la búsqueda de nuevos métodos de control alternativos basados en el desarrollo de nanopartículas metálicas, especialmente de plata, como un enfoque innovador para controlar las infecciones.

En el presente trabajo, el desarrollo de procesos sintéticos *green* ha permitido de manera reproducible, rápida y eco-amigable, la obtención de nanopartículas de plata que fueron luego caracterizadas fisicoquímicamente. Se ensayaron las nanopartículas de plata en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli*, principales especies bacterianas causantes de mastitis bovina, evidenciando un excelente efecto antibacteriano a muy bajas concentraciones (del orden del pM).

Si bien se ha reportado que las nanopartículas de plata intervienen en una amplia gama de procesos moleculares dentro de los microorganismos, el mecanismo de acción antibacteriano aún no está completamente establecido. Sobre la base de esto, se llevaron a cabo ensayos de interacción de las nanopartículas de plata con membranas modelo y microorganismos y se evaluó la generación de estrés oxidativo. Se demostró que la membrana no sería el blanco de acción *per se* de las nanopartículas de plata, aunque actuaría concentrando las mismas de manera localizada. Sumado a esto, dichas nanopartículas son capaces de generar una condición de estrés oxidativo en los microorganismos evaluados, principalmente por la vía oxidativa, y el daño llega incluso a la oxidación de proteínas.

En vista de la posible utilización de las nanopartículas de plata como método preventivo en mastitis bovina, se evaluó la capacidad de las mismas para inhibir la adherencia de los patógenos más prevalentes en esta infección intramamaria a células MAC-T. A la concentración que se evaluaron, las nanopartículas de plata no produjeron una disminución en la cantidad de patógenos adheridos demostrando que, no serían una buena estrategia preventiva en cuanto a la reducción de la adherencia de los patógenos.

Se demostró además, que las nanopartículas de plata resultaron tóxicas para las células MAC-T a concentraciones iguales o mayores a la concentración inhibitoria mínima de los patógenos evaluados, aunque podrían utilizarse a concentraciones menores.

Los resultados del presente trabajo indican que, a pesar del excelente efecto antibacteriano sobre cepas productoras de mastitis bovina, debido a su carácter citotóxico, las nanopartículas de plata no podrían ser utilizadas como estrategia alternativa para el control de esta infección.

ABSTRACT

Bovine mastitis is defined as an inflammation in the mammary gland and is considered the infectious disease of dairy cattle with the greatest economic impact in the dairy exploitation in Argentina and worldwide.

Although there is a wide variety of measures to control the disease, at present, the intramammary application of antibiotics is the most effective measure to prevent new infections and treat existing ones, which leads to an indiscriminate use of antibiotics, even for prophylactic. However, one of the main drawbacks of antibiotic therapy is that it favors the selection of resistant strains in the microbial population and has a negative influence on the treatment of the disease. The biggest challenge for the modern dairy industry is to reduce the use of antibiotics in animals that produce food for human consumption. In this context, research has been oriented towards the search for new alternative control methods based on the development of metallic nanoparticles, especially silver, as an innovative approach to control infections.

In the present work, the development of synthetic green processes has allowed in a reproducible, quick and eco-friendly way, the obtaining of silver nanoparticles that were then characterized physicochemically. The silver nanoparticles were tested in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli*, the main bacterial species that cause bovine mastitis, showing an excellent antibacterial effect at very low concentrations (order of pM).

Although it has been reported that silver nanoparticles are involved in a wide range of molecular processes within microorganisms, the mechanism of antibacterial action is not yet fully established. Based on this, interaction assays of the silver nanoparticles were carried out with model membranes and microorganisms and the generation of oxidative stress was evaluated. It was demonstrated that the membrane would not be the target of action *per se* of the silver nanoparticles, although it would act by concentrating them in a localized manner. Added to this, the silver nanoparticles are able to generate a condition of oxidative stress in the microorganisms evaluated, mainly by the oxidative route, and the damage even reaches the oxidation of proteins.

In view of the possible use of silver nanoparticles as a preventive method in bovine mastitis, the ability of them to inhibit the adherence of the most prevalent pathogens in

this intramammary infection to MAC-T cells was evaluated. At the concentration that the AgNPs were evaluated, they did not produce a decrease in the amount of adherent pathogens showing that they would not be a good preventive strategy in terms of reducing the adherence of pathogens.

It was also shown that the silver nanoparticles were toxic for MAC-T cells at concentrations equal to or higher than the minimum inhibitory concentration, although they could be used at lower concentrations.

The results of the present work indicate that, despite the excellent antibacterial effect on bovine mastitis producing strains, due to its cytotoxic nature, the silver nanoparticles could not be used as an alternative strategy for the control of this infection.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Página

Resumen en Español.....	iv
Resumen en Inglés.....	vi
Índice de Tablas.....	xiv
Índice de Figuras.....	xv
Abreviaturas.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Mastitis Bovina.....	2
1.1.1. Mastitis Subclínica.....	3
1.1.2. Mastitis Clínica.....	3
1.1.3. Especies Bacterianas Causantes de Mastitis Bovina. Mecanismos de Patogenicidad.....	4
1.1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.1.3.2. Estreptococos.....	6
1.1.3.3. Estafilococos Coagulasa Negativo.....	7
1.1.3.4. Microorganismos Ambientales: Bacterias Coliformes.....	9
1.1.4. Medidas de Control y Prevención de Mastitis Bovina.....	9
1.1.4.1. Control de Mastitis Bovina.....	9
1.1.4.2. Tratamiento de la Mastitis Bovina.....	10
1.1.4.3. Medidas Alternativas de Control y Prevención de Mastitis Bovina.....	11
1.1.4.3.1. Vacunas.....	11
1.1.4.3.2. Probióticos.....	12
1.1.4.3.3. Nanopartículas.....	13
1.2. Nanopartículas de Plata.....	14
1.2.1. Síntesis de Nanopartículas de Plata.....	15
1.2.2. Mecanismo de Acción de las AgNPs.....	17
1.2.3. Citotoxicidad de AgNPs.....	18
1.3. Interacción con Membranas.....	20
1.3.1. Composición de la Membrana Bacteriana.....	20
1.3.2. Rol de la Membrana Lipídica.....	21
1.3.3. Bicapa Lipídica de Diferentes Células.....	21

1.3.4. Sistemas Modelos de Membrana.....	22
1.4. Estrés Oxidativo.....	25
1.4.1. Concepto de Estrés Oxidativo.....	25
1.4.2. Radicales Libres.....	26
1.4.3. Marcadores de Estrés Oxidativo.....	29
1.4.4. Estrategias Celulares contra Radicales Libres. Sistemas Antioxidantes.....	31
1.4.5. Implicancias del Estrés Oxidativo.....	33
2. HIPÓTESIS.....	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo General.....	35
3.2. Objetivos Específicos.....	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
4.1. MATERIALES.....	38
4.1. Re-Identificación de Cepas Productoras de Mastitis Bovina.....	38
4.1.1. Identificación Bioquímica.....	38
4.1.1.1. Materiales.....	38
4.1.1.1.1. Cepas Bacterianas.....	38
4.1.1.1.2. Medios de Cultivo Bacterianos.....	39
4.1.1.1.3. Soluciones y Reactivos.....	40
4.1.1.1.4. Equipos de Laboratorio.....	40
4.1.1.2. Metodología.....	40
4.1.1.2.1. Morfología y Tamaño de las Colonias.....	40
4.1.1.2.2. Tinción Gram.....	40
4.1.1.2.3. Catalasa.....	41
4.1.1.2.4. Medio Selectivo Diferencial.....	41
4.1.2. Identificación Molecular.....	42
4.1.2.1. Materiales.	42
4.1.2.1.1. Cepas Bacterianas.	42
4.1.2.1.2. Soluciones y Reactivos.	42
4.1.2.1.3. Equipos de Laboratorio.	43
4.1.2.2. Metodología.	43
4.1.2.2.1. Identificación Molecular por PCR-RFLP.	43
4.1.2.2.1.1. Extracción de ADN.	43
4.1.2.2.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	44

4.1.2.2.1.3. Electroforesis en Gel de Agarosa.....	45
4.1.2.2.1.4. Digestión con Enzima de Restricción <i>AluI</i>	46
4.1.2.2.1.5. Digestión con Enzima de Restricción <i>HindIII</i> y <i>PvuII</i>	47
4.2. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Plata.....	50
4.2.1. Materiales.....	50
4.2.1.1. Soluciones y Reactivos	50
4.2.1.2. Equipos de Laboratorio.....	50
4.2.2. Metodologías.....	51
4.2.2.1. Preparación del Extracto Acuoso.....	51
4.2.2.2. Síntesis <i>Green</i> de AgNPs.....	51
4.2.2.3. Caracterización Físicoquímica de Nanopartículas de Plata.....	51
4.2.2.3.1. Espectroscopía UV-visible.....	52
4.2.2.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	52
4.2.2.3.3. Difracción de Rayos X.....	52
4.3. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Nanopartículas de Plata.....	53
4.3.1. Materiales.....	53
4.3.1.1. Cepas Bacterianas.....	53
4.3.1.2. Soluciones y Reactivos.....	53
4.3.2. Metodologías.....	54
4.3.2.1. Difusión en Placa. Técnica de Disco.....	54
4.3.2.2. Microdilución en Caldo.....	54
4.3.2.3. Análisis Estadístico.....	55
4.4. Interacción de AgNPs con Membranas Modelo y Microorganismos.....	55
4.4.1. Materiales.....	55
4.4.1.1. Cepas Bacterianas.....	55
4.4.1.2. Modelos de Membrana.....	55
4.4.1.3. Soluciones y Reactivos.....	55
4.4.1.4. Equipos de Laboratorio.....	56
4.4.2. Metodologías.....	56
4.4.2.1. Preparación de Monocapas.	56
4.4.2.2. Preparación de Liposomas por la Técnica Deshidratación-Hidratación.....	57
4.4.2.3. Presión Superficial.....	58
4.4.2.3.1. Interacciones entre Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Monocapas Lipídicas.....	58

4.4.2.3.2. Estudio Cinético.....	59
4.4.2.4. Potencial Zeta en Membranas Modelo.....	60
4.4.2.5. Potencial Zeta en Microorganismos.....	60
4.4.2.6. Dispersión Dinámica de Luz.....	61
4.4.2.7. Ensayos de <i>Leakeage</i> (Escape).....	62
4.4.2.8. Análisis Estadístico.....	64
4.5. Investigación del Metabolismo Oxidativo en Bacterias: Estrés Oxidativo.....	64
4.5.1. Materiales.....	64
4.5.1.1. Cepas Bacterianas.....	64
4.5.1.2. Soluciones y Reactivos.....	64
4.5.1.3. Equipos de Laboratorio.....	65
4.5.2. Metodología.....	65
4.5.2.1. Investigación del Metabolismo Oxidativo en Bacterias.....	65
4.5.2.1.1. Determinación de Especies Reactivas del Oxígeno por Espectrofluorometría.....	65
4.5.2.1.2. Microscopía de Fluorescencia.....	66
4.5.2.1.3. Determinación de Especies Reactivas del Nitrógeno Mediante Cuantificación de Nitritos en Bacterias.....	66
4.5.2.2. Oxidación de Macromoléculas Bacterianas.....	67
4.5.2.2.1. Evaluación de la Peroxidación Lipídica.....	67
4.5.2.2.2. Determinación de Productos Proteicos de Oxidación Avanzada por Espectrofotometría.....	68
4.5.2.3. Análisis Estadístico.....	68
4.6. Evaluación de la Capacidad de Adherencia de los Patógenos a Células Epiteliales Mamarias Bovinas.....	69
4.6.1. Materiales.....	69
4.6.1.1. Cepas Bacterianas.....	69
4.6.1.2. Línea Celular.....	69
4.6.1.3. Medio de Cultivo Celular.....	69
4.6.1.4. Soluciones y Reactivos.....	69
4.6.1.5. Equipos de Laboratorio.....	70
4.6.2. Metodología.....	70
4.6.2.1. Preparación del Cultivo de Células MAC-T.....	70
4.6.2.2. Tripsinización y Siembra en Placas.....	70
4.6.2.3. Preparación de los Inóculos Bacterianos.....	71

4.6.2.4. Recuento de Células Previo al Ensayo.....	71
4.6.2.5. Ensayos de Adherencia Bacteriana.....	72
4.6.2.6. Ensayos de Adherencia Bacteriana sobre Células MAC-T en Presencia de Nanopartículas de Plata.....	73
4.6.2.7. Análisis Estadístico.....	73
4.7. Citotoxicidad.....	73
4.7.1. Materiales.....	73
4.7.1.1. Línea Celular.	73
4.7.1.2. Medios de Cultivo Celular.....	74
4.7.1.3. Soluciones y Reactivos.....	74
4.7.1.4. Equipos de Laboratorio.....	74
4.7.2. Metodología.....	74
4.7.2.1. Citotoxicidad de Nanopartículas de Plata sobre Células MAC-T.....	74
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
5.1. Caracterización de Cepas Productoras de Mastitis Bovina.....	77
5.1.1. Identificación Bioquímica.....	77
5.1.1.1. Morfología y Tamaño.....	77
5.1.1.1.2. Tinción Gram.....	77
5.1.1.1.3. Catalasa.....	77
5.1.1.1.4. Medio Selectivo Diferencial.....	78
5.1.2. Identificación Molecular.....	79
5.1.2.1. Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	79
5.1.2.2. Digestión con Enzima de Restricción <i>AluI</i>	80
5.1.2.3. Doble Digestión con Enzimas de Restricción <i>HindIII</i> y <i>PvuII</i>	81
5.2. Síntesis y Caracterización Fisicoquímica de Nanopartículas de Plata.....	84
5.3. Evaluación de la Actividad Antibacteriana de las AgNPs Biosintetizadas.....	87
5.3.1. Difusión en Placa. Técnica de Disco.....	87
5.3.2. Microdilución en Caldo.....	92
5.4. Interacción de AgNPs Biosintetizadas con Membranas Modelo y Microorganismos.....	96
5.4.1. Afinidad de las Nanopartículas de Plata en Membranas Lipídicas.....	96
5.4.1.1. Interacción de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Monocapas Lipídicas Determinada <i>vía</i> Presión Superficial.....	96

5.4.1.2. Interacción de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Bicapas Lipídicas Determinada <i>vía</i> Potencial Zeta.....	101
5.4.1.3. Interacción de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Bicapas Lipídicas Determinada <i>vía</i> Dispersión Dinámica de Luz.....	104
5.4.2. Interacción de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Microorganismos Bacterianos de Relevancia Veterinaria Determinada <i>vía</i> Potencial Zeta.....	106
5.4.3. Consecuencias de la Interacción de Nanopartículas de Plata <i>Green</i> con Liposomas: <i>Leakeage</i>	110
5.5. Estrés Oxidativo.....	111
5.5.1. Investigación del Metabolismo Oxidativo Bacteriano. Efecto de Nanopartículas de Plata Biosintetizadas.....	111
5.5.1.1. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno por Espectrofluorimetría.....	111
5.5.1.2. Análisis Cualitativo de ERO: Microscopía de Fluorescencia.....	114
5.5.1.3. Determinación de Especies Reactivas del Nitrógeno por el Método de Griess.....	115
5.5.2. Oxidación de Macromoléculas Bacterianas. Efecto de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas.....	120
5.5.2.1. Valoración de la Peroxidación Lipídica.....	120
5.5.2.2. Determinación de la Oxidación de Proteínas.....	122
5.6. Capacidad de Adherencia de Diferentes Cepas Bacterianas a Células MAC-T.....	124
5.6.1. Capacidad de Diferentes Cepas Bacterianas para Adherirse a Células del Epitelio Mamario Bovino en Presencia de AgNPs Biosintetizadas.....	128
5.7. Citotoxicidad de AgNPs Biosintetizadas.....	130
6. CONCLUSIONES.....	133
7. BIBLIOGRAFÍA.....	139

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Aspecto típico de las colonias crecidas en medio selectivo Chrom agar.....	42
Tabla 2. Componentes y volúmenes de la mezcla de reacción (MIX) para amplificar una secuencia parcial del gen <i>groEL</i> a partir de ADN genómico.....	44
Tabla 3. Detalles del programa utilizado para amplificar una secuencia parcial del gen <i>groEL</i> a partir de ADN genómico.....	45
Tabla 4. Mezcla para digestión enzimática del ADN amplificado.....	46
Tabla 5. Mezcla para doble digestión enzimática del ADN amplificado.....	50
Tabla 6. Condiciones óptimas de síntesis <i>green</i> de AgNPs con extracto acuoso de achicoria.....	86
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de las AgNPs <i>green</i> y diferentes antibióticos obtenida por técnica de difusión en disco.....	89
Tabla 8. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de AgNPs biosintetizadas con extracto de achicoria obtenida por técnica de microdilución en caldo.....	92
Tabla 9. Constantes de disociación aparente (K^*_d) y perturbación de la presión superficial inicial ($\Delta\Pi_{m\acute{a}x}$) obtenidas para las AgNPs <i>green</i>	98
Tabla 10. Constantes de velocidad específica (k) de interacción de AgNPs <i>green</i> y membranas lipídicas.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquema de la membrana plasmática en bacterias grampositivas y gramnegativas.....	22
Figura 2. Esquema de la membrana plasmática en células eucariotas.....	22
Figura 3: Representación esquemática de la clasificación aplicado para liposomas....	24
Figura 4: Esquema del proceso fundamental de auto-ensamblaje.....	25
Figura 5. Vía univalente de reducción de O ₂	26
Figura 6: Reacciones coordinadas de los antioxidantes.....	32
Figura 7.A. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de 550 pb del gen <i>groEL</i> de cepas de referencia de <i>Staphylococcus</i> utilizando los cebadores H279A y H280A.....	48
Figura 7.B. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos producidos por la digestión con <i>AluI</i> de los amplicones estafilocócicos.....	48
Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos producidos por las digestiones <i>AluI</i> y <i>HindIII/PvuII</i> de los amplicones <i>groEL</i> de <i>S. chromogenes</i> , <i>S. capitis</i> y <i>S. hyicus</i>	49
Figura 9. Representación de una membrana biológica y una monocapa lipídica en una interfase agua-aire.....	57
Figura 10: Esquema de la preparación de liposomas mediante la técnica de deshidratación-hidratación.....	58
Figura 11. Representación del método de <i>leakage</i>	63
Figura 12. Fotografía que muestra un resultado negativo (A) y positivo (B) para la prueba de la catalasa.....	78
Figura 13. Crecimiento de diferentes cepas de estafilococos en medio selectivo diferencial Chrom Agar.....	79
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de 550 pb del gen <i>groEL</i> de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. utilizando los cebadores H279A y H280A.....	80
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos por la digestión con <i>AluI</i> de los amplicones estafilocócicos.....	81
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos por la digestión con <i>AluI</i> (2-12) y <i>HindIII</i> y <i>PvuII</i> (11b) de los amplicones estafilocócicos.....	82
Figura 17.A. Solución de AgNO ₃	84
Figura 17.B. Suspensión coloidal de AgNPs biosintetizadas.....	84

Figura 18. Evolución temporal del espectro de absorción UV-vis, micrografía TEM e histograma de AgNPs biosintetizadas para las diferentes concentraciones de AgNO ₃	85
Figura 19. Espectro XRD de AgNPs biosintetizadas empleando el extracto acuoso de hojas de achicoria.....	87
Figura 20. Halos de inhibición producidos por las AgNPs biosintetizadas sobre diferentes microorganismos.....	90
Figura 21. Comparación de la actividad antibacteriana de las AgNPs <i>green</i> y diferentes antibióticos sobre <i>S. aureus</i> 9-1 por técnica de difusión en disco.....	91
Figura 22. Diagrama del mecanismo de acción propuesto para AgNPs <i>green</i>	95
Figura 23.A. Interacción de AgNPs sintetizadas de manera <i>green</i> con monocapas lipídicas.....	97
Figura 23.B. Interacción de AgNPs sintetizadas químicamente con monocapas lipídicas.....	97
Figura 24. Cinéticas de interacción AgNPs-lípidos.....	99
Figura 25. Valores de potencial zeta de liposomas incubados con diferentes concentraciones de AgNPs <i>green</i>	102
Figura 26. Esquema simplificado de las AgNPs <i>green</i> y su interacción con liposomas cargados negativamente.....	103
Figura 27. Distribución de tamaño de LUVs DMPC:DMPG, AgNPs <i>green</i> y liposomas en presencia de nanopartículas.....	104
Figura 28. Esquema simplificado de las AgNPs <i>green</i> y su interacción con liposomas cargados negativamente. Aumento de tamaño.....	105
Figura 29.A. Valores de potencial zeta (mV) y UFC/ml en <i>S. aureus</i> incubadas con diferentes concentraciones de AgNPs biosintetizadas.....	106
Figura 29.B. Valores de potencial zeta (mV) y UFC/ml en <i>S. uberis</i> incubadas con diferentes concentraciones de AgNPs biosintetizadas.....	107
Figura 29.C. Valores de potencial zeta (mV) y UFC/ml en <i>E. coli</i> incubadas con diferentes concentraciones de AgNPs biosintetizadas.....	107
Figura 30. Porcentaje de <i>leakage</i> en función del tiempo.....	110
Figura 31. Cuantificación de ERO por espectrofluorimetría para <i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> y <i>E. coli</i> frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis.....	112
Figura 32. Microscopía de fluorescencia de <i>S. aureus</i> incubado con PBS y AgNPs biosintetizadas.....	115

Figura 33. Cuantificación de ERN por espectrofotometría para cepas de <i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> y <i>E. coli</i> frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis.....	116
Figura 34. Cuantificación de ERN por espectrofotometría en presencia de Tirón para cepas de <i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> y <i>E. coli</i> frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis.....	117
Figura 35.A. Cuantificación de ERN por espectrofotometría en ausencia y en presencia de Tirón para cepas de <i>S. aureus</i> frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis.....	117
Figura 35.B. Cuantificación de ERN por espectrofotometría en ausencia y en presencia de Tirón para cepas de <i>S. uberis</i> frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis.....	118
Figura 35.C. Cuantificación de ERN por espectrofotometría en ausencia y en presencia de Tirón para cepas de <i>E. coli</i> frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis.....	118
Figura 36. Determinación de malondialdehído (MDA) por espectrofotometría para cepas de <i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> y <i>E. coli</i> frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis.....	121
Figura 37. Determinación de productos proteicos de oxidación avanzada por espectrofotometría para cepas de <i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> y <i>E. coli</i> frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis.....	123
Figura 38. Capacidad de adherencia de <i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> y <i>E. coli</i> a células MAC-T.....	125
Figura 39. Capacidad de adherencia de <i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> y <i>E. coli</i> a células MAC-T en ausencia y presencia de AgNPs a concentraciones sub-CIM.....	129
Figura 40. Curva dosis-respuesta de células MAC-T incubadas con AgNPs <i>green</i>	131
Figura 41. Células MAC-T incubadas con concentraciones diferentes de AgNPs biosintetizadas.....	131

ABREVIATURAS

8-OH-dG: 8-Oxo-7,8-Dihidro-2'-desoxiguanosina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AgNO₃: Nitrato de Plata

AgNPs: Nanopartículas de Plata

AOPP: del inglés *Advanced Oxidation Protein Products*

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

CAMPs: del inglés *Cationic Antimicrobial Peptides*

CAT: Catalasa

CC₅₀: Concentración Citotóxica Media

CF: Carboxifluoresceína

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CL: Cardiolipina

CO₂: Dióxido de Carbono

DMPC: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina

DMPG: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-1'-rac-glicerol

DO: Densidad Óptica

ECMP: del inglés *ExtraCellular Matrix Protein*

ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GRAS: del inglés *Generally Recognized As Safe*

GSH: Glutatión Reducido

GSSG: Glutatión Oxidado

GUVs: del inglés *Giant Unilamellar Vesicles*

h: Hora

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

HO•: Radical Hidroxilo

IMM: Infección Intramamaria

LPS: Lipopolisacáridos

LUVs: del inglés *Large Unilamellar Vesicles*

MDA: Malondialdehído

min: Minutos
MLVs: del inglés *Multi-Lamellar Vesicles*
NO•: Óxido Nítrico
NO₂•: Nitrito
NPs: Nanopartículas
O₂^{-•}: Anión Superóxido
ONOO•: Peroxinitrito
PBS: *Buffer* fosfato salino
PC: Fosfatidilcolina
PG: Fosfatidilglicerol
PMN: Polimorfonucleares
Px: Peroxidasa
r.p.m.: Revoluciones Por Minuto
RCS: Recuento Celulas Somáticas
ROO•: Radical Peroxilo
SM: Esfingomiolina
SNC: *Staphylococcus* Coagulasa Negativos
SOD: Superóxido dismutasa
SUAM: del inglés *S. uberis Adhesion Molecule*
SUVs: del inglés *Small Unilamellar Vesicles*
TBA: Ácido Tiobarbitúrico
TCA: Ácido Tricoloroacético
TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión
TH: Todd Hewitt
TNF α: del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*
TS: Tripteína Soya
UFC: Unidades Formadoras de Colonias
XRD: Difracción de Rayos X

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Mastitis Bovina.

La mastitis se define como el proceso inflamatorio de la glándula mamaria. Si bien esta inflamación puede deberse a diversos factores, por lo general se presenta como consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a la glándula a través del canal del pezón y ocasionan cambios físicos y/o químicos en la misma (Zhao y Lacasse, 2008). El proceso inflamatorio resulta en la liberación de una variedad de proteasas a la leche, las cuales son secretadas principalmente por leucocitos polimorfonucleares (PMN) reclutados de la sangre a la glándula (Caggiano y col., 2019). En algunos casos, esta inflamación intramamaria puede reconocerse por signos clínicos, y se clasifica como clínica o subclínica según la visibilidad de los efectos de la inflamación de la glándula mamaria.

La mastitis bovina es considerada la enfermedad infecciosa con mayor impacto económico que afecta mundialmente al ganado lechero, ocasionando pérdidas muy elevadas por la disminución de la calidad y cantidad de leche producida, el aumento en los costos de tratamiento y servicios veterinarios, y el descarte de animales (Gomes y col., 2016).

Las consecuencias de la mastitis incluyen importantes pérdidas económicas debido a una variedad de factores, entre los que se pueden mencionar la reducción en el rendimiento y calidad de la leche, un aumento en el descarte de leche, el reemplazo de animales y los costos de tratamiento veterinario, así como las implicaciones para el bienestar de los animales (Schabauer y col., 2018).

Las pérdidas atribuidas a la mastitis están relacionadas a sus formas de presentación, clínica o subclínica, las que afectan en diferente grado el nivel de producción (Vissio y col., 2015). Asimismo, resulta necesario tener en cuenta tanto los costos directos como las pruebas de diagnóstico, el servicio veterinario, medicamentos, leche descartada y el parto, como también los costos indirectos relacionados con la pérdida futura de producción de leche, la reproducción reducida y el sacrificio y reemplazo prematuro de vacas con mastitis. Además, es necesario considerar las medidas preventivas en el costo total de la enfermedad (Heikkilä y col., 2018).

Como se ha mencionado previamente, la mastitis es una de las enfermedades más comunes y costosas que enfrenta la industria láctea en la actualidad. Anualmente, más de dos mil millones de dólares se pierden solo por mastitis, mientras que casi dos tercios de estas pérdidas económicas son atribuidas a las consecuencias de las infecciones subclínicas

(Bach, K.D y col., 2019). Se ha estimado que las pérdidas de mastitis debido a la reducción de la producción de leche, el costo de los tratamientos y el desecho representan el 78, 8 y 14%, respectivamente (Romero y col., 2018).

Vissio y col. (2015) realizaron estimaciones de las pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de la provincia de Córdoba, Argentina. Los resultados de dicha investigación arrojaron que las pérdidas en producción de leche por mastitis subclínica corresponden a 2,8 litros / vaca / día, representando un costo de US\$ 0,99 / vaca / día. Mientras que para mastitis clínica, la pérdida en producción de leche fue de 0,12 litros / vaca / día, equivalente a US\$ 0,04 / vaca / día. Por otro lado, las erogaciones derivadas del control y prevención fueron de US\$ 0,059 / vaca / día, siendo las más importantes aquéllas debidas a la terapia de secado y al tratamiento con antibióticos de los casos de mastitis clínica. Es así como, los costos totales por mastitis ascienden a US\$ 1,041 / vaca / día en los establecimientos evaluados.

1.1.1. Mastitis Subclínica.

Es posible definir la mastitis subclínica como la presencia de una infección sin signos clínicos evidentes, pero con un aumento del recuento de células somáticas (RCS). Las células somáticas (macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales mamarias) normalmente se encuentran presentes en la ubre bovina a bajas concentraciones; sin embargo, durante la infección, el RCS aumenta a medida que los leucocitos de la sangre ingresan a la glándula mamaria reclutadas por la presencia del organismo invasor (Bach, y col., 2019). Este tipo de mastitis resulta en una notoria reducción en la producción de leche y un aumento en el descarte de la misma, debido a que su composición se presenta alterada por la presencia de componentes inflamatorios y microorganismos.

La mastitis subclínica afecta entre el 20 y 50% de las vacas en determinados rebaños, lo que la convierte en la forma más frecuente de la enfermedad (Gonçalves y col., 2018). Además, por la ausencia de signos clínicos, este tipo de mastitis no suele ser detectada fácilmente por el ordeñador. A su vez, estos factores influyen en el precio de la leche por lo que se requieren métodos efectivos para detectar la enfermedad (Bach y col., 2019).

1.1.2. Mastitis Clínica.

La mastitis clínicase caracteriza por presentar signos visibles y palpables de una

inflamación de la ubre, como hinchazón, dolor, enrojecimiento y pérdida de la función, y conduce a una reducción en la producción de leche. En el caso de una mastitis clínica aguda, además, aparecen signos sistémicos como fiebre, cambio y disminución de la apariencia de la leche, pérdida de apetito y recumbencia (Schabauer y col., 2018).

La leche de vacas con mastitis presenta alteraciones físicas visibles, así como cambios químicos, microbiológicos y sensoriales, lo que la hace inadecuada para el consumo humano. Además, el cambio en la calidad de la leche reduce el rendimiento industrial y la vida útil de los productos lácteos (Tomazi y col., 2018).

Entre los métodos de detección de mastitis bovina existen las pruebas fisicoquímicas (conductividad eléctrica de la leche), las pruebas biológicas (el test de California, la prueba de Wisconsin y diagnóstico bacteriológico) y el RCS por microscopía directa o contadores automáticos infrarrojos (Fernandez Bolaños y col., 2012).

En cuanto a las pruebas bacteriológicas, los cultivos en laboratorio resultan necesarios para identificar los microorganismos específicos que se encuentran asociados a los casos de mastitis y de ese modo seleccionar los agentes terapéuticos adecuados para la erradicación de dicho microorganismo. Es de importancia para este tipo de evaluación, que la extracción de la muestra sea lo más aséptica posible, en un recipiente estéril y posteriormente congelada hasta su análisis en el laboratorio (Pérez, 2005).

1.1.3. Especies Bacterianas Causantes de Mastitis Bovina. Mecanismos de Patogenicidad.

Si bien la mastitis bovina es considerada una enfermedad multifactorial, la gran mayoría los casos son de origen bacteriano, representando más del 90% de todos los diagnósticos de mastitis. Los microorganismos más frecuentemente aislados en los casos de mastitis bovina son estafilococos, estreptococos y coliformes, pero otras especies también pueden infectar la ubre (Poutrel y col., 2018). Dentro de las bacterias aisladas, las especies de estafilococos ocupan un lugar importante. Hasta la fecha, se han caracterizado más de 50 especies y subespecies estafilocócicas (Krishnamoorthy y col., 2017).

Los patógenos causantes de mastitis se clasifican como contagiosos o ambientales, según su reservorio primario y su vía de transmisión (Gonçalves y col., 2018). Dentro del primer grupo, los más importantes son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Su principal vía de entrada es el canal del pezón y su hábitat es la glándula mamaria bovina. Se transmiten de una ubre a otra principalmente durante el ordeño y han sido capaces de

desarrollar estrategias para evadir el sistema inmune y permanecer en la glándula, adaptándose de este modo a las condiciones de la ubre (Fernandez Bolaños y col., 2012). En las últimas décadas, varios países han adaptado estrategias de manejo específicas para controlar patógenos contagiosos, por lo que es inusual su implicancia, especialmente de *S. agalactiae*, en infecciones intramamarias (IMI) (Tomazi y col., 2018).

En cuanto a los patógenos ambientales, son más frecuentes y su reservorio es el ambiente donde permanecen los animales (establos, comederos, bebidas). Los estreptococos ambientales, algunos estafilococos coagulasa negativos y las bacterias coliformes son los microorganismos más comunes capaces de causar mastitis bovina (Fernandez Bolaños y col., 2012).

Los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para desencadenar la infección en la glándula mamaria. La adherencia de bacterias patógenas a las células huésped se ha aceptado como un paso primario en el proceso de colonización de las superficies de la mucosa. Para colonizar las membranas mucosas y así invadir los tejidos del huésped, las bacterias patógenas reconocen y se adhieren a los receptores en superficies específicas de la mucosa del huésped. La adherencia también puede implicar la unión a proteínas de la matriz extracelular (ECMP, del inglés *ExtraCellular Matrix Protein*) que pueden estar expuestas como resultado del daño al epitelio (Almeida y col., 1996). Cuando la adherencia no se ha producido, el resultado es probablemente la eliminación de las bacterias por el efecto del enjuague de las secreciones normales, por lo que la infección no es capaz de prosperar (Almeida y col., 1996).

1.1.3.1. *Staphylococcus aureus*.

Es uno de los principales patógenos contagiosos aislados de infecciones intramamarias bovinas, por lo que se considera el agente causal más importante y frecuente de la mastitis bovina en varios países incluido Argentina (Persson y col., 2011; Pellegrino y col., 2016).

Se trata de un coco grampositivo, coagulasa positivo, asociado tanto a casos de mastitis clínica como subclínica, con baja tasa de curación mediante tratamientos convencionales (antibióticos). La recurrencia de las infecciones por este microorganismo, sumado a la ineficacia de los antibióticos para eliminarlas, puede explicarse principalmente por su componente biológico intracelular característico, que le otorga a *S. aureus* la capacidad para invadir y sobrevivir dentro de células eucariotas tales como células epiteliales de la glándula mamaria o células inmunes, y por lo tanto persistir en el rebaño de forma no detectada

(Almeida y col., 1996; Hébert y col., 2000; Barkema y col., 2006, Pellegrino y col., 2016).

Múltiples son los factores de virulencia de *S. aureus*, siendo en algunos casos, asociados a la gravedad de la infección que generan. Se ha demostrado que durante el cultivo *in vitro* del microorganismo, los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana se expresan preferentemente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los asociados a la secreción de enzimas son liberados en la fase estacionaria (Camusone y Calvino, 2013). Esta expresión diferencial de los factores de virulencia estaría relacionada con el proceso de infección; en primer lugar, las adhesinas de superficie reconocerían las estructuras del huésped facilitando la colonización, seguido de la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas.

Por otro lado, se ha postulado que, para lograr la persistencia intracelular, *S. aureus* debe evitar la respuesta inmune e inflamatoria del huésped, para lo que regularía negativamente la expresión de determinados factores de virulencia (Camusone y Calvino., 2013).

1.1.3.2. Estreptococos.

Son varias las especies de este género que se han asociado a infecciones de la glándula mamaria siendo *S. agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* las más frecuentemente aisladas. Son microorganismos grampositivos, catalasa negativo, que presentan una agrupación en cadenas en leche y son capaces de desarrollar en la leche.

S. uberis es uno de los patógenos más prevalente causante de mastitis clínica y subclínica en todo el mundo (Perrig y col., 2017). Se trata de un microorganismo ubicuo capaz de colonizar tanto a los animales como a su entorno y se ha localizado en labios, amígdalas y en la piel de los animales, tracto respiratorio, cavidad oral, rumen, orificio y canales del pezón y en ubres infectadas (Kromker y col., 2014).

El período seco es la parte más común del ciclo de producción en el que las vacas lecheras son más susceptibles a infecciones por *S. uberis*, las cuales frecuentemente se manifiestan como mastitis aguda durante la lactancia posterior (Kromker y col., 2014). Contrario a lo que ocurre con los patógenos contagiosos, cuya incidencia en casos de mastitis ha disminuido gracias a la implementación de medidas de control, las mismas resultan menos efectivas para controlar infecciones por patógenos ambientales, como es el caso de *S. uberis*. En consecuencia, las IIM causadas por este tipo de patógenos se han intensificado (Prado, 2011).

Varios son los factores de virulencia asociados a *S. uberis*. Se ha establecido que *S. uberis* es capaz de adherirse e invadir las células epiteliales mamarias. Estos eventos de adherencia e invasión pueden atribuirse a la molécula de adhesión a *S. uberis* (SUAM, del inglés *S. uberis Adhesion Molecule*), lo que da cuenta de la elevada prevalencia de este patógeno en hatos lecheros (Kromker y col., 2014). La adhesión del microorganismo al hospedador impide que el mismo sea eliminado durante el ordeño por lo que garantiza el establecimiento de la infección en el canal y, posteriormente, en la glándula mamaria. Se ha demostrado, además, que dicho microorganismo puede resistir la fagocitosis mediante la expresión de una cápsula de ácido hialurónico. Otros posibles factores de virulencia como una toxina neutrófila y el factor CAMP, se han vinculado a este patógeno (Prado y col., 2011). Sumado a esto, todas las cepas producen hialuronidasa libre que mejora la distribución del patógeno en los tejidos (Kromker y col., 2014).

Además, se ha expuesto que una vez producida la internalización de *S. uberis* en células epiteliales mamarias bovinas mediada por actina, el microorganismo es capaz de generar una transducción de señal en la célula hospedadora para desencadenar su propia “señal de internalización” en la célula blanco (Almeida, 1999b). También se ha comprobado que proteínas de la matriz extracelular ejercen una regulación y expresión positiva de factores de virulencia en *S. uberis*, lo que aumenta la colonización de células epiteliales mamarias y la persistencia dentro de las mismas (Almeida, 1999b). Esta capacidad de colonización de *S. uberis* le otorga una gran capacidad de protección, tanto frente a los mecanismos de defensa del hospedador como a los antibióticos.

1.1.3.3. Estafilococos Coagulasa Negativo.

Los estafilococos coagulasa negativos (SCN) son las bacterias más frecuentemente aisladas de leche bovina en todo el mundo. Son un grupo heterogéneo de numerosas especies con grandes diferencias en patogenicidad, ecología y epidemiología (Corbeil, 2019). Si bien han sido tradicionalmente considerados patógenos menores, su importancia ha aumentado porque se han convertido en el grupo de especies más frecuentemente aislado de leche bovina en muchas áreas del mundo (Raspanti y col., 2016). Es esta elevada incidencia por la que están siendo clasificados como patógenos emergentes de la mastitis bovina (Pyörälä y Taponen, 2009; Taponen y Pyörälä, 2009).

Son más de 50 las especies de SCN y quizás no es prudente valorar su comportamiento como grupo y si como especies individualmente. Si bien tradicionalmente han sido

considerados como patógenos menores, su patogenicidad y resistencia a tratamientos antimicrobianos varían dependiendo de la especie (Pyörälä y Taponen, 2009).

Aún cuando la prevalencia de especies de SCN causantes de mastitis bovina varía entre países, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hyicus* se han aislado con mayor frecuencia (Pyörälä y col., 2009; Raspanti y col., 2016; Corbeil y col., 2019).

Si bien los SCN suelen estar involucrados en infecciones de tipo subclínico y al aumento de células somáticas (Raspanti y col., 2016), también han sido asociados con infecciones persistentes y alta resistencia a la terapia con antibióticos (Breser y col., 2018). Esto puede deberse a que los SNC tienen una mayor tasa de mutación y permeabilidad a la transferencia horizontal de los factores de virulencia que otros patógenos asociados a la mastitis. Además, se sugiere que los SCN podrían actuar como reservorio o transporte de una gran variabilidad de factores de virulencia hacia patógenos de mastitis (Breser y col., 2018). En el caso de los SCN, la adherencia bacteriana también parece ser una primera etapa esencial para su internalización en el citoplasma de las células hospedadoras, mientras que a su vez se considera una importante estrategia de virulencia que permite a los microorganismos ocupar un microambiente separado de los mecanismos de defensa del hospedador (Souza y col., 2016).

Se ha demostrado epidemiológicamente que diferentes especies de SCN inducen respuesta inmune innata del huésped diferencial en la glándula mamaria murina (Souza y col., 2016). En general, los aislamientos del SCN se adhirieron e internalizaron más lentamente en células del epitelio mamario bovino en comparación con *S. aureus*. Aun así, estas características variaron fuertemente entre las diferentes especies de SNC y cepas, lo que sugiere que las capacidades de adherencia e internalización de SCN dependen de su hábitat y comportamiento epidemiológico. Sumado a esto, se reportó que muchos aislamientos de SCN provenientes de muestras de leche de bovinos con mastitis fueron formadores de biofilm, ya sean débiles, moderados o fuertes (Srednik y col., 2017). Aunque los biofilm no parecen afectar la gravedad de la enfermedad, pueden desempeñar un papel en la persistencia de SCN en el entorno intramamario (Tremblay y col., 2013). Además, los aislamientos de SCN que crecen dentro de biofilms son menos susceptibles a los antimicrobianos de uso común, por lo que la formación de biofilms por especies de SCN podría impedir la terapia antimicrobiana (Srednik y col., 2017).

1.1.3.4. Microorganismos Ambientales: Bacterias coliformes.

La fuente primaria de este tipo de patógenos es el hábitat de la vaca. Entre los microorganismos de este grupo es posible mencionar tanto a los bacilos entéricos gramnegativos *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. como también a grampositivos como *S. dysgalactiae* y *S. uberis* (Gomes y col., 2016).

Las bacterias gramnegativas *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. son habitantes normales del suelo e intestino de las vacas. Se acumulan y multiplican en la materia fecal y las camas, pudiendo causar una variedad de síntomas de la enfermedad, desde una simple inflamación local hasta severos cuadros de inflamación y muerte (Fernandez Bolaños y col., 2012). Una vez que las bacterias pasan el conducto del pezón durante la lactación, los mecanismos de defensa celular y humoral son los que determinan la supervivencia de la bacteria y la duración y severidad de la infección.

En el caso particular de *E. coli*, se reportó como principal factor de virulencia el lipopolisacárido. Además, el factor de necrosis tumoral α (TNF α , del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*) es una citoquina proinflamatoria capaz de provocar reacciones inflamatorias sistémicas y desencadenar la "respuesta de fase aguda" en la mastitis provocada por coliformes (Wang, 2016).

Dentro de este grupo, también podemos encontrar algunas levaduras causantes de mastitis como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*. Alrededor del 80% de las mastitis ocasionadas por estos hongos son casos relacionados con una terapia de antibióticos inmoderada o como consecuencia de heridas en los pezones.

1.1.4. Medidas de Control y Prevención de Mastitis Bovina.

1.1.4.1. Control de Mastitis Bovina.

El control de la mastitis se basa en un programa que abarca medidas higiénicas y de manejo del rodeo, de manera de reducir al máximo la necesidad de recurrir al tratamiento con antibióticos. Este plan, recomendado por el Consejo Nacional de Mastitis de Estados Unidos (*National Mastitis Council*, en inglés), implica llevar a cabo los 10 puntos que se indican a continuación:

1. Establecer objetivos para la salud de la ubre.
2. Mantener limpio, seco y confortable el ambiente

3. Adecuado procedimiento de ordeño.
4. Adecuado mantenimiento y uso del equipo de ordeño.
5. Buen registro de datos.
6. Apropiado manejo de mastitis clínica durante la lactancia.
7. Efectivo manejo de vaca seca.
8. Mantenimiento de la bioseguridad para patógenos contagiosos y comercialización de vacas crónicamente infectadas.
9. Regular monitoreo del estatus de la salud mamaria.
10. Revisión periódica del programa de control de mastitis.

Además de seguir las recomendaciones anteriores, resulta necesario dentro de la rutina de ordeño, seguir prácticas que comprendan lavado de la glándula, secado de la misma y sellado de pezones con solución desinfectante, con el objeto de eliminar las bacterias que hayan sido depositadas en la piel durante el ordeño. Esta metodología, conocida como *post-dipping* es simple y efectiva para prevenir nuevas infecciones por patógenos contagiosos. Consiste en el baño de pezones con formulaciones comerciales que suelen contener desinfectantes diluidos (0,5-1,0% de yodo), acondicionadores o emolientes para la piel de los pezones, así como surfactantes. Durante este procedimiento, se debe cubrir al menos dos tercios del pezón (toda la superficie que estuvo en contacto con la pezonera) y su aplicación puede realizarse mediante pulverización (spray) o inmersión. (Klostermann y col., 2010).

Por otro lado, en lo referido al control de los patógenos contagiosos, resulta efectivo y económicamente rentable, el tratamiento intramamario de todos los cuartos y de todas las vacas después del último ordeño de la lactación con una formulación antibiótica comercial específicamente preparada para ser usada en la vaca seca. El objetivo principal de la terapia de secado se basa en reducir la prevalencia de infecciones intramamarias, ya sea eliminando las existentes como también evitando que se produzcan nuevos casos durante el período seco (Scherpenzeel y col., 2018).

1.1.4.2. Tratamiento de la Mastitis Bovina.

Si bien las prácticas de manejo actuales, como la higiene adecuada del ordeño y la menor exposición a patógenos ambientales contribuyen a disminuir la aparición de mastitis bovina, el tratamiento de esta enfermedad se basa, en gran medida, en el uso de antibióticos, tanto para la profilaxis como para la terapia (Pellegrino y col., 2010), aunque éstos no siempre son

eficaces.

El tratamiento antibiótico se basa en la utilización de formulaciones intramamarias, las cuales pueden contener una única droga o bien una combinación de ellas. Tal es el caso de la neomicina, que ha sido utilizada como principal ingrediente en preparaciones combinadas por su amplio espectro de acción. Por la acción de la eritromicina contra *S. aureus*, la actividad sinérgica y antifúngica de la polimixina B, y dado que la bacitracina y penicilina G refuerzan la actividad de la neomicina, han sido empleadas en dichas formulaciones. En la mayoría de los casos, cuando un cuarto clínicamente afectado es tratado con antibióticos, este responde en un día o dos y la mayoría de las infecciones son eliminadas. Esto generalmente es válido para la mayoría de infecciones causadas por estreptococos y SCN pero no así para *S. aureus*. En este último caso, el porcentaje de eliminación de la IIM es variable.

Cuando se presentan casos de mastitis, la leche de los cuartos tratados con formulaciones antibióticas es descartada. No obstante, el animal sigue en el rodeo y se continúa el ordeño en los cuartos no infectados. Este tipo de terapia da lugar a una serie de consecuencias indeseadas como la presencia de restos antibióticos en leche y la selección de cepas resistentes, convirtiendo así a las vacas en reservorio de microorganismos contagiosos potencialmente peligrosos para todo el rodeo (Pellegrino y col., 2011; Espeche y col., 2012., Gomes y col., 2016). Actualmente, existe una presión global para limitar la terapia con antibióticos en el ganado lechero con el objetivo de reducir la incidencia de los residuos de medicamentos en la leche para producir alimentos seguros (Pellegrino, 2016).

El tratamiento con antibióticos es un componente establecido de programas de control de mastitis; sin embargo, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, eficaces en el control y tratamiento de la mastitis bovina, es un desafío global, actual y apremiante (Gomes y col., 2016).

1.1.4.3. Medidas Alternativas de Control y Prevención de Mastitis Bovina.

1.1.4.3.1. Vacunas.

Como se ha mencionado previamente, por las desventajas que representa el uso de antibióticos de manera preventiva en el control de la mastitis bovina, resulta necesario el desarrollo de nuevos y eficaces métodos de manejo de la enfermedad. En tal sentido, la aplicación de vacunas se presenta como una alternativa interesante para el control de esta

infección. Esta estrategia contribuye, por un lado, a disminuir la frecuencia y severidad de los casos de mastitis clínica así como también a eliminar la mastitis crónica. La vacunación tiene como principal objetivo lograr un aumento en la concentración de anticuerpos opsonicos en sangre y leche contra un determinado microorganismo, de manera de inhibir su crecimiento y la producción de toxinas (Pellegrino y col., 2008; Pellegrino y col., 2010). Aunque la vacunación es una práctica común para el control de muchas enfermedades infecciosas, todavía no es una medida profiláctica importante contra la mastitis bovina. Una vacuna profiláctica exitosa debería provocar respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares en individuos inmunizados (Pellegrino y col., 2016).

Se han desarrollado algunas vacunas contra la mastitis por *S. aureus*, pero todas presentaron una eficacia limitada. Entre las causas probables de su ineficacia, es posible mencionar los esquemas de inmunización inadecuados, la formulación de adyuvantes ineficaces y el rango limitado de protección. Este último punto es crucial en la formulación de una vacuna, ya que es importante que la misma sea capaz de proteger contra una amplia gama de cepas que pueden estar presentes en un rodeo o bien de cada vaca (Gomes y col., 2016).

Algunas de las vacunas más estudiadas son: i) “REDUMAST”, elaborada con antígenos capsulares extraídos de cepas patógenas de *S. aureus* (Giraud y col., 1997); ii) “J5”, elaborada con la bacteriocina de la cepa de *E. coli* J5 que la transforma en la vacuna para mastitis ambiental (contra coliformes) más probada en el mundo (Hogan y col., 1992); iii) “MASTIVAC I”, compuesta por tres cepas de campo de *S. aureus* (Leitner y col., 2011); iv) “STARTVAC”, elaborada con la cepa de *E. coli* J5 inactivada más la cepa inactivada de *S. aureus* (CP8) cepa SP140 que expresa un complejo antigénico asociado a exopolisacárido (Prenafeta, 2010); y v) “cepa mutante avirulenta *S. aureus* RC122” (Pellegrino y col., 2008; Pellegrino y col., 2010).

1.1.4.3.2. Probióticos.

Los productos probióticos se propusieron como una alternativa válida a las terapias con antibióticos y también son útiles para la prevención de síndromes infecciosos.

En la actualidad, existe una tendencia mundial basada en la producción de leche en tambos orgánicos, donde lo que se busca es reemplazar el uso de antibióticos al secado por una variedad de productos naturales capaces de mejorar la salud de la ubre (Dallard y col., 2011). En este contexto, las bacterias probióticas son actualmente consideradas como una

alternativa para la prevención de la mastitis bovina (Espeche y col., 2012; Armas y col., 2017). Para este propósito, las bacterias ácido lácticas (BAL) y sus péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) son buenos candidatos debido a que son generalmente reconocidos como seguros (GRAS, del inglés *Generally Recognized As Safe*) y a sus comprobadas propiedades inhibitorias (Bouchard y col., 2015; Armas y col., 2017). Se conoce que las BAL son capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos por la producción de diferentes compuestos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos (Diepers y col., 2016). Además, la adhesión a células epiteliales y la colonización del epitelio, la competencia por los nutrientes y la modulación de la respuesta inmune del hospedador, son mecanismos inhibidores de las BAL cuando se administran en la glándula mamaria bovina (Diepers y col., 2016).

Desde 2007, en el Laboratorio de Genética Microbiana de la Universidad Nacional de Río Cuarto se realiza el aislamiento y la caracterización de BAL de muestras de leche de glándula mamaria de animales sanos y con mastitis clínica y subclínica de las provincias de Tucumán y Córdoba con el objetivo de diseñar un producto probiótico para prevenir la mastitis bovina. La determinación de propiedades benéficas tales como inhibición a patógenos, auto-agregación, adherencia, producción de sustancias antagónicas, permitió la selección de cepas con propiedades adecuadas para ser incluidas en un producto veterinario para la prevención de la mastitis bovina (Espeche y col., 2009; Frola y col., 2012; Espeche y col., 2012). Se destaca una cepa de *Lactobacillus perolens* (*L. perolens* CRL1724) que demostró capacidad *in vitro* para adherirse a células del canal de pezón bovino y de co-agregar con microorganismos causantes de mastitis bovina (Espeche y col., 2009; Frola y col., 2012; Frola y col., 2013). Asimismo, *L. perolens* CRL1724 no produjo signos clínicos o daño del pezón ni de la ubre luego de su inoculación y se mantuvo viable en las ubres hasta el final del ensayo (Frola y col., 2012; Frola y col., 2013).

1.1.4.3.3. Nanopartículas.

La síntesis y aplicación de nanopartículas (NPs) representan un área de marcado interés actual debido a sus propiedades catalíticas, electrónicas, magnéticas, químicas, fotoelectroquímicas y ópticas únicas. Las mismas pueden atribuirse a su pequeño tamaño (<100 nm), estructura, morfología y reactividad de la superficie, grupos y recubrimientos, solubilidad, composición química, cristalinidad y propiedades electrónicas (Hulkoti y Taranath, 2014).

Además, se ha demostrado que estos nanomateriales pueden tener un uso potencial en aplicaciones biomédicas como “nanoantibióticos” para el control de infecciones causadas por diversos microorganismos patógenos, como así también para el control y resolución de episodios de mastitis bovina (Hun y Kwon., 2011). La capacidad microbicida de las NPs está vinculada a la naturaleza del material y a las características intrínsecas de las mismas, como sus dimensiones nanométricas, lo cual les permite ser internalizadas con mayor facilidad en microorganismos, y su alta relación área/volumen que permite un mayor contacto e interacción con los microorganismos (Hajipour y col., 2012).

Se ha reportado el uso de NPs lipídicas sólidas de tilmicosina (antibiótico macrólido) contra *S. aureus* (Wang y col., 2012) y la actividad de NPs de amoxicilina (antibiótico semisintético derivado de la penicilina) contra *S. aureus*, *E. coli*, y *S. agalactiae* (Yang y col., 2009). Además, se evidenció la capacidad de NPs de óxido nítrico (NO) para inhibir una cepa *S. aureus* multirresistente aislada de mastitis bovina (Cardozo y col., 2014). También se ha comparado la actividad bactericida de violaceína (pigmento natural) y sus NPs documentándose que estas últimas fueron más eficientes que la misma violaceína frente a *S. aureus* aislado de mastitis (Berni y col., 2013). En conclusión, los agentes antimicrobianos nanoestructurados o encapsulados en nanopartículas se posicionan entre las posibles estrategias para controlar y prevenir la mastitis bovina (Gomes y col., 2016). Asimismo, NPs metálicas han adquirido relevancia por la conocida actividad antimicrobiana de sus componentes.

1.2. Nanopartículas de Plata.

Las nanopartículas metálicas, entre las que se encuentran las nanopartículas de plata (AgNPs), se han utilizado ampliamente en innumerables aplicaciones tecnológicas debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas mejoradas, novedosas y notables en comparación con su contraparte a granel (Shivakumar y col., 2017). De este modo, las AgNPs desempeñan un rol importante en el campo de la biología y la medicina gracias a sus atractivas propiedades físicoquímicas (Sadeghi y col., 2015).

Los recientes avances en el campo de la nanotecnología han permitido producir plata pura bajo la estructura de nanopartículas. Las mismas pueden definirse como partículas sólidas con un tamaño menor a 100 nm (Hulkoti y col., 2014). Es de importancia resaltar que la plata metálica se ha utilizado desde hace tiempo como agente terapéutico gracias a sus características microbicidas, aunque dicho uso se ha visto interrumpido debido a la toxicidad

del metal. Cabe destacar, a su vez, que las AgNPs exhiben una eficacia antimicrobiana mayor que los iones plata (Lara y col., 2010).

Este escenario, ha propiciado la evaluación de la capacidad microbicida de las AgNPs en una amplia variedad de microorganismos, lo que ha permitido evidenciar propiedades antibacterianas de amplio espectro sobre bacterias grampositivas y gramnegativas y que no contribuirían al desarrollo de cepas resistentes (Benakashani, 2016). De este modo, las AgNPs presentan un gran potencial para ser ampliamente utilizadas contra bacterias resistentes a los antimicrobianos (Dos Santos Courrol, 2018).

Las AgNPs han mostrado poseer un marcado efecto biocida en al menos 12 especies de bacterias, incluyendo bacterias multirresistentes como *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, *E. coli* O157:H7, resistente a ampicilina y *Streptococcus pyogenes* resistente a eritromicina (Lara y col., 2011). Las AgNPs exhibieron, además, un efecto sinérgico con antibióticos que inhiben la traducción de proteínas, como la eritromicina, contra *S. aureus* (Kazemi y col., 2014).

Asimismo, una de las características destacables que hace atractiva la aplicación terapéutica de las AgNPs, es la baja probabilidad del desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos (Hajipour y col., 2012).

Este panorama ha abierto las puertas de la nanotecnología al desarrollo de estrategias completamente nuevas de síntesis y aplicación de plata pura en dimensiones nanométricas frente a una amplia gama de patógenos, en particular de microorganismos multirresistentes que son difíciles de tratar con los antibióticos disponibles. Así, estas NPs se presentan como un candidato interesante para su aplicación como microbicidas no convencionales debido a su eficacia en pequeñas dosis. (Lara y col., 2010).

1.2.1. Síntesis de Nanopartículas de Plata.

Diferentes metodologías se han desarrollado para la obtención de nanopartículas metálicas, ya sea mediante técnicas *bottom-up* (de abajo hacia arriba) o *top-down* (de arriba hacia abajo). En el primer caso, estructuras complejas son construídas a partir de otras más simples mediante, por ejemplo, técnicas de autoensamblado. Por otra parte, en los métodos *top-down* se parte de sistemas de complejidad o tamaño mayores y éstos se van reduciendo hasta alcanzar las dimensiones deseadas. Sin embargo, la rapidez, simpleza y calidad de las nanoestructuras obtenidas, convierte a los métodos *bottom-up* en los más empleados para la síntesis de nanopartículas (Flores, 2014).

Para la preparación y la estabilización de las NPs se emplean, por lo general, de métodos físicos y químicos. Sin embargo, en los últimos años ha tomado relevancia la aplicación biotecnológica de microorganismos y/o sistemas biológicos en la producción de NPs metálicas (Iravani, 2011; Ashokkumar, 2015; Daphedar y Taranath., 2017; Lopes y Courrol, 2018; Dos Santos Courrol, 2018).

Entre los métodos químicos pueden destacarse la reducción química, las técnicas electroquímicas y fotoquímicas; siendo la primera, la estrategia más empleada para la síntesis de AgNPs. En los métodos de síntesis basados en la reducción del precursor metálico (por ejemplo, AgNO_3) mediante un agente reductor, las reacciones se llevan a cabo generalmente en presencia de un agente estabilizante, el cual tiene la función de recubrir la superficie de las NPs y así, favorecer el control del tamaño de las mismas y evitar su aglomeración (Flores, 2014). Entre los métodos de reducción química para la obtención de AgNPs se destaca el de Turkevich, el cual involucra un mecanismo de nucleación, crecimiento y estabilización de las NPs a partir de la reducción de una sal de plata usando citrato de sodio como agente reductor y estabilizante (Turkevich y col., 1951; Lee y Meisel, 1982; Gorup y col.; 2011).

Dentro de los métodos físicos se destacan aquéllos en los que la síntesis de las AgNPs se lleva a cabo mediante la condensación de la fase vapor de un metal sobre un soporte sólido o la fotorreducción de iones plata (Flores, 2014).

Sin embargo, la mayoría de los métodos físico-químicos utilizados en la síntesis de nanopartículas metálicas involucran solventes tóxicos y la generación de residuos potencialmente dañinos para la salud y el medio ambiente (Daphedar y Taranath, 2017; Lopes y Courrol, 2018). En vista de esta situación, hay un gran interés en la búsqueda de procesos sintéticos más seguros, económicos y ambientalmente amigables. Así, los protocolos de síntesis de NPs mediante métodos biológicos utilizando microorganismos, enzimas y extractos acuosos de plantas han surgido como una alternativa *green* a los métodos químicos y físicos tradicionales (Daphedar y Taranath, 2017).

Hasta el momento, microorganismos tales como bacterias (*Klebsiella pneumonia*, *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, *P. aeuroginosa*), hongos (*Penicillium fellutanum*, *Fusarium oxysporium*), actinomicetos (*Thermomonospora* sp.) y levaduras (*Yarrowia lipolytica*) han sido empleados para la generación de AgNPs (Thakkar y col., 2010; Nazeruddin y col., 2014; Quinteros y col., 2016a).

Por otro lado, los extractos de plantas pueden usarse como fuentes de agentes reductores y estabilizantes para la biosíntesis de AgNPs, reduciendo de este modo, el uso de compuestos

químicos comerciales (Wang, 2018). Las NPs provenientes de este tipo de síntesis muestran generalmente biocompatibilidad y biodegradabilidad, bajo costo de producción y alto rendimiento. Diferentes estudios revelan que los metabolitos secundarios de las plantas presentes en los extractos son los principales agentes responsables de la reducción del ion metálico y la formación de las NPs (Wang, 2014). Asimismo, estos fitoquímicos son los responsables de su modificación superficial, lo que permite la estabilización de las NPs coloidales evitando la agregación posterior (Lopes y Courrol, 2018). En tal sentido, extractos acuosos vegetales de hoja verde (*Avena sativa*, *Jatropha curcas*, *Geranium*, *Ocimum tenuiflorum*, *Cichorium intybus*) han permitido la producción de NPs metálicas con alta estabilidad debido a la presencia de agentes reductores y estabilizantes tales como ácidos orgánicos, polifenoles y flavonoides, los cuales son los fitocompuestos mayoritarios de los extractos obtenidos (Thakkar y col., 2010; Nazeruddin y col., 2014; Gallucci y col., 2017; Jain, 2017).

La biosíntesis de AgNPs es un método compatible con los principios de la química verde, diferenciándose de la síntesis por reducción química la cual puede dar lugar a la absorción/adsorción de compuestos químicos agresivos en la superficie de las NPs elevando su toxicidad. Debido a las ventajas mencionadas que presenta la biosíntesis de NPs, dicho procedimiento sintético sigue siendo ampliamente estudiado a nivel laboratorio y ha comenzado con su escalado industrial.

1.2.2. Mecanismo de Acción de las AgNPs.

En la actualidad, numerosas investigaciones han reportado la actividad antimicrobiana de nanomateriales de plata contra diferentes microorganismos patógenos. A pesar de ello, no se ha podido establecer claramente el mecanismo de acción por el cual este tipo de nanomaterial lleva a cabo su efecto. Las AgNPs intervienen en una amplia gama de procesos moleculares dentro de los microorganismos, los cuales resultan en diversos efectos como la inhibición del crecimiento, la pérdida de infectividad y la muerte celular. A su vez, dichos efectos dependen de la forma, tamaño y concentración de las NPs y la sensibilidad de la especie microbiana a la plata (Rai y col., 2009).

Resultados obtenidos por Lok y col. mediante el empleo de la proteómica, mostraron un efecto de las AgNPs sobre la expresión de proteínas de la membrana interna de *E. coli* sugiriendo que un posible sitio de acción de estos nanocompuestos es la membrana celular (Lok y col., 2006). Acorde a esto, se ha reportado que los microorganismos expuestos a

AgNPs presentan rugosidad y ruptura en los componentes de la membrana plasmática y en algunos casos, fragmentación del ADN. De este modo, el aumento de la permeabilidad de las membranas celulares permitiría a las AgNPs penetrar en la célula y causar la muerte celular mediante la ruptura del ADN doble cadena (Tamboli y Lee, 2013).

Otro mecanismo propuesto indica que las AgNPs están involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) *vía* reacción de Fenton, en la cual las NPs reaccionan con oxígeno o agua y Fe(II) libre (Quinteros y col., 2016b). La superficie de las AgNPs podría oxidarse para liberar Ag(I), induciendo la formación de ERO y, como consecuencia, se puede desencadenar en la célula un estado de estrés oxidativo (Zheng, K. y col., 2018). Si bien los microorganismos pueden desarrollar diversos mecanismos de protección para contrarrestar los efectos de ERO, como la producción de enzimas reparadoras y antioxidantes, un escenario de estrés oxidativo puede ocasionar diversas disfunciones en la membrana lipídica, proteínas y ADN que conducen a la muerte de los microorganismos (Quinteros y col., 2016b).

Además, se ha demostrado que cuando las AgNPs interactúan con las bacterias son capaces de producir el deterioro de la actividad flagelar e inducir la degradación del ADN, lo que las hace responsables de la inhibición bacteriana. Dentro de las bacterias, las NPs esféricas interactúan y destruyen los componentes que contienen azufre y fósforo, como proteínas y ADN, e interrumpen la morfología de la membrana, lo que lleva finalmente a la muerte celular (Dos Santos Courrol, 2018).

1.2.3. Citotoxicidad de AgNPs.

La nanoterapéutica ofrece la posibilidad de controlar la colonización mamaria mediante el uso de sistemas nanoestructurados con propiedades biocidas y antiadherentes (Cioffi y Rai, 2012). Sin embargo, estas propiedades biológicas deseables de las AgNPs podrían presentar conflicto dada su posible toxicidad frente a células del epitelio mamario bovino, la cual conllevaría a un detrimento no deseado en la proliferación normal y funcionalidad de dichas células. En tal sentido, el desarrollo de la nanotecnología debe ir acompañado de estudios de biocompatibilidad que permitan conocer los efectos que los (bio)nanomateriales en auge van a tener tanto en los sistemas biológicos como en el medio ambiente (Kumar y col., 2018; Adabi y col., 2017).

En la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de aplicación veterinaria a partir de productos en la escala nanométrica, resulta relevante la evaluación de su potencial

citotoxicidad. En la actualidad, la toxicología cuenta con una gran variedad de bioensayos que pueden ser utilizados para estudiar la seguridad biológica de novedosos nanomateriales (Ganguly y col., 2018). La metodología empleada comprende ensayos *in vivo* que utilizan animales de experimentación (mamíferos, anfibios, aves) y ensayos *in vitro* que pueden emplear organismos inferiores (microorganismos, moluscos), reacciones bioquímicas (enzimas, receptores), cultivos celulares (animales y humanos) y órganos aislados (Adabi y col., 2017).

Debido al alto costo de los ensayos *in vivo* y sus implicancias éticas, los métodos *in vitro* han experimentado un gran desarrollo como “alternativa a la experimentación animal”. Dentro del espectro de ensayos *in vitro* que se utilizan para estudiar la toxicidad aguda de una sustancia dada, se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, los cuales utilizan cultivos celulares primarios u órganos aislados como así también como líneas celulares establecidas. Se entiende por citotoxicidad celular como la alteración en la estructura y/o funciones celulares básicas que lleva a la producción de un daño que puede ser detectado a través de la proliferación y/o supervivencia celular (Repetto Jimenez y col., 2009). Los ensayos *in vitro* evalúan respuestas inmediatas o de corto plazo y se basan generalmente en la utilización de métodos colorimétricos para tal fin (Ganguly y col., 2018). Estos métodos miden la viabilidad de las células mediante la captación o formación de un colorante por parte de alguna organela celular que permanece funcional luego de la exposición a la sustancia a ensayar; por lo que, la pérdida de viabilidad indica efectos intracelulares dañinos por parte de la sustancia, que suceden con anterioridad a cualquier daño que pueda producir en la membrana celular. La cuantificación de la citotoxicidad permite determinar el valor de concentración que provoca daño celular evidente al 50% de los cultivos tratados (concentración citotóxica media, CC_{50}).

El valor predictivo de los estudios de citotoxicidad se basa en la idea que cuando se afectan funciones celulares básicas, que son comunes a todas las células, la determinación del daño celular es una medida aproximada de la toxicidad general del nanomaterial a ensayar.

1.3. Interacción con Membranas.

1.3.1. Composición de la Membrana Bacteriana.

La membrana plasmática es la estructura central en todos los tipos celulares y se encuentra recubriendo la superficie celular. Posee una estructura altamente compleja y estratificada cuya matriz estructural es la bicapa lipídica, incorporando junto a ésta otras macromoléculas como proteínas. Esta bicapa es una delgada lámina con propiedades mecánicas y eléctricas que difieren de cualquier otro sistema material conocido (Birdi, 1989). Los fosfolípidos son los componentes básicos de todas las membranas biológicas, tanto de procariontas como eucariotas. Son moléculas anfipáticas con un grupo de cabeza polar (región hidrofílica) y una cola apolar (región hidrofóbica). Cuando se colocan en agua, espontáneamente se agrupan en una bicapa con sus grupos de cabeza que tienen fosfatos en el exterior, en contacto con el agua, y sus colas hidrocarbonadas en el interior, en contacto unas con otras.

La doble capa mantiene su estructura mediante interacciones hidrofóbicas y de van der Waals entre las cadenas lipídicas. Si bien el medio acuoso exterior puede variar ampliamente en fuerza iónica y pH, la bicapa tiene suficiente fuerza para conservar su estructura característica.

Los constituyentes lipídicos mayoritarios de las membranas son fosfoglicéridos, esfingolípidos y esteroides, diferentes en cuanto a estructura química, abundancia y funciones en la membrana.

Las proteínas de membrana se definen según su ubicación dentro o en la superficie de la bicapa lipídica. En base a esto, es posible clasificarlas como proteínas integrales, cuando atraviesan la doble capa de lípidos o periféricas si se unen a la membrana indirectamente, ya sea a través de interacciones con las proteínas integrales, o bien, directamente por interacciones con los grupos de cabeza de los lípidos.

Los lípidos y las proteínas son los componentes mayoritarios de las membranas, la conjugación de ambos en complejos supramoleculares es primordial para que se lleven a cabo diversos procesos biológicos, homeostasis celular, regulación y fluidez en la membrana, lo cual es de importancia para la respuesta al ambiente externo.

1.3.2. Rol de la Membrana Lipídica.

Actualmente se acepta que las células son sistemas confinados y compartimentalizados por membranas, las cuales actúan como una barrera semipermeable permitiendo el intercambio selectivo de ciertas sustancias entre el interior (medio intracelular) y el exterior (espacio extracelular) de las mismas.

La comprensión de los fenómenos de asociación de péptidos y proteínas a la membrana, así como la posibilidad de desarrollar membranas sintéticas capaces de mimetizar las propiedades de las membranas naturales, son de importancia crítica en el desarrollo de nuevas tecnologías terapéuticas tanto humanas como de importancia veterinaria.

Membranas miméticas (monocapas y liposomas) se pueden utilizar como modelo para el estudio de la potencial aplicación de las AgNPs y la posible toxicidad para las células huésped (Hollmann y col., 2018), ya que es un requisito crucial para cualquier antimicrobiano que quiera utilizarse como agente terapéutico evaluar su toxicidad selectiva, actuando sólo en microorganismos y conservando la integridad de las células huésped.

1.3.3. Bicapa Lipídica de Diferentes Células.

Las membranas de células procariotas y eucariotas difieren considerablemente en la composición lipídica y este aspecto es particularmente importante para la acción de cualquier antimicrobiano.

La superficie de la membrana de las bacterias exhibe una carga neta más negativa que la de las células de mamíferos. Las membranas bacterianas son ricas en fosfolípidos, tales como fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL). Asimismo, la pared celular también contiene moléculas aniónicas, como lipopolisacáridos (LPS) en la membrana externa de bacterias gramnegativas y ácidos teicoicos y lipoteicoicos en el peptidoglicano de bacterias grampositivas que contribuyen a su carga neta negativa. (Figura 1). Además, las membranas plasmáticas eucariotas carecen de PG, por lo que, las bicapas o monocapas que contienen en PG y CL (generalmente adicionados con lípidos zwitteriónicos, en relaciones estequiométricas) se consideran como un modelo confiable para mimetizar las membranas bacterianas y estudiar la afinidad de los potenciales antimicrobianos por ese tipo de membranas (Shireen y col., 2015).

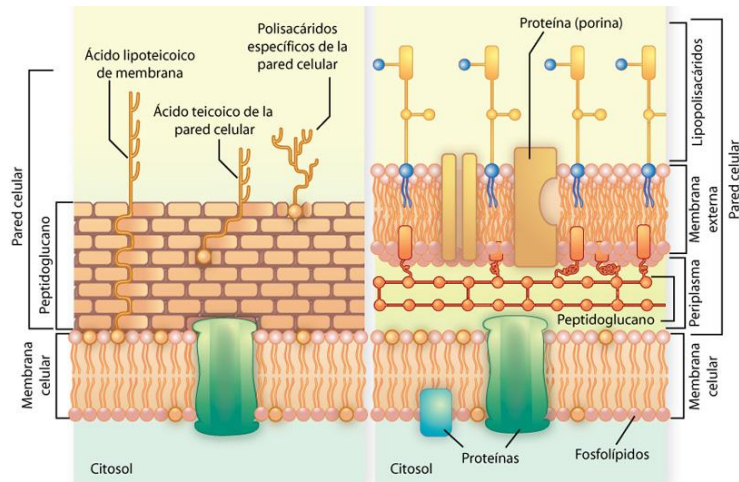


Figura 1: Esquema de la membrana plasmática en bacterias grampositivas (izquierda) y gramnegativas (derecha). Modificado de Cavallini, 2005.

En células de mamífero, los lípidos más abundantes son la fosfatidilcolina (PC) y la esfingomiélna (SM), que poseen cargas netas cercanas a cero (lípidos zwitteriónicos) (Figura 2). Por lo tanto, membranas enriquecidas en PC y SM se consideran como un modelo fiable para mimetizar la membrana de células de mamíferos y así evaluar la citotoxicidad de las AgNPs (Teixeira y col., 2012).

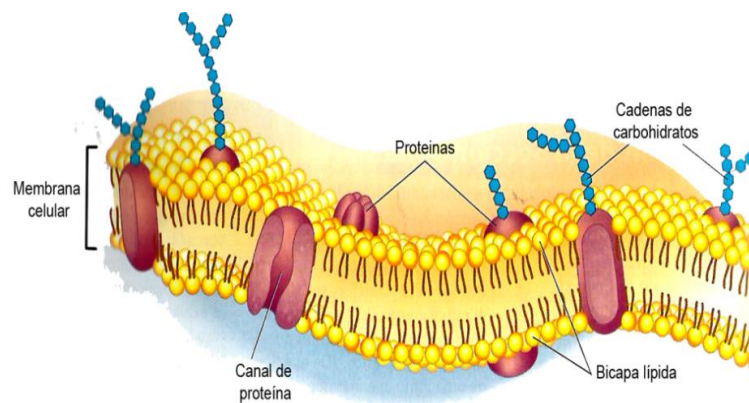


Figura 2: Esquema de la membrana plasmática en células eucariotas. Modificado de Tortora y col., 2007.

1.3.4. Sistemas Modelos de Membrana.

Las membranas celulares son entidades complejas con una gran variedad de lípidos y proteínas, por lo que trabajar con células vivas y observar lo que sucede *in situ* es intrincado, permitiendo solamente investigar fenómenos globales.

Por lo tanto, si estamos interesados en aspectos específicos de un fenómeno biológico que ocurre a nivel de la membrana, los sistemas modelos de membranas, como *monocapas* y *liposomas*, resultan más sencillos para controlar variables particulares. Físicamente, las membranas modelo son sistemas simples, compuestos de fosfolípidos, esfingolípidos o esteroides, que presentan las características más importantes de la membrana celular (Nicoli y col., 2010). Estos sistemas modelo han sido usados ampliamente en las últimas décadas para explorar los mecanismos de acción antibacteriano de péptidos y nanomateriales (Domingues y col., 2012; Melo y col., 2012; Nobre y col., 2015; Maya Girón y col., 2016).

En presencia de agua, las colas hidrofóbicas de los lípidos tienden a interactuar entre sí creando un espacio hidrofóbico del que el agua es excluida y en el que pueden quedar atrapadas otras moléculas hidrofóbicas, mientras que las cabezas polares interactúan con el agua y se encuentran hidratadas, preservando de este modo a la región hidrofóbica del contacto con el agua. Este efecto es el responsable de que, en presencia de agua, los lípidos anfipáticos tengan la importante propiedad de autoestructuración, la cual puede dar lugar a diferentes tipos de estructuras tales como monocapas, liposomas (bicapas) y micelas.

Las monocapas lipídicas, también llamadas monocapas de Langmuir, se forman en la interfase aire-agua. Su formación es sencilla y se basa en la naturaleza anfipática de las moléculas que la constituyen. En el caso de los fosfolípidos, principal componente de las membranas celulares, tienen en su estructura una región hidrofóbica o apolar con una o varias cadenas alifáticas, que se ubican apuntando al aire, y una región hidrofílica o polar constituidas por las cabezas del fosfolípido, que permanecen en contacto con la subfase líquida (Bohinc y col., 2014). Este modelo de membrana hace posible evaluar el efecto de un compuesto o material de interés en la transición de fase de la película lipídica, proporcionando información sobre los cambios en el empaquetamiento de los lípidos inducidos por tal compuesto o material. La ventaja de la utilización de monocapas reside en que la disposición y el empaquetamiento de las moléculas lipídicas se pueden medir y modular fácilmente, lo que permite con cierta facilidad controlar la composición y densidad de la capa lipídica (Knobloch y col., 2015).

Otro sistema que se utiliza como modelo de membrana lipídica son los liposomas, definidos como partículas coloidales cerradas en suspensión. Los liposomas pueden clasificarse de acuerdo a su tamaño y laminaridad, como MLVs (del inglés *Multi-Lamellar Vesicles*, tamaño variable, pueden ir desde 100 a 1000 nm), GUVs (del inglés *Giant Unilamellar Vesicles*, entre 1 y 50 μm), LUVs (del inglés, *Large Unilamellar Vesicles*, entre los 100 y 500 nm) y SUVs (del inglés, *Small Unilamellar Vesicles*, <100 nm de diámetro)

(Jorgensen y col., 2017) (Figura 3). El uso de los distintos tipos de vesículas dependerá del sistema experimental con el que se desee trabajar. Por ejemplo, para ciertas aplicaciones de microscopía es conviene utilizar GUVs ya que su tamaño permite su correcta visualización, mientras que, para otros tipos de ensayos, como por ejemplo los de fluorescencia, es conveniente usar vesículas de menor tamaño, como los LUVs.

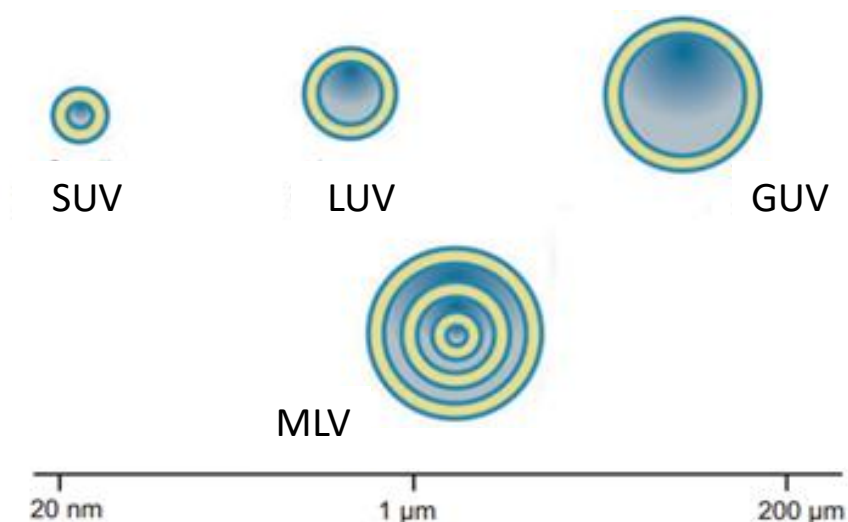


Figura 3: Representación esquemática de la clasificación aplicado para liposomas. Modificado de Jesorka y Orwar, 2008.

Las propiedades funcionales y estructurales de estas vesículas dependen de i) los fosfolípidos constituyentes, los cuales son de carácter anfipático y generalmente presentan estructura molecular cilíndrica (exponiendo áreas similares en el grupo de cabeza polar y las cadenas hidrocarbonadas constituyentes), la que favorece la formación de estructuras tipo bicapas (Figura 4); y ii) el método de preparación. Estos ensamblajes lipídicos son principalmente utilizados como: i) membranas modelo, permitiendo estudios termodinámicos, cinéticos y de mecanismos biológicos; y ii) vehículos, facilitando el transporte y liberación de solutos encapsulados, lo cual es importante a la hora de evaluar el potencial farmacológico de nuevos compuestos o materiales en estudio.

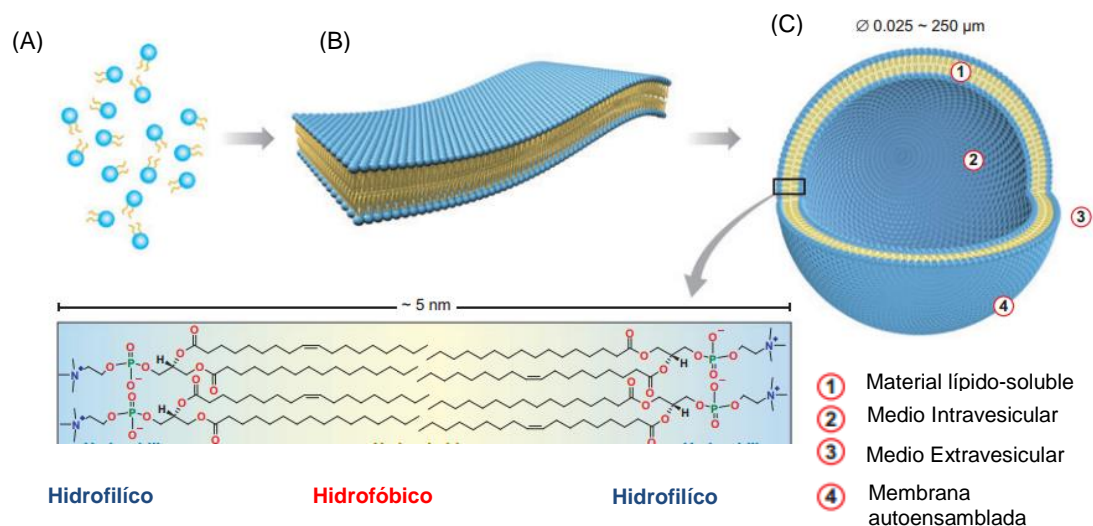


Figura 4: Esquema del proceso fundamental de auto-ensamblaje. A partir de fosfolípidos individuales (A) se genera una membrana bicapa (B), seguido de la formación de liposomas (C). Una bicapa simple tiene típicamente ~5 nm de espesor y consta de lípidos individuales dispuestos individualmente con sus colas hidrofóbicas enfrentadas entre sí y sus grupos de cabeza hidrófilicas mirando hacia el medio acuoso interno y externo. Modificado de *Jesorka y Orwar, 2008*.

1.4. Estrés Oxidativo.

1.4.1. Concepto de Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo puede definirse como una condición causada por las altas concentraciones intracelulares de ERO, denominadas también ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*. Los organismos aeróbicos utilizan el O_2 en la oxidación de nutrientes para obtener energía. Los subproductos de la reducción del O_2 , como el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\bullet}), se generan continuamente en células con metabolismo aeróbico (Poljsak y col., 2013).

Las células, ya sean procariontas o eucariotas, para mantener el equilibrio redox, cuentan con mecanismos de defensa encargados ya sea, de mantener la concentración de los radicales libres en niveles aceptables, o bien reparar los daños oxidativos que producen los mismos. Cuando la capacidad de éstos se ve superada por el daño oxidativo, y en consecuencia ocurre un desequilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros o por reducción de los últimos, se genera lo que se conoce como “estrés oxidativo” (Sies, 2013).

Durante los procesos metabólicos bacterianos, diferentes sustancias son capaces de afectar la producción de ERO alterando de este modo el equilibrio oxidativo. Tal es el caso de algunos antibióticos, ya que existe evidencia de que el mecanismo de muerte celular de éstos involucra la producción de ERO (Albesa y col., 2004; Zhao y col., 2014; Angel Villegas y col., 2015).

En líneas generales, es posible evidenciar la generación de estrés oxidativo de tres maneras: i) cuantificación directa de las ERO y/o de las especies reactivas del nitrógeno (ERN), ii) determinación de los productos generados por reacción de macromoléculas con las ERO (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos oxidados), y iii) evaluación de los sistemas de defensas antioxidantes.

1.4.2. Radicales libres.

Durante el proceso de respiración, los organismos vivos producen energía y las almacenan en moléculas de ATP, mediante una serie de reacciones redox, en las que los electrones se transfieren de unas moléculas a otras, y la energía que se libera en estas transferencias se acopla a la producción de ATP. Cuando se trata de respiración aeróbica, el aceptor final de estos electrones es el oxígeno molecular. Al ganar electrones, pero de uno a la vez, el O₂ se reduce por un mecanismo que recibe el nombre de “vía univalente de reducción del O₂”. Las ERO se forman por esta reducción secuencial del oxígeno, lo cual conduce a la obtención de tres formas no reducidas del oxígeno, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno (que si bien no es un radical, puede generarlos) y el radical hidroxilo (Figura 5).

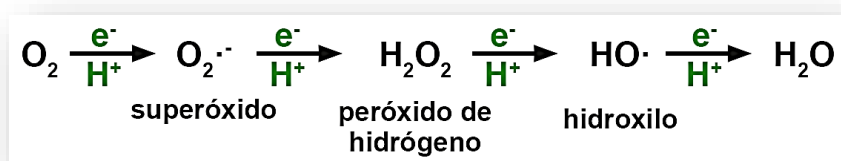


Figura 5. Vía univalente de reducción de O₂

Los radicales libres se caracterizan por ser especies reactivas químicas que poseen un electrón no apareado en el orbital molecular de mayor energía y son capaces de existir con independencia (Poljsak, 2013).

Entre las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, se destacan:

- **Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).**

Como ya se ha mencionado, la formación de este radical ocurre por la reducción univalente del O_2 (Figura 1), por lo que el $O_2^{\cdot-}$ contiene un electrón no apareado en un orbital molecular π antienlazante.

Si bien se trata de una especie con baja reactividad, resulta a su vez potencialmente tóxica, ya que puede iniciar reacciones que dan lugar a la formación de otras ERO, las cuales sí son muy reactivas. El $O_2^{\cdot-}$ puede transformarse, ya sea espontánea o enzimáticamente en H_2O_2 .



- **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).**

Si bien no es un radical, el H_2O_2 se considera dentro de las ERO por ser fuente de las mismas. Su lipofilicidad le permite difundir con facilidad a través de las membranas celulares y reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ en presencia de metales de transición para generar HO^{\cdot} .

En medios biológicos se forma ya sea por reducción directa del O_2 , o bien por dismutación del anión superóxido catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Ferrer-Sueta y col., 2018).

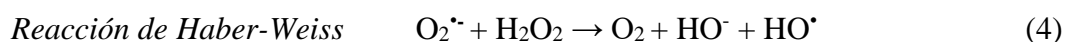
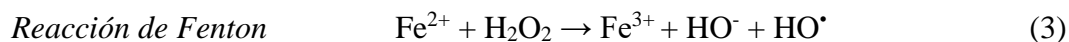


A su vez, la reducción del H_2O_2 conduce a la formación de HO^{\cdot} y anión hidróxido (HO^-).

- **Radical hidroxilo (HO^{\cdot}).**

Se trata de la ERO más reactiva, lo que determina que su acción química quede reducida a la estricta vecindad del lugar donde se produce. Esta elevada reactividad se debe a que no existe un sistema enzimático capaz de defender a los organismos vivos contra el HO^{\cdot} , por lo que la protección contra esta especie oxidante se basa principalmente en prevenir su formación.

La ruptura homolítica del H₂O₂ da lugar a la generación *in vivo* de HO•. Sin embargo, a nivel biológico los procesos de formación más importantes involucran las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1932; Phaniendra y col., 2015):



- **Radical peroxilo (ROO•).**

Los radicales peroxilo (ROO•) son probablemente los radicales más abundantes en los sistemas biológicos, aunque no tan reactivos como otras ERO. Este radical tiene una vida media relativamente larga (del orden de los segundos) y se origina a partir de la adición del oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado.

- **Óxido nítrico (NO•).**

Se trata de un radical libre gaseoso, lipofílico e hidrosoluble, con una vida media de 3 a 5 segundos. Se forma enzimáticamente a partir de la arginina mediante una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). El NO• puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y rupturas del ADN (Rivas-Arancibia y col., 2011).

- **Peroxinitrito (ONOO•).**

El NO• pueden reaccionar con el O₂•⁻ generando cantidades significativas de anión peroxinitrito (ONOO⁻) (5):



El ONOO⁻ está en equilibrio con su ácido conjugado (ONOOH). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de nitrar residuos de tirosina, nitrar y oxidar la guanosina, degradar carbohidratos, iniciar la peroxidación lipídica y causar daño a nivel del ADN (Rivas-Arancibia y col., 2011; Lawson y col., 2017; Ferrer-Sueta y col., 2018)

Las producciones *in vivo* de $O_2^{\cdot-}$ y ON son diferentes tanto espacial como temporalmente y se solapan escasamente; por lo cual, la producción de $ONOO^{\cdot-}$ ocurre siempre con exceso de $O_2^{\cdot-}$ o ON (Rivas-Arancibia y col., 2011).

1.4.3. Marcadores del Estrés Oxidativo.

El desequilibrio entre la producción de radicales libres u otros agentes oxidantes y la capacidad de sus defensas antioxidantes tiene efectos nocivos para la célula. Esto se debe a que las ERO pueden interaccionar y modificar la mayoría las biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas y ADN. La determinación de la oxidación de este tipo de macromoléculas permite evaluar si el estrés oxidativo está o no involucrado en la actividad antibacteriana de un compuesto o material específico.

- **Peroxidación Lipídica.**

En organismos aerobios son los fosfolípidos de membrana los que están sometidos continuamente a oxidantes procedentes de fuentes endógenas y exógenas. Los ácidos grasos poliinsaturados son los principales objetivos de las ERO, las cuales pueden reaccionar con la bicapa lipídica de la membrana celular causando la peroxidación de lípidos (Alatawi y col., 2018).

La peroxidación lipídica comprende una serie de reacciones oxidativas en cadena, que afectan a los ácidos grasos, especialmente insaturados que, por la presencia de dobles enlaces, son más sensibles a las reacciones con las ERO. Comienza con una reacción de iniciación, que consiste en la eliminación de un hidrógeno en una cadena de ácido graso insaturado, resultando de esta manera un ácido graso radical. Éste último puede reaccionar con O_2 para generar radicales lipídicos que se propagan en una reacción en cadena.

Uno de los productos estables de la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA), por lo que puede usarse como biomarcador de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y el estrés oxidativo. El MDA es un aldehído altamente reactivo y tiene efectos mutagénicos, por lo que la producción excesiva de MDA puede conducir a la inactivación de muchas proteínas y receptores celulares (Alatawi y col., 2018).

Sumado al MDA, el 4-hidroxi-2-nonenal es otro de los productos resultantes de la peroxidación lipídica. Ambos son considerados citotóxicos, ya que pueden interactuar con componentes celulares como ADN y proteínas.

La oxidación de los lípidos de membrana provoca alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de integridad de la membrana plasmática, afectando el transporte de nutrientes al alterarse la fluidez de los lípidos que la conforman. Estos daños alteran irreversiblemente la funcionalidad de estas membranas y causan la inactivación de las enzimas localizadas en ellas (Catalá, 2009).

- **Daño Oxidativo a Proteínas.**

Las ERO son capaces de oxidar diferentes aminoácidos presentes en las proteínas, causando la formación de enlaces cruzados proteína-proteína, desnaturalización y la pérdida del funcionamiento de las proteínas, de la actividad enzimática, de la función de los receptores y las proteínas de transporte (Phaniendra y col, 2015).

El radical HO[•] es altamente reactivo con las proteínas y puede causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos. Este radical ataca en particular a la tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, metionina y cisteína, formando entrecruzamientos de tipo covalente e induciendo la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función, o en mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas. Adicionalmente, Davies (1993) demostró que la oxidación de las proteínas por HO[•] provocaba la rápida desnaturalización de la proteína y un aumento de su hidrofobicidad, seguida de la degradación de la misma. Por otro lado, el ONOO⁻ oxida a las proteínas de membrana y citoplásmicas, afectando su naturaleza física y química.

Los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP, del inglés *Advanced Oxidation Protein Products*) son utilizados como marcadores de estrés oxidativo, ya que permiten estimar el grado de daño a la proteína mediada por oxidantes (Páez y col., 2010).

- **Daño Oxidativo del ADN.**

El ADN es otro de los componentes celulares susceptibles al estrés oxidativo inducido por ERO. Asimismo, las ERO también son capaces de ocasionar modificaciones en el ADN (Phaniendra y col, 2015).

La reactividad del radical HO[•] por el ADN es destacable, puesto que puede extraer fácilmente un átomo de hidrógeno de la 2-desoxiribosa o un grupo metilo en las bases nitrogenadas, o bien agregarse a dobles enlaces de bases de purina y pirimidina. La adición de este radical a la guanina conduce a la formación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

(8-OH-dG) (Yu y col., 2016). Las ERO también pueden inducir la formación de lesiones voluminosas de ADN. En este contexto, se descubrió que la exposición a ERO de una variedad de sistemas experimentales induce sustituciones de bases en tándem CC → TT y mCG → TT, lo que sugiere que puede inducir la formación de lesiones entrecruzadas entre enlaces (Yu y col., 2016).

Para minimizar la inducción de mutaciones y mantener la integridad del genoma, las células están equipadas con múltiples sistemas de reparación de ADN que permiten la eliminación eficaz de las lesiones de ADN genómico. Si dichas lesiones no son reparadas pueden provocar efectos citotóxicos y mutagénicos al perturbar la precisión y la eficiencia de la replicación y transcripción del ADN (Yu y col., 2016).

1.4.4. Estrategias Celulares Contra Radicales Libres. Sistemas Antioxidantes.

En condiciones normales, la mayor parte de los radicales libres son eliminados mediante los sistemas antioxidantes celulares. Estos mecanismos pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Una sustancia antioxidante se define como aquella que retarda o previene la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser lípido, proteína, ADN o cualquier otro tipo de molécula. Los antioxidantes reaccionan de manera segura con los radicales libres y terminan las reacciones en cadena antes de que se produzca daño celular.

- **Antioxidantes No Enzimáticos.**

Los antioxidantes no enzimáticos son un grupo de moléculas de naturaleza muy diversa entre las que se incluyen el tripéptido glutatión reducido (GSH) y la tiorredoxina, así como ciertas vitaminas (C, E y A) y pigmentos carotenoides (Nisme y col., 2015).

El GSH protege los grupos sulfhidrilo de las proteínas de las ERO. Su principal función antioxidante es la eliminación del H₂O₂ y peróxidos orgánicos en la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx), en la que dos moléculas de GSH donan dos átomos de hidrógeno para dar lugar a glutatión oxidado (GSSG), el cual posteriormente es reducido por la glutatión reductasa (GR) para restaurar el GSH (Galano y Alvarez-Idaboy, 2011).

Con respecto a la vitamina C, se encuentra bajo la forma de ascorbato y tiene la capacidad de aceptar electrones y reaccionar directamente con O₂^{•-}, HO[•] y algunos hidroperóxidos lipídicos. Además, regenera la vitamina E en las membranas celulares en combinación con GSH o compuestos capaces de donar equivalentes reductores. Por su parte, la vitamina E es

un eficiente antioxidante soluble en lípidos, capaz de interceptar radicales de peróxido lipídico y terminar las reacciones en cadena de lipoperoxidación (Nisme y col., 2015). Por último, se conoce que la vitamina A impide la lipoperoxidación al reaccionar con $O_2^{\cdot-}$ y HO^{\cdot} .

- **Antioxidantes Enzimáticos.**

Los sistemas antioxidantes enzimáticos están formados por un grupo de enzimas que actúan de forma coordinada (Figura 6). Estas enzimas están implicadas fundamentalmente en la inactivación del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno.

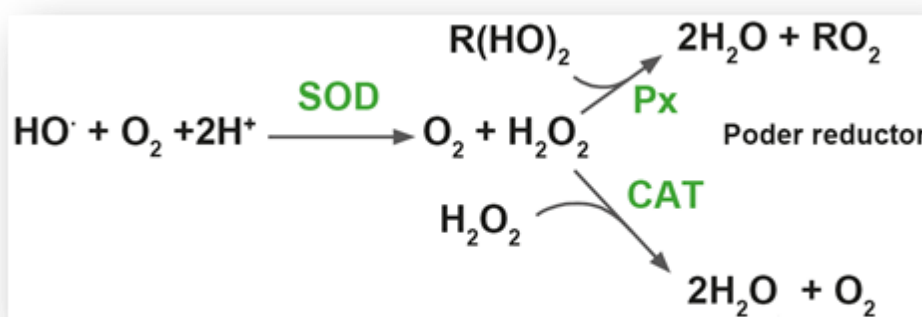


Figura 6: Reacciones coordinadas de los antioxidantes.

En este grupo se incluyen las siguientes enzimas:

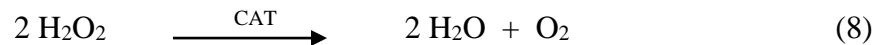
Superóxido dismutasa (SOD), la cual es una importante enzima antioxidante endógena que actúa como un componente del sistema de defensa de primera línea contra las ERO, catalizando la conversión del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 (Reacción 2). SOD es una metaloenzima y, por lo tanto, requiere un cofactor metálico para su actividad. Dependiendo del tipo de ión metálico requerido como cofactor por SOD, existen diversas formas de la enzima. En este sentido, las SOD se clasifican en tres formas: i) Fe-SOD, que se encuentra comúnmente en procariotas y cloroplastos de algunas plantas; ii) Mn-SOD, que está presente en procariotas y mitocondrias de eucariotas; y iii) Cu/Zn-SOD, la cual es predominante en eucariotas y está localizada básicamente en el citosol (Ighodaro y Akinloye, 2018).

Peroxidasa (Px), la cual participa en la eliminación de hidroperóxidos, tanto orgánicos como inorgánicos, a expensas de otra molécula que cede poder reductor, como por ejemplo el glutatión. En este caso se denominaría glutatión peroxidasa.

Glutación peroxidasa (GPx), la cual presenta varias isoformas y cataliza la reducción de peróxidos utilizando dos moléculas de GSH como donante de electrones y generando como producto GSSG y H₂O:



Catalasa (CAT), la cual presenta un cofactor férrico (Fe(III)) en su sitio activo y está involucrada en la descomposición del H₂O₂ en O₂ y H₂O. Además, CAT presenta actividad peroxidasa. La gran ventaja de esta enzima es que es capaz de degradar el peróxido de hidrógeno sin consumir equivalentes reducidos.



1.4.5. Implicancias del Estrés Oxidativo.

Mantener las especies reactivas a niveles bajos y moderados permite que estas moléculas sean beneficiosas dentro de los procesos celulares. Bajo estas condiciones, las especies reactivas juegan un importante papel como reguladores en los procesos de comunicación y señalización intra e intercelular. Sin embargo, cuando los niveles de las ERO y ERN se elevan pueden generar la condición de estrés oxidativo, produciendo alteraciones en macromoléculas y provocando como consecuencia daños celulares irreparables.

2. HIPÓTESIS

Nanopartículas de plata obtenidas por procesos “*green*” de síntesis empleando extractos acuosos vegetales interactúan con bacterias asociadas a mastitis bovina, acumulándose en la membrana, lo cual genera una condición de estrés oxidativo que desencadena en la muerte del microorganismo

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Contribuir al desarrollo de nuevas estrategias preventivas no convencionales para el control de agentes patógenos causantes de mastitis bovina evaluando la actividad antimicrobiana de nanomateriales biosintetizados, además de su aplicabilidad tópica y su mecanismo de acción relacionado a la generación de estrés oxidativo.

3.2. Objetivos Específicos

1. Re-identificar microorganismos patógenos causantes de mastitis bovina a partir de muestras de leche de bovinos infectados.
2. Biosintetizar y caracterizar nanopartículas de plata (AgNPs) mediante el empleo de plata como precursor metálico y extractos acuoso de *Cichorium intybus*.
3. Estudiar la actividad antibacteriana *in vitro* de las AgNPs biosintetizadas sobre las principales especies bacterianas productoras de mastitis bovina.
4. Evaluar la interacción de las AgNPs *green* y modelos de membrana que simulen la membrana plasmática de los microorganismos patógenos, de manera de caracterizar dicha interacción.
5. Investigar la capacidad de las AgNPs *green* de generar especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) en bacterias, y evaluar modificaciones de su metabolismo oxidativo mediante la determinación de marcadores de estrés, tales como oxidación de lípidos y proteínas.
6. Determinar *in vitro* el efecto de AgNPs biosintetizadas sobre el proceso de adherencia de los microorganismos patógenos durante su colonización a líneas celulares mamarias bovinas MAC-T.

7. Evaluar el potencial efecto citotóxico de las AgNPs biosintetizadas sobre células de la línea mamaria bovina MAC-T.

MATERIALES
Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Re-Identificación de Cepas Productoras de Mastitis Bovina.

En el presente trabajo se utilizaron cepas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia*, todos relacionados estrechamente con eventos de mastitis bovina. Dentro de los géneros mencionados, fueron incluidas algunas cepas de referencia además de aquéllas aisladas de muestras de leche de bovinos pertenecientes a rodeos de la provincia de Córdoba, las cuales presentaron síntomas clínicos y subclínicos de la enfermedad. Cabe destacar que las cepas de estreptococos fueron cedidas por el Laboratorio de Genética Microbiana de la Universidad Nacional de Río Cuarto, dirigido por la Dra. Liliana Odierno.

Una identificación preliminar de todos los aislamientos fue realizada mediante técnicas bioquímicas. Seguidamente, la identificación de cepas de estafilococos a nivel de especie se valió de técnicas moleculares. Los estreptococos, por su parte, fueron previamente identificados mediante MALDI-TOF.

En el presente trabajo de tesis doctoral, los microorganismos a ensayar se cultivaron inicialmente en un medio adecuado para su crecimiento, incubándose a 37 °C durante 24 h. El medio de crecimiento utilizado para los estafilococos y *E. coli* fue Tripteína Soya (TS) mientras que para los estreptococos se utilizó Todd Hewitt (TH). Durante los ensayos, las cepas se mantuvieron en sus respectivos medios a 4 °C, siendo repicadas frecuentemente para mantener su viabilidad.

4.1.1. Identificación Bioquímica.

4.1.1.1. Materiales.

4.1.1.1.1. Cepas Bacterianas.

- *Staphylococcus aureus* RC108
- *Staphylococcus aureus* 418-2
- *Staphylococcus aureus* 802-3
- *Staphylococcus aureus* 9-1
- *Staphylococcus aureus* 1617-2-V

- *Staphylococcus aureus* 925-1
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus* spp. 1017 TI
- *Staphylococcus haemolyticus* 7082 TD
- *Staphylococcus simulans* 9001 TD T7D
- *Staphylococcus simulans* 9001 TD
- *Staphylococcus hyicus* 1017 TD T7D
- *Streptococcus uberis* UT 102
- *Streptococcus uberis* ATCC 19436
- *Streptococcus uberis* 28
- *Streptococcus uberis* 17
- *Streptococcus uberis* 10
- *Streptococcus uberis* 59
- *Streptococcus uberis* 84
- *Streptococcus uberis* UT 109
- *Streptococcus bovis* 9809
- *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 27957
- *Escherichia coli* (ambiental)
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Todas las cepas pertenecen al cepario del Laboratorio de Genética Microbiana, Universidad Nacional de Río Cuarto. Los microorganismos que no corresponden a cepas de referencia, fueron aislados a partir de leche bovina y caracterizados fenotípica y molecularmente por Raspanti y col (2016).

4.1.1.1.2. Medios de Cultivo Bacterianos.

Los siguientes medios de cultivo comerciales fueron preparados según las recomendaciones del fabricante y se agregó agar (Britania) a los caldos, a razón de 15 g/l, cuando se quisieron obtener medios sólidos.

- Chrom Agar (Britania)
- Eosina Azul de Metileno (EMB) (Britania)
- Manitol Salado (Britania)
- Mueller-Hinton (MH) (Britania)

- Todd Hewitt (TH) (Britania)
- Tripteína Soya (TS) (Britania)

4.1.1.1.3. Soluciones y Reactivos.

- Peróxido de hidrógeno, pro-análisis 30% (Cicarelli)
- Reactivos para la tinción de Gram (Britania):
 - Alcohol acetona
 - Cristal violeta
 - Lugol
 - Safranina

4.1.1.1.4. Equipos de Laboratorio.

- Estufa de Cultivo
- Microscopio óptico

4.1.1.2. Metodología.

4.1.1.2.1. Morfología y Tamaño de las Colonias.

La morfología y el tamaño de las colonias fueron valoradas inicialmente como indicio del género a la cual pertenecía el aislado, de acuerdo a las colonias características de los mismos. Los diferentes microorganismos a evaluar fueron inoculados en placas de Petri conteniendo el medio sólido TS (estafilococos y *E. coli*) o TH (estreptococos) cultivo adecuado para su crecimiento. Luego de la incubación a 37 °C durante 24 h, se consideraron las diferencias observables entre las colonias formadas por dichos microorganismos. Variables tales como tamaño, forma y color de las colonias fueron consideradas con el objetivo de realizar una selección preliminar de los tipos de bacterias aisladas.

4.1.1.2.2. Tinción Gram.

Se utilizó la tinción de Gram con la finalidad de evaluar la morfología celular

bacteriana así como para realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, siendo consideradas grampositivas aquellas bacterias visualizadas de color morado y gramnegativas a las de color rosa.

Bajo condiciones de esterilidad, sobre un portaobjeto, se realizó un frotis de la cepa a evaluar y se fijó por calor. A continuación, se realizó la tinción de Gram de la siguiente manera:

- Se agregó cristal violeta durante 1 min.
- Se eliminó el colorante con agua destilada.
- Se añadió lugol durante 1 min.
- Se agregó solución decolorante durante 30 segundos.
- Se enjuagó el preparado con agua destilada.
- Se añadió safranina durante 30 segundos para realizar la tinción de contraste.
- Por último, el preparado fue lavado con agua destilada

Los preparados obtenidos se observaron al microscopio óptico esperando como resultado cocos morados con diferentes agrupaciones dependiendo si eran estreptococos (forma cadenas) o estafilococos (forma racimos). En el caso de *E. coli*, se esperaba observar bacilos rosados luego de la tinción Gram.

4.1.1.2.3. Catalasa.

Con el propósito de evaluar la presencia de la enzima catalasa en los aislados previamente clasificados como grampositivos, en un portaobjeto se colocó una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y sobre la misma, una ansada de la cepa a evaluar. La generación de burbujas demostró la capacidad de la cepa de dismutar H_2O_2 en agua y oxígeno molecular, indicando de este modo la existencia de la enzima en la misma.

4.1.1.2.4. Medio Selectivo Diferencial.

A modo de complementar las técnicas de identificación previamente mencionadas, las cepas de estafilococos fueron sembradas en placas conteniendo medio selectivo diferencial Chrom agar e incubadas 24 h a 37 °C. Una vez crecidas, las colonias de cada especie toman una coloración característica (Tabla 1) lo que permitió visualizar las diferentes cepas y realizar una identificación preliminar, la cual se corroboró con la

posterior identificación molecular.

Tabla 1. Aspecto típico de las colonias crecidas en medio selectivo Chrom agar.

Microorganismo	Aspecto típico de las colonias
<i>S. aureus</i>	Rosa a malva
<i>S. epidermidis</i>	Incoloros a rosado
<i>S. saprophyticus</i>	Azul turquesa
Otros estafilococos	Varios

4.1.2. Identificación Molecular.

4.1.2.1. Materiales.

4.1.1.2.1. Cepas Bacterianas.

Para los ensayos de identificación molecular se utilizaron las cepas bacterianas descritas en el punto 4.1.1.1.1.

4.1.1.2.2. Soluciones y Reactivos.

- Agarosa LE, grado analítico (Promega)
- Agua destilada libre de nucleasas (Promega)
- Albúmina bovina 10X (Promega)
- Bromuro de etidio 0,5 µg/ml (Sigma)
- Cebador directo (Biodynamics)
H279A (5'-GAIIIIIGCIGGIGA(TC)GGIACIACIAC-3')
- Cebador inverso (Biodynamics)
H280A (5'-(TC)(TG)I(TC)(TG)ITCICC(AG)AAICCIIG-GIGC(TC)TT-3')
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100 mM (Promega)
- Enzimas:
 - *AluI* 10 U/ml (Promega)

- GoTaq polimerasa 5 U/ml (Promega)
- *Hind*III 10 U/ml (Promega)
- Lisostafina 0,5 mg/ml (Promega)
- *Pvu*II 12 U/ml (Promega)
- Marcador de peso molecular 100 pb (RCB)
- Solución amortiguadora B 10X (Promega)
- Solución amortiguadora *Green* 5X pH 8,5 (Promega)
- Solución amortiguadora MULTI-CORE (Promega)
- Solución amortiguadora TBE 1X
- Solución amortiguadora TE 1X (pH 8): Tris-HCl 10 mM (pH 8) - EDTA 1 mM (pH 8)

4.1.1.1.3. Equipos de Laboratorio.

- Centrífuga
- Cuba de electroforesis
- Termociclador

4.1.2.2. Metodología.

4.1.2.2.1. Identificación Molecular por PCR-RFLP.

La identificación a nivel especie de los estafilococos aislados fue realizada mediante la técnica de biología molecular PCR-RFLP (del inglés *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) del gen *groEL*, gen conservado en esta especie. El procedimiento y técnicas moleculares empleadas se detallan a continuación.

4.1.2.2.1.1. Extracción de ADN.

En primer lugar, se realizó el procedimiento de extracción de ADN, según las condiciones descritas en literatura (Aires de Souza y col., 1996) con ligeras modificaciones:

- Se resuspendió una ansada de bacterias (crecidas durante 24 h a 37 °C en TSA) en 18 µl de solución amortiguadora TE 1X (pH 8).

- Mediante el agregado de lisostafina (0,5 mg/ml) y posterior incubación a 37 °C durante 40 min, fue posible lisar la bacteria. Transcurrido este tiempo, la enzima se desnaturalizó por calentamiento a 95 °C durante 15 min.
- Se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 5 min.
- El sobrenadante fue separado y conservado a -20 °C (templado para reacción en cadena de la polimerasa).

4.1.2.2.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Para la reacción de amplificación del gen *groEL* de las cepas de estafilococos se llevó a cabo la técnica de PCR-RFLP (Santos y col., 2008), usando como molde el ADN genómico extraído previamente (10-50 ng).

En primer lugar, se preparó en exceso la mezcla de reacción (sin el ADN) y fue fraccionada en tubos Eppendorf (45 µl). A continuación, a cada tubo se le añadió el ADN a amplificar (5 µl), resultando en un volumen final de 50 µl. Por otro lado, se dispuso un tubo control para corroborar la esterilidad de los reactivos empleados en la mezcla de reacción, el cual contenía 45 µl de la mezcla de reacción y 5 µl de agua sin ADN.

En la Tabla 2 se detallan los componentes de la mezcla de reacción (MIX).

Tabla 2. Componentes y volúmenes de la mezcla de reacción (MIX) para amplificar una secuencia parcial del gen *groEL* a partir de ADN genómico.

Solución y Reactivos (concentración <i>stock</i>)	Volumen de MIX (µL)
Solución amortiguadora <i>Green 5X</i>	10,0
Cebador directo (200 µg/ml)	2,5
Cebador inverso (200 µg/ml)	2,5
dNTPs (25 mM c/u)	0,5
MgCl ₂ (25 mM)	3,0
Taq polimerasa (5U/ml)	0,4
Agua libre de nucleasas	26,1

ADN genómico	5,0
Volumen final	50,0

El empleo del par de cebadores indicados en tabla anterior permitió la amplificación de un fragmento de aproximadamente 550-600 pb.

Los tubos se colocaron en un termociclador, el cual fue programado teniendo en cuenta la longitud del fragmento a amplificar y la temperatura de *annealing* (dependiente de los cebadores utilizados). El programa utilizado se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Detalles del programa utilizado para amplificar una secuencia parcial del gen *groEL* a partir de ADN genómico.

Programa del Termociclador			
Desnaturalización	95 °C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	1 min	40 ciclos
Hibridación	50 °C	2 min	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión	72 °C	10 min	1 ciclo

Una vez finalizado el programa de amplificación, las muestras se conservaron a -20 °C.

4.1.2.2.1.3. Electroforesis en Gel de Agarosa.

Los productos obtenidos luego de la reacción de amplificación, se corrieron en geles de agarosa con el fin de determinar la presencia de una única banda del peso molecular resperado (550-600 pb). La metodología empleada fue la siguiente:

- La agarosa fue preparada al 1% en buffer TBE 1X. Una vez fundida y templada a 40 °C, se agregó bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml y se colocó en la cuba electroforética con peine de 20 µl hasta su solidificación.

- Una vez dispuesto el gel en la cuba de electroforesis, se sembraron las muestras y el marcador de peso molecular.
- La corrida electroforética se llevó a cabo a 70-80 V durante 1 h.
- Se observó bajo luz UV un amplicón correspondiente a un tamaño de entre 550 y 600 pb.

4.1.2.2.1.4. Digestión con Enzima de Restricción *AluI*.

Con el objeto de obtener perfiles que permitan identificar las cepas de estafilococos, se procedió a digerir el ADN amplificado correspondiente al gen *groEL* con la enzima de restricción *AluI* según lo descrito por Menezes Barros, 2007. Para ello, aproximadamente 500 ng del producto de PCR fueron tratados con 0,25 U/ml de la enzima de restricción en un tubo Eppendorf conteniendo la MIX que se detalla en la Tabla 4. La reacción se incubó a 37 °C durante 2 h y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3,5% con el fin de ver los perfiles obtenidos luego de la digestión.

Tabla 4. Mezcla para digestión enzimática del ADN amplificado.

Digestión con <i>AluI</i>	
REACTIVO (concentración <i>stock</i>)	VOLUMEN (μl)
ADN (50 μg/ml)	10,0
Solución amortiguadora B 10X	2,0
Albúmina bovina 10X	2,0
<i>AluI</i> (10 U/ml)	0,5
Agua	5,5
Volumen final	20,0

4.1.2.2.1.5. Digestión con Enzima de Restricción *HindIII* y *PvuII*.

La digestión del gen *groEL* con la enzima *AluI* da lugar a la obtención de perfiles que permiten la identificación de un gran número de especies (Figura 7). Sin embargo, cuando se trata de *S. chromogenes*, *S. hyicus* o *S. capitis*, dicha enzima arroja un idéntico perfil, lo cual hace que no sea posible discriminar entre estas especies (Figura 8). Frente a estas circunstancias, se llevó a cabo una doble digestión enzimática con *HindIII* y *PvuII* con el fin de identificar fehacientemente estas tres especies. Para ello, el ADN amplificado para el gen *groEL* de aquellas muestras que presentaron ese perfil, fueron digeridas en forma simultánea con las enzimas *HindIII* y *PvuII* en tubo Eppendorf conteniendo la mezcla de reacción MIX detallada en la Tabla 5 a 37 °C durante 2 h y, posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3,5% con el fin de ver los perfiles obtenidos luego de la digestión.

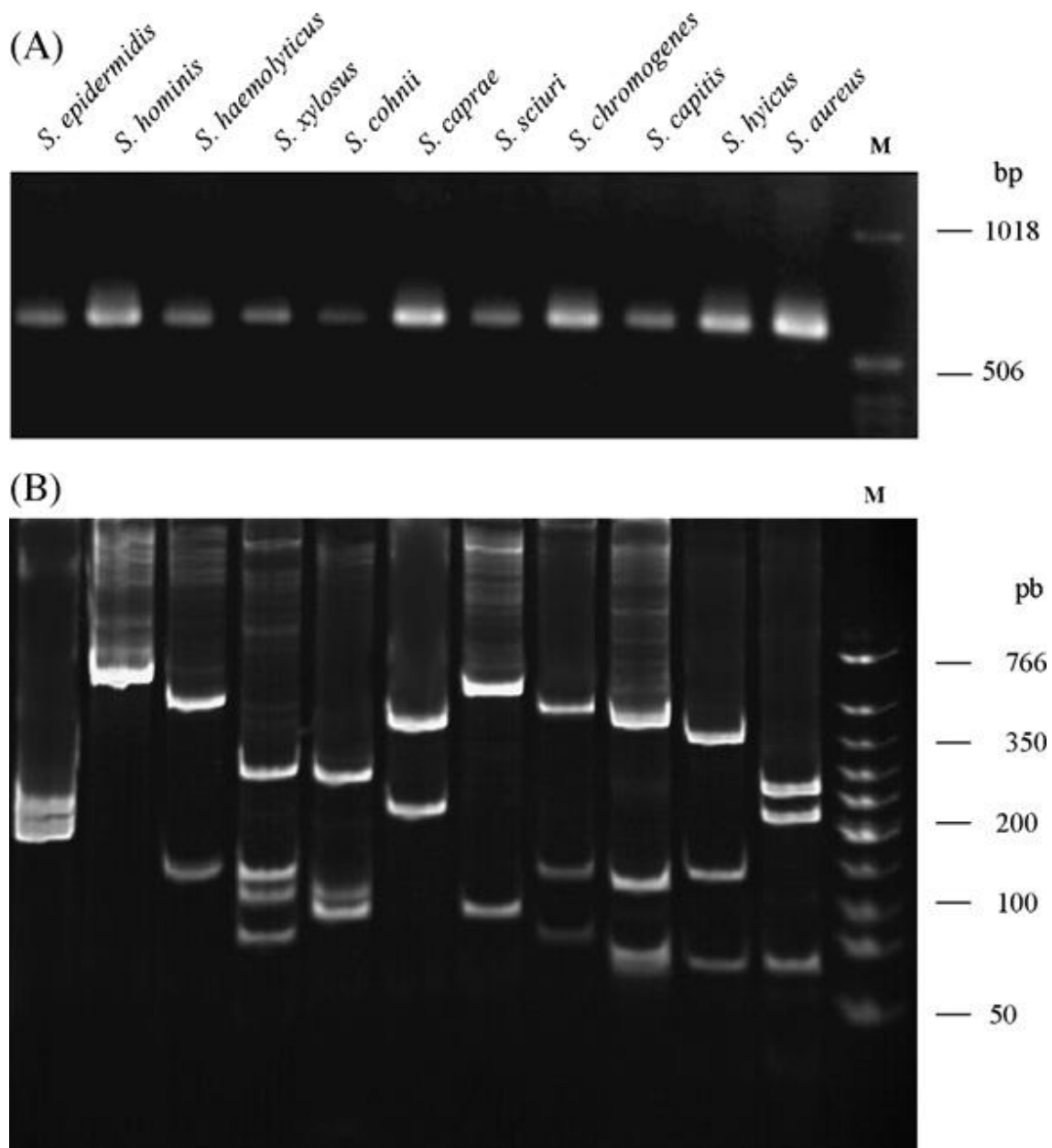


Figura 7. A) Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de 550 pb del gen *groEL* de cepas de referencia de *Staphylococcus* utilizando los cebadores H279A y H280A. M, marcador de ADN de 1 kb. B) Electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos producidos por la digestión con *AluI* de los amplicones estafilocócicos. Los carriles son los mismos que en el panel A. M, marcador de ADN de bajo peso molecular (Santos, O. y col., 2008).

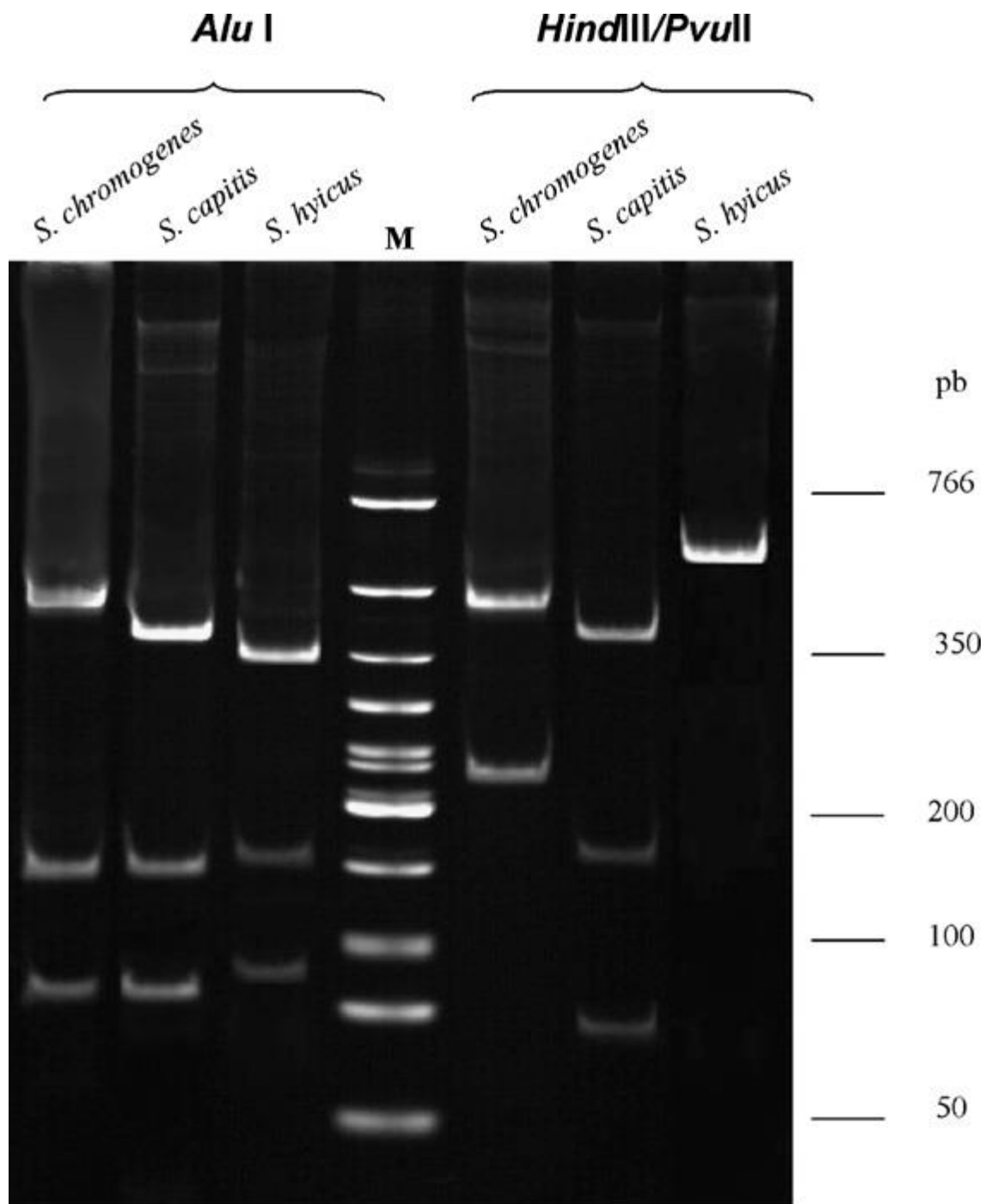


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos producidos por las digestiones *AluI* y *HindIII/PvuII* de los amplicones *groEL* de *S. chromogenes*, *S. capitis* y *S. hyicus*, respectivamente. M, marcador de ADN de bajo peso molecular (Santos, O. y col., 2008).

Tabla 5. Mezcla para doble digestión enzimática del ADN amplificado

Digestión con <i>HindIII/PvuII</i>	
REACTIVO (concentración stock)	VOLUMEN (μl)
ADN (50 μ g/ml)	10,0
Solución amortiguadora MULTI-CORE 10X	2,0
Albúmina bovina 10X	2,0
<i>HindIII</i> (10 U/ml)	0,8
<i>PvuII</i> (12 U/ml)	0,8
Agua	4,4
Volumen final	20,0

4.2. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Plata

En el presente trabajo de tesis doctoral se evaluó la capacidad reductora y estabilizante de un extracto acuoso preparado a partir de hojas de achicoria (*Cichorium intybus*). Se llevó a cabo la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) a partir de soluciones de diferente concentración de AgNO₃ y dicho extracto como precursores. Para ello, y previo a la síntesis *green*, fue necesario obtener el extracto vegetal.

4.2.1. Materiales.

4.2.1.1. Soluciones y Reactivos

- Extracto acuoso de hojas verde de achicoria (*Cichorium intybus*)
- Nitrato de plata, pro-análisis 99,0% (Cicarelli)

4.2.1.2. Equipos de Laboratorio

- Agitador magnético con calefacción

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Difractómetro de rayos X
- Espectrofotómetro UV-vis
- Microscopio electrónico de transmisión

4.2.2. Metodologías

4.2.2.1. Preparación del Extracto Acuoso.

El extracto se obtuvo por decocción de 6 g de hojas de achicoria previamente lavadas con agua ultrapura. Seguidamente, fueron hervidas durante 5 min en 100 ml de agua ultrapura y la mezcla se filtró con papel de filtro Whatmann N° 1, obteniéndose de este modo, un extracto acuoso límpido de color amarillo claro, el cual fue utilizado posteriormente para la síntesis de las AgNPs.

4.2.2.2. Síntesis *green* de AgNPs.

Para la biosíntesis de AgNPs, una solución de AgNO₃ (0,1; 1 y 10 mM) fue calentada en agitación hasta alcanzar una temperatura de 80 °C. Posteriormente, 5 ml del extracto acuoso fueron añadidos a la mezcla de reacción. La síntesis se llevó a cabo durante 30 min con agitación constante, manteniendo homogénea la temperatura (80 °C) durante los primeros 15 minutos y el tiempo restante fue sin calentamiento.

Se evaluaron diferentes condiciones de síntesis donde las variables estudiadas fueron la concentración de la solución de AgNO₃ de partida y el volumen del extracto agregado. Esto último implica una variación en la cantidad añadida de biomoléculas con propiedades reductoras y estabilizantes presentes en extracto.

4.2.2.3. Caracterización Físicoquímica de Nanopartículas de Plata.

La caracterización físicoquímica de las AgNPs biosintetizadas se realizó combinando espectroscopia UV-visible, microscopia de electrónica transmisión y difracción de rayos X.

4.2.2.3.1. Espectroscopía UV-visible.

La espectroscopia UV-visible es una de las técnicas de caracterización de nanopartículas de metales nobles más empleada debido a que dichos nanomateriales presentan fuertes bandas de absorción en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. La longitud de onda y la intensidad de la banda de absorción proporcionan importante información acerca del tamaño, forma y concentración de las AgNPs (Seney y col., 2009).

Los espectros UV-visible de las suspensiones coloidales de las AgNPs biosintetizadas se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett-Packard HP 8453 en el intervalo comprendido entre 300 y 800 nm, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

4.2.2.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.

En un microscopio electrónico de transmisión (TEM), un haz de electrones es acelerado y enfocado sobre una muestra de manera tal que, al impactar con la misma genera señales directamente relacionadas con la estructura y morfología de la muestra observada. La interacción entre el haz incidente y los átomos de la muestra produce, entre otros, electrones dispersados, los cuales son captados por un detector para construir una imagen en dos dimensiones. Un TEM utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones generados por un filamento de tungsteno, el cual es acelerado por la aplicación de un voltaje de 80 kV o más y que es dirigido a través de la muestra mediante diferentes lentes electromagnéticas. Los electrones atraviesan la muestra, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un lente objetivo, para luego amplificarse en un lente y construir una imagen del objeto.

Las imágenes TEM de las AgNPs fueron obtenidas usando un microscopio electrónico JEM-JEOL 1120 EXII operado a un voltaje de aceleración de 80 kV. Las muestras fueron preparadas dejando secar una gota de la suspensión coloidal de AgNPs sobre una grilla TEM a temperatura ambiente.

4.2.2.3.3. Difracción de Rayos X.

La difracción de rayos X (XRD) es una técnica esencial para la caracterización de

sólidos y en particular, para la identificación de fases cristalinas. En principio, si las nanopartículas metálicas obtenidas son de naturaleza cristalina, tienen la propiedad de difractar los rayos X en un ángulo determinado de acuerdo a la distancia entre los planos atómicos (Jenkins y col., 1996).

Los difractogramas de rayos X de las AgNPs biosintetizadas fueron registrados en un amplio rango de ángulos de Bragg (2θ) usando un difractómetro PANalytical X-Pert Pro, que opera con radiación $K\alpha$ de Cu a 40 kV y 40 mA.

4.3. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Nanopartículas de Plata

La actividad antibacteriana de las AgNPs biosintetizadas fue evaluada sobre las cepas bacterianas previamente aisladas e identificadas a partir de muestras de leche de vacas con síntomas de mastitis. Las metodologías utilizadas fueron difusión en disco y microdilución en placa. Esta última técnica permitió también establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para cada una de las cepas estudiadas.

4.3.1. Materiales

4.3.1.1. Cepas Bacterianas.

Para evaluar la actividad antibacteriana de las AgNPs se utilizaron las cepas bacterianas detalladas en el punto 4.1.1.1.1.

4.3.1.2. Soluciones y Reactivos

Discos de antibióticos:

- Ampicilina + Sublactámico (10 μ g + 10 μ g)
- Eritromicina (15 μ g)
- Estreptomicina (10 μ g)
- Gentamicina (10 μ g)
- Novobiocina (5 μ g)
- Rifampicina (5 μ g)

4.3.2. Metodologías

4.3.2.1. Difusión en Placa. Técnica de Disco.

A partir de un cultivo puro y fresco de 24 h de incubación de la cepa a evaluar, se inoculó un medio estéril hasta una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/ml, correspondiente a una densidad óptica (DO) de 0,5 en la escala de Mc Farland. Con este inóculo y empleando un hisopo estéril, se sembró una placa de Petri conteniendo el medio sólido adecuado para el crecimiento bacteriano. Por otro lado, discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro se embebieron con 10 μ l de suspensiones coloidales de las AgNPs biosintetizadas. Se colocaron los discos sobre la placa ya sembrada y se incubó durante 24 h a 37 °C. Luego de la incubación, la actividad antimicrobiana del nanomaterial se puso de manifiesto por la presencia de halos de inhibición (medidos en mm) del crecimiento bacteriano alrededor del disco.

De manera paralela, se compararon los halos de inhibición generados por las AgNPs con los obtenidos utilizando diferentes antibióticos de uso habitual en la prevención de mastitis bovina.

4.3.2.2. Microdilución en Caldo.

A partir de un cultivo bacteriano puro de 24 h, se inoculó medio fresco hasta alcanzar una DO de aproximadamente 0,1 que corresponde a 1×10^8 UFC/ml y al tubo 0,5 en escala de Mc Farland.

En una placa de 96 pocillos, se realizaron diluciones seriadas en factor 2 de las AgNPs, en medio de cultivo, seguido del agregado de 100 μ L del inóculo bacteriano. Se evaluó un rango de concentraciones entre 2 y 120 pM de AgNPs. Se incubó la microplaca durante 24 h a 37 °C.

Se tuvieron en cuenta los controles de viabilidad celular (control positivo: cepa y medio de cultivo), esterilidad (control negativo: medio de cultivo) y de AgNPs (nanopartículas y medio de cultivo).

Pasado el tiempo de incubación, se determinó la CIM visualmente considerando como valor de CIM aquella concentración de AgNPs donde no se observó crecimiento bacteriano siguiendo las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

4.3.2.3. Análisis Estadístico

Los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, siendo los datos obtenidos expresados como media \pm error estadístico (E.E.).

La evaluación de la significación estadística de los tratamientos se realizó mediante ANOVA usando el test de LSD Fisher con el software InfoStat. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó de manera independiente para cada cepa.

4.4. Interacción de AgNPs con Membranas Modelo y Microorganismos.

4.4.1. Materiales

4.4.1.1. Cepas Bacterianas

- *Staphylococcus aureus* 802-3
- *Streptococcus uberis* UT 109
- *Escherichia coli* ATCC 25922

4.4.1.2. Modelos de Membrana

Durante el trabajo experimental se utilizaron dos modelos de membranas: i) un modelo zwitteriónico de DMPC, y ii) otro modelo cargado negativamente de una mezcla de DMPC:DMPG (5:1), el cual permitió mimetizar las membranas bacterianas puesto que el fosfatidilglicerol (PG) es uno de los lípidos mayoritarios en la cara externa de dichas membranas.

4.4.1.3. Soluciones y Reactivos

- 5,(6)-carboxifluoresceína (Sigma)
- Agua ultrapura. Conductividad: $(0,002 \pm 0,001) \mu\text{S}/\text{cm}$.
- Cloroformo (Merck)
- Cloruro de magnesio 25 mM (Promega)
- Cloruro de potasio (Biopack)

- DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina) (Avanti Polar Lipids)
- DMPG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-1'-rac-glicerol) (Avanti Polar Lipids)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Solución amortiguadora HEPES (ácido 4-2-hidroxietyl-1-piperacina-etanosulfónico) 10 mM pH = 7,4 (Sigma).

4.4.1.4. Equipos de Laboratorio

- Fluorómetro Cary Eclipse
- Equipo Horiba SZ-100
- Equipo Kibron μ Trough con sistema tipo Wilhelmy (placa de platino)
- Equipo de determinación de Potencia Zeta

4.4.2. Metodologías

4.4.2.1. Preparación de Monocapas.

Para la preparación de monocapas, la superficie de la solución tampón HEPES contenida en una cuba de teflón de área fija se limpió exhaustivamente por aspiración de superficie. Luego, una solución de lípidos (DMPC o DMPC:DMPG (5:1)) en cloroformo fue extendida sobre esta superficie, mediante la adición de pequeñas de gotas de la solución dejando que el solvente se evapore completamente entre cada incorporación de la solución hasta alcanzar una presión superficial de (20 ± 1) mN/m.

Espontáneamente las moléculas lipídicas adoptan la disposición energéticamente más favorable, en donde los grupos polares se encuentran en contacto con la fase acuosa y las cadenas hidrofóbicas son excluidas de la misma hacia el aire, formando una monocapa lipídica (Li y col., 1992; McCallum y col., 2006) (Figura 9).

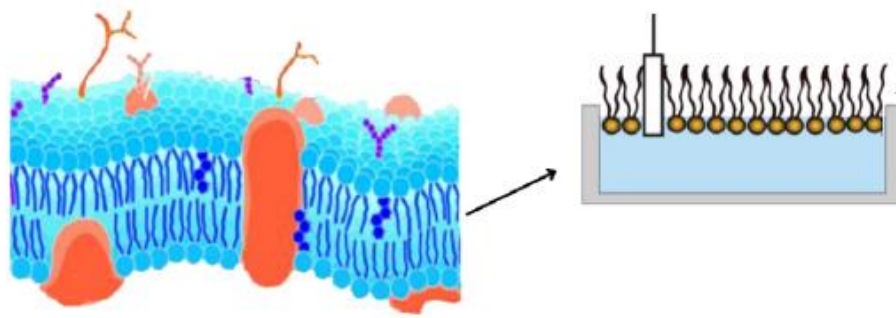


Figura 9: Representación de una membrana biológica y una monocapa lipídica en una interfase agua-aire. Modificado de Stefaniu y col., 2014.

4.4.2.2. Preparación de Liposomas por la Técnica Deshidratación-Hidratación

Se prepararon liposomas multilamelares (MLVs, del inglés *multilamellar vesicles*, 0,1-10 μm), disolviendo los lípidos puros (DMPC o DMPC:DMPG (5:1)) en cloroformo. Se colocó en un balón de vidrio, siendo el solvente orgánico evaporado bajo flujo de N_2 hasta obtener un *film* o película fina libre de solvente. Una vez evaporado el solvente, el *film* lipídico resultante se re-hidrató mediante la adición de 1 ml de solución tampón HEPES 10 mM pH = 7,4 y agitación a 45 °C durante 1 h (Figura 10). En todos los casos, la temperatura del baño fue mayor a la temperatura de transición de fases (T_t) del lípido o mezcla lipídica utilizada.

Posteriormente se obtuvieron liposomas unilamelares (LUVs, del inglés *large unilamellar vesicles*) de 100 nm a partir de MLVs mediante el método de extrusión, haciendo pasar 11 veces la solución de MLVs a través de una membrana con poros de 100 nm.

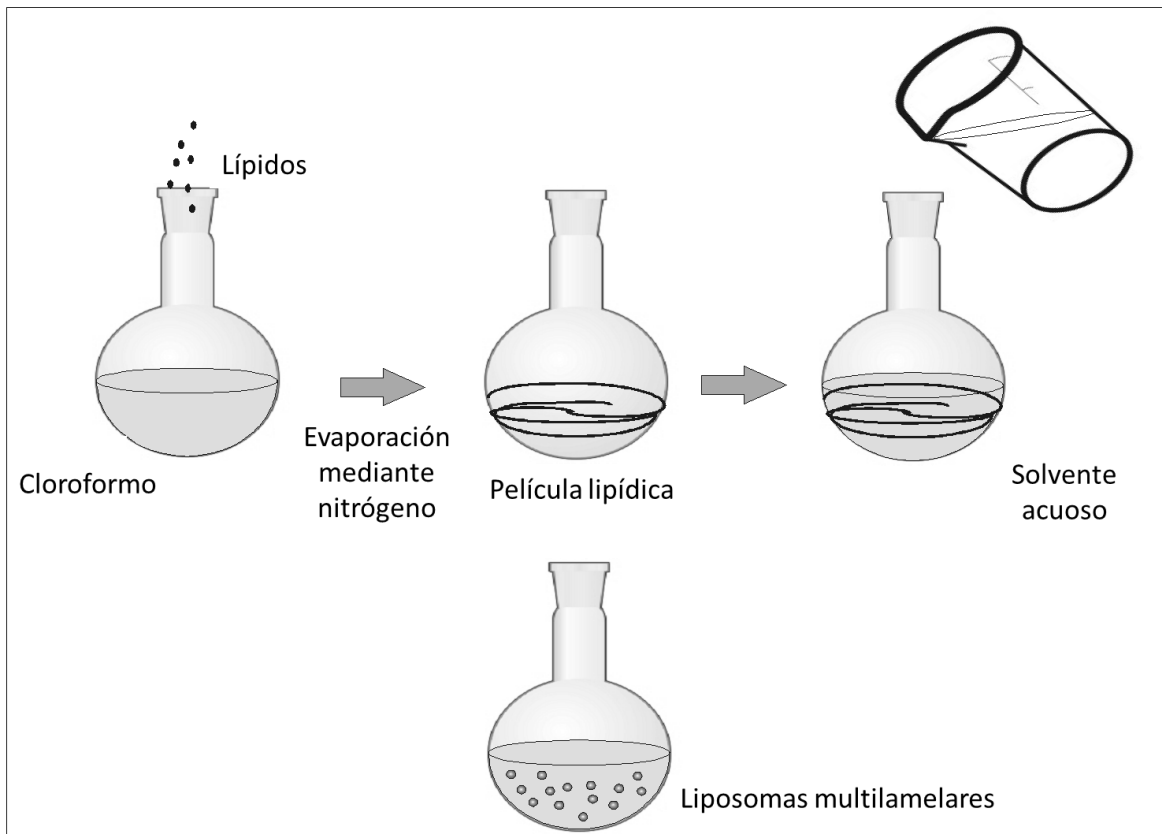


Figura 10: Esquema de la preparación de liposomas mediante la técnica de deshidratación-hidratación.

4.4.2.3. Presión Superficial

Con el objeto de estudiar las interacciones de las AgNPs biosintetizadas con membranas lipídicas, se utilizó el sistema modelo de monocapas en una interfaz aire-agua (Brockman, 1999; Brezesinski y col., 2003).

4.4.2.3.1. Interacciones entre Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Monocapas Lipídicas

Los cambios en la presión superficial de monocapas lipídicas, inducidos por el agregado de AgNPs, se midieron en un equipo Kibron μ Trough con sistema tipo Wilhelmy (placa de platino) a temperatura constante de $(20,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ utilizando una cuba de área constante de 1334 mm^3 y como subfase solución amortiguadora HEPES 10 mM pH = 7,4. Los lípidos utilizados fueron DMPC puro, y una mezcla de DMPC: DMPG (5:1).

Una vez que se alcanzó la presión superficial de (20 ± 1) mN/m y se estabilizó la monocapa lipídica, se inyectaron en la subfase concentraciones crecientes de AgNPs obtenidas por dos métodos de síntesis; por un lado, se ensayaron aquéllas sintetizadas de manera *green*, a partir de AgNO₃ y extracto acuoso de achicoria, y por otro lado, las obtenidas mediante síntesis química con citrato como agente reductor y estabilizante. Los cambios de presión superficial se registraron temporalmente hasta alcanzar un valor constante de presión. En esta condición, los cambios de presión superficial por la inyección de las AgNPs pueden atribuirse al efecto de éstas sobre la tensión interfacial de la monocapa.

Con el objeto de cuantificar la afinidad de las AgNPs por la membrana, se determinó la constante de disociación aparente (K_d), asumiendo la isoterma tipo Langmuir mediante el ajuste de los datos experimentales con la siguiente ecuación (14):

$$\frac{\Delta\Pi}{\Delta\Pi_{m\acute{a}x}} = \theta = \frac{[AgNPs]^n}{K_d + [AgNPs]^n} \quad (14)$$

donde θ corresponde al grado de cobertura, $\Delta\Pi$ es el cambio de presión en la superficie, $[AgNPs]$ es la concentración de AgNPs, n es el parámetro de heterogeneidad que describe el ancho de la distribución de energía, y K_d es la constante de disociación.

4.4.2.3.2. Estudio Cinético.

Con el objetivo de evaluar el proceso cinético, se registraron en función del tiempo, los cambios en la presión superficial producidos por el agregado de las AgNPs en la subfase de monocapas lipídicas de diferente composición y en las mismas condiciones que para el ensayo detallado en la sección 4.2.4.3.3.1.

Si la difusión de un soluto hacia la interfase sigue una cinética exponencial de primer orden, a partir de la ecuación 15 puede conocerse la velocidad con la que ocurre la interacción:

$$\Delta\Pi = -e^{-kt} \Delta\Pi_{m\acute{a}x} + \Delta\Pi_{m\acute{a}x} \quad (15)$$

donde k es la constante de velocidad específica de la cinética de interacción que se puede aplicar para cuantificar cuán rápido ocurre la interacción de la nanopartícula con la

membrana. De este modo, cuando mayor es el valor de k , más significativa es la velocidad para alcanzar $\Delta\Pi_{m\acute{a}x}$, es decir, el cambio máximo de presión en el equilibrio (Jiang y col., 2009).

4.4.2.4. Potencial Zeta en Membranas Modelo.

El potencial zeta (ξ) de MLVs se determinó en un equipo Zeta Meter System aplicando un campo eléctrico continuo de 50 V, temperatura constante de $(20,0 \pm 0,5)$ °C y utilizando como electrolito soporte KCl 1mM para mantener bajas fuerzas iónicas.

Se prepararon suspensiones de vesículas MLVs 10 mM a partir de DMPC puro y DMPC: DMPG (5:1) en buffer HEPES 10 mM pH = 7,4, las cuales fueron incubadas con concentraciones crecientes de las AgNPs durante 1 h. Posteriormente, la solución fue diluida 15 veces en KCl 1 mM y el movimiento de las partículas fue seguido mediante microscopía en un objetivo reticulado. El equipo calculó automáticamente los valores de ξ a partir de los valores de movilidad electroforética (μ) de las partículas basándose en la ecuación de Smoluchowski (16), y el valor final de ξ para cada preparado se obtuvo del promedio de al menos 20 medidas por muestra.

$$\xi = \frac{4\Pi\eta\mu}{D} \quad (16)$$

donde η es la viscosidad de la suspensión a 20 °C, D es la constante dieléctrica de la solución a 20 °C, y μ es la movilidad electroforética de las partículas (micrómetro/seg por voltio/cm).

Nuevamente, y con el objeto de cuantificar la afinidad de las AgNPs por los liposomas, se calculó la constante de disociación aparente (K_d), asumiendo una isoterma tipo Langmuir y empleando la siguiente ecuación (17):

$$\frac{\Delta z}{\Delta z_{m\acute{a}x}} = \theta = \frac{[AgNPs]^n}{K_d + [AgNPs]^n} \quad (17)$$

donde Δz define la perturbación del potencial zeta inicial del liposoma inducido por la adición de las nanopartículas y $\Delta z_{\text{máx}}$ es el máximo cambio de potencial zeta inicial alcanzado y $[AgNPs]$ es la concentración de nanopartículas incubada.

4.4.2.5. Potencial Zeta en Microorganismos.

Medidas de potencial zeta fueron realizadas para evaluar la interacción de las AgNPs con diferentes especies bacterianas. Se utilizaron 3 especies bacterianas: *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli*, para ensayar el comportamiento de las nanopartículas frente a microorganismos tanto grampositivos como gramnegativos.

A partir de un cultivo ON (18 h) de cada microorganismo en el medio adecuado, se inoculó medio fresco en una dilución 1/5 y se incubó 2 h hasta obtener una $DO_{(600\text{nm})} = 1$. Una vez alcanzada la absorbancia deseada, se realizó el agregado de diferentes concentraciones de AgNPs biosintetizadas y se incubó la mezcla durante 1 h a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, previo lavado por triplicado de la mezcla de reacción con solución fisiológica, se realizó una dilución 1:20 en solución fisiológica y se midió el potencial zeta de las bacterias con los distintos agregados como se indicó en la sección 4.2.3.1.4. Los resultados, obtenidos luego de un promedio de 20 determinaciones realizadas por triplicado, fueron comparados con los controles del potencial zeta de cada bacteria sin el agregado de nanopartículas.

4.4.2.6. Dispersión Dinámica de Luz.

Con el objetivo de perfeccionar la caracterización de las interacciones entre las AgNPs y los modelos de membrana, se llevaron a cabo experimentos de DSL (del inglés *dynamic light scattering*) a 25 °C tanto de las AgNPs biosintetizadas y los LUVs (DMPC: DMPG 5:1) como de una mezcla de LUVs (1,25 mM de lípidos totales) con 0,04 nM de AgNPs. Para ello, se utilizaron celdas de poliestireno desechables y un equipo Horiba SZ-100 equipado con un láser DPPS ($\lambda = 532 \text{ nm}$) a un ángulo de detección (dispersión) de 90°. Las funciones de autocorrelación de intensidad normalizada se analizaron utilizando el método CONTIN, dando lugar a una distribución de los coeficientes de difusión (D), los cuales se utilizan para el cálculo del diámetro hidrodinámico (D_h) a través de la relación de Stokes-Einstein (18):

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (18)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η la viscosidad media.

4.4.2.7. Ensayos de *Leakeage* (Escape).

Los ensayos de *leakage* permiten analizar si hay o no permeabilización de la membrana, de manera de poder caracterizar los efectos que las AgNPs podrían producir en las membranas modelos. La disrupción de la vesícula lipídica fue medida por espectroscopía de fluorescencia. En este ensayo, se monitoreó la liberación de 5,(6)-carboxifluoresceína (CF) atrapada dentro de las vesículas. Cuando la sonda se encuentra en el interior de los liposomas, está presente en altas concentraciones presentando una emisión de fluorescencia muy baja, ya que ocurre el fenómeno de *auto-quenching*. Una vez ocurrida la permeabilización del liposoma, el fluoróforo se diluirá en el ambiente exterior, lo cual resulta en la desaparición del *auto-quenching* y un consecuente aumento de la emisión de fluorescencia (Figura 11).

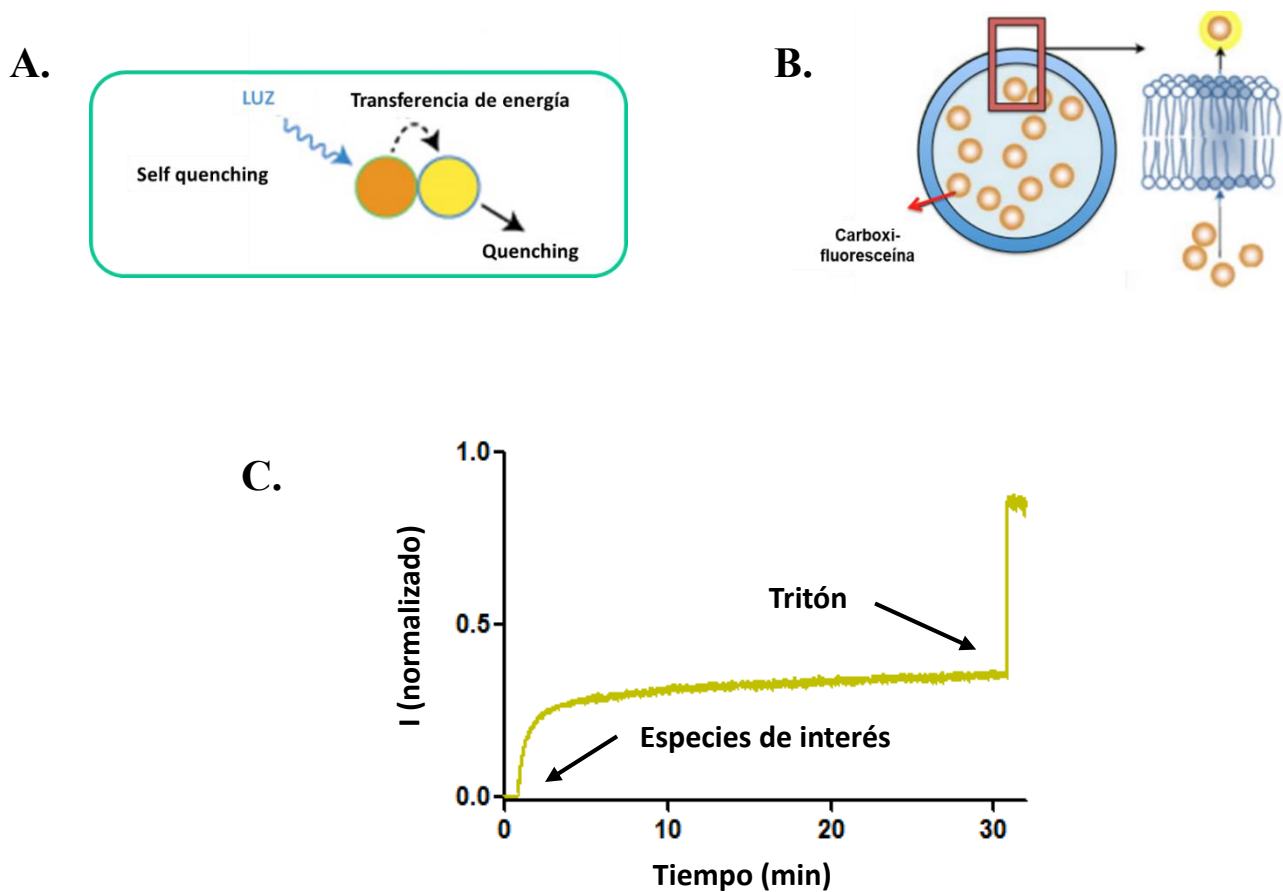


Figura 11. Representación del método de *leakage*. A. Proceso de *Auto-quenching* del fluoróforo. B. Permeabilización del liposoma y liberación de carboxifluoresceína. C. Intensidad de fluorescencia en función del tiempo.

Para llevar a cabo el ensayo de *leakage*, los lípidos DMPC:DMPG (5:1) se secaron en un balón de fondo redondo. Al día siguiente, la película lipídica se hidrató con una solución tampón que contiene 100 mM de 5,(6)-carboxifluoresceína. Las LUVs se obtuvieron posteriormente por extrusión. Seguido a esto, se procedió a la separación de la sonda encapsulada de la sonda libre en solución, mediante una columna BIO-RAD de 6 kDa de exclusión. Se realizaron lecturas de fluorescencia usando $\lambda_{exc} = 492$ nm y $\lambda_{em} = 517$ nm, antes y después de añadir Tritón X-100 a una concentración final del 1% (v/v) para cada fracción. Se consideraron como liposomas con sonda encapsulada a aquéllos que presentaron la mayor diferencia antes y después del agregado de Tritón. Se realizaron cinéticas de 30 min excitando a 492 nm y adquiriendo emisión a 517 nm. Inicialmente se midió la emisión basal del sistema lipídico (durante 3 min), seguidamente se agregaron las AgNPs biosintetizadas y se midió la fluorescencia emitida hasta el minuto 27. Pasado

este tiempo, se añadió Tritón X-100 y se continuó midiendo hasta el minuto 30. Los resultados se expresan en términos de porcentaje de *leakage*, a partir de la siguiente ecuación (19):

$$\%Leakage = \frac{F - F_0}{F_{100\%} - F_0} \quad (19)$$

donde F es el valor de la intensidad de fluorescencia a 517 nm medida al minuto 27 en presencia de AgNPs, F_0 es la intensidad de fluorescencia a 517 nm medida al minuto 27 del lípido solo, y $F_{100\%}$ es la intensidad de fluorescencia a 517 nm medida al minuto 30 después de la adición del Tritón.

4.4.2.8. Análisis Estadístico

Los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, siendo los datos obtenidos expresados como media \pm error estadístico (E.E.).

Los datos experimentales fueron ajustados mediante regresión no lineal utilizando GraphPad Prism 5. Las barras de error en la presentación de datos representan el error estándar de la media. Para la significación estadística se realizó ANOVA seguido del *posttest* Dunnett comparando los valores obtenidos con el control. * $p < 0.5$; ** $p < 0.01$.

4.5. Investigación del Metabolismo Oxidativo en Bacterias: Estrés Oxidativo.

4.5.1. Materiales.

4.5.1.1. Cepas Bacterianas.

Para los ensayos de estrés oxidativo se utilizaron las cepas bacterianas destalladas en el punto 4.4.1.1.

4.5.1.2. Soluciones y Reactivos.

- Ácido acético (Merck)
- Ácido clorhídrico (Merck)

- Ácido tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (Sigma)
- H₂-DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína) (Sigma)
- Yoduro de potasio (Cicarelli)
- NEED (N-(1-naftil) etilendiamina diclorhidrato) (Sigma)
- PBS (solución amortiguadora de fosfato salino (pH 7,2-7,4): 8 g/l NaCl; 1,44 g/l Na₂HPO₄; 0,24 g/l KH₂PO₄; 0,2 g/l KCl)
- Sulfanilamida (Cicarelli)
- Tirón

4.5.1.3. Equipos de Laboratorio

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Espectrofluorómetro Biotek Synergy HT
- Lector de microplacas

4.5.2. Metodología.

4.5.2.1. Investigación del Metabolismo Oxidativo en Bacterias.

4.5.2.1.1. Determinación de Especies Reactivas del Oxígeno por Espectrofluorometría.

Para valorar las especies reactivas del oxígeno (ERO), las suspensiones bacterianas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. uberis* UT 109 y *E. coli* ATCC 25922 (75 µl) provenientes de un cultivo crecido durante 18 h (10⁸ UFC/ml), se incubaron durante 1 h a 37 °C, con 75 µl de AgNPs biosintetizadas a diferentes concentraciones: 15, 30 y 60 pM (sub-CIM, CIM y supra-CIM, respectivamente). Además, se realizaron determinaciones con 75 µl de extracto acuoso de achicoria y solución de AgNO₃, con el objetivo de evaluar la capacidad de dichos precursores de síntesis de generar estrés oxidativo en las diferentes especies bacterianas ensayadas. Para determinar el comportamiento bacteriano basal, 75 µl de PBS fueron agregados en lugar de las sustancias mencionadas previamente.

Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 20 μl de una solución acuosa de $\text{H}_2\text{-DCFDA}$ 20 μM . La intensidad de fluorescencia fue medida 30 min después con un espectrofluorómetro Biotek Synergy HT con longitud de onda de excitación a 490 nm y de emisión a 520 nm (Quinteros y col., 2016).

4.5.2.1.2. Microscopía de Fluorescencia.

La utilización de microscopía de fluorescencia permitió monitorear la generación de especies reactivas de oxígeno intracelular en las cepas de *S. aureus* y *S. uberis*.

Para llevar a cabo el ensayo, cultivos de 18 h de cada una de las bacterias (10^8 UFC/ml) se centrifugaron y posteriormente resuspendieron en PBS estéril (500 μl). Una vez realizado dicho lavado por triplicado, cada suspensión bacteriana (100 μl) se puso en contacto durante 1 h a 37 °C con 100 μl de AgNPs biosintetizadas a la concentración en la cual la generación de ERO alcanzó su valor máximo, 60 pM para las cepas de *S. aureus* (concentración supra-CIM) y 30 pM para *S. uberis* (valores de CIM).

Luego del tiempo de incubación, a cada muestra se le añadió 20 μl de la sonda fluorescente $\text{H}_2\text{-DCFDA}$ y la mezcla se mantuvo por 30 min en oscuridad a 37 °C. Seguidamente, 50 μl de cada muestra se colocó en un portaobjetos y se observó *vía* microscopía la fluorescencia emitida por las mismas. La longitud de onda de excitación fue de 490 nm mientras que la de emisión fue de 519 nm.

4.5.2.1.3. Determinación de Especies Reactivas del Nitrógeno Mediante Cuantificación de Nitritos en Bacterias.

En soluciones acuosas, el óxido nítrico (ON) es convertido rápidamente a nitritos (NO_2^-). Por consiguiente, la concentración total de NO_2^- puede ser utilizada como un indicador indirecto de la concentración de ON. Las determinaciones se realizaron mediante un análisis espectrofotométrico del nitrito total utilizando la reacción de Griess de acuerdo con la metodología descrita por Kobayashi y col., 2002.

Para determinar ON en bacterias, inicialmente se obtuvieron cultivos de 18 h de crecimiento de las cepas previamente mencionadas. Las diferentes suspensiones bacterianas (50 μl , 10^8 UFC/ml) se incubaron con 50 μl de AgNPs (15, 30 y 60 pM) o bien con 50 μl de extracto de achicoria, solución de AgNO_3 o PBS, durante 1 h a 37 °C.

Luego de la incubación, se agregaron 50 µl de sulfanilamida al 2% en HCl 5% (v/v) y 50 µl de una solución acuosa de NEED al 0,1%. Transcurridos 15 min, la mezcla resultante se midió espectrofotométricamente a 540 nm con un lector de ELISA. La absorbancia medida es proporcional a la cantidad de nitritos presentes en la muestra con respecto a la solución estándar tomada como parámetro (Peralta y col., 2015). Los resultados se expresaron como µM de NaNO₂ para cada uno de los tratamientos ensayados.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para evaluar la generación de ON por parte de las AgNPs biosintetizadas en presencia de Tirón, un secuestrante de anión superóxido, para determinar la relación entre la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERO/ERN). Inicialmente, a cada una de las suspensiones bacterianas se añadieron 50 µL de Tirón 10 mM. A continuación, la mezcla se completó con 50 µl del compuesto a evaluar (PBS, extracto de achicoria, solución de AgNO₃ y concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM de AgNPs) y se incubó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, el protocolo se siguió tal como se detalló previamente para la determinación de ERN.

4.5.2.2. Oxidación de Macromoléculas Bacterianas.

4.5.2.2.1. Evaluación de la Peroxidación Lipídica.

Los radicales libres pueden atacar directamente a los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular e iniciar la peroxidación lipídica. Entre los diferentes aldehídos que se pueden formar durante este proceso, el más estudiado es el malondialdehído (MDA). El MDA formado por la descomposición de ácidos grasos poliinsaturados se utiliza como indicador para la determinación del grado de peroxidación lipídica. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para dar un producto coloreado rojo que absorbe a 535 nm.

Con el propósito de cuantificar la oxidación de lípidos, se prepararon suspensiones bacterianas a partir de cultivos de 18 h a 37 °C. Cada una de las suspensiones de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* (500 µl, 10⁸ UFC/ml) se pusieron en contacto con 500 µl de diferentes concentraciones de AgNPs (15, 30 y 60 pM). Además, los ensayos se llevaron a cabo con extracto acuoso de achicoria, solución de AgNO₃ y PBS para evaluar su efecto en la oxidación de macromoléculas bacterianas. A continuación, la mezcla de reacción fue incubada durante 1 h a 37 °C. Se detuvo la reacción mediante el agregado de 1000 µl de

ácido tricloroacético (TCA) 35% p/v y se mantuvo 20 min en oscuridad. Pasado dicho tiempo, se agregaron 1000 µl de TBA al 0,5% p/v y las muestras se calentaron a baño María (80 °C) durante 30 min. Seguidamente, se enfriaron en baño de hielo y después se centrifugaron durante 5 min a 1500 r.p.m. La absorbancia del sobrenadante de cada una de las muestras se midió a 535 nm. Los resultados se expresaron como nM de MDA para cada uno de los tratamientos ensayados (Becerra y col., 2006).

4.5.2.2. Determinación de Productos Proteicos de Oxidación Avanzada por Espectrofotometría.

Los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP, del inglés *advanced oxidation protein products*) son otro de los marcadores de estrés oxidativo. La oxidación de residuos aminoácidos tales como tirosina, conducen a la formación de ditirosina, agregación de proteínas, entrecruzamiento y fragmentación, así como a la formación de puentes disulfuro e incremento de la susceptibilidad a la proteólisis por lo que el estrés oxidativo puede verse reflejado en la oxidación de proteínas.

Los niveles de AOPP fueron determinados mediante un método espectrofotométrico. Se prepararon suspensiones de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* (10^8 UFC/ml) a partir de cultivos de 18 h a 37 °C. Una alícuota de éstas (75 µl) se incubó a 37 °C durante 1 h con 75 µl de AgNPs a diferentes concentraciones (15, 30 y 60 pM). Los controles se realizaron agregando 75 µl de extracto acuoso, solución de AgNO₃ o PBS a las diferentes suspensiones bacterianas. Luego, se realizó el agregado de 50 µL de yoduro de potasio (1,16 M) y 50 µl de ácido acético. El producto final de la reacción fue sensado a 340 nm (Páez y col., 2011). Las concentraciones de AOPP se expresaron como mequivalentes de Cloramina-T para cada uno de los tratamientos ensayados

4.5.2.3. Análisis Estadístico

Los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, siendo los datos obtenidos expresados como media ± error estadístico (E.E.).

La evaluación de la significación estadística de los tratamientos se realizó mediante ANOVA usando el test de LSD Fisher con el software InfoStat. Las barras de error en la presentación de datos representan el error estándar de la media. Medias con una letra

distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó de manera independiente para cada cepa.

4.6. Evaluación de la Capacidad de Adherencia de los Patógenos a Células Epiteliales Mamarias Bovinas.

4.6.1. Materiales.

4.6.1.1. Cepas Bacterianas.

Para los ensayos de adherencia se utilizaron las cepas bacterianas destalladas en el punto 4.4.1.1.

4.6.1.2. Línea Celular.

En los ensayos de adherencia bacteriana se utilizó la línea celular MAC-T, células epiteliales inmortalizadas aisladas de tejido mamario bovino.

4.6.1.3. Medio de Cultivo Celular.

- Medio esencial mínimo Eagle-Earle (Gibco) suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco), 10% de suero fetal bovino (NATOCOR), 1% de L-glutamina (Gibco), 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Laboratorio Veinfar) y 2,2 g/l de NaHCO_3 (J.T. Baker).

4.6.1.4. Soluciones y Reactivos.

- Azul de tripán 1% en agua destilada de calidad molecular
- PBS (solución amortiguadora de fosfato salino (pH 7,2-7,4): 8 g/l NaCl; 1,44 g/l Na_2HPO_4 ; 0,24 g/l KH_2PO_4 ; 0,2 g/l KCl)
- Suero fetal bovino (SEROTEC)
- Tripsina 0,25% - ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1% (Difco)
- Tritón X-100 (Sigma)

4.6.1.5. Equipos de Laboratorio.

- Agitador de microplacas
- Baño termostatzado
- Cámara de Newbauer
- Centrífuga de microplacas
- Estufa de CO₂
- Estufa de Cultivo

4.6.2. Metodología

4.6.2.1. Preparación del Cultivo de Células MAC-T.

A partir de células MAC-T mantenidas en nitrógeno líquido, se obtuvo un cultivo celular activo según se detalla a continuación. Inicialmente se incubó el criovial en un baño a 37 °C y su contenido fue añadido a un tubo conteniendo 15 ml de medio DMEM completo. Tras centrifugar durante 10 min a 800 r.p.m., el medio fue descartado y se agregó medio nuevo (10 ml) para después transferir a un frasco T y agregar nuevamente medio hasta completar 15 ml. A modo de facilitar el intercambio de CO₂, la botella fue incubada con la tapa floja a 37 °C en estufa con 5% de CO₂. Una vez producida la variación en el color del medio, lo que indica a su vez un cambio de pH, y de corroborar la ausencia de contaminación, se descartó el medio luego de lavar con el mismo aquellas células muertas, no adheridas o bien, adheridas inespecíficamente. Por último, se agregó una vez más medio nuevo (15 ml) y las células se incubaron en estufa de CO₂ a 37 °C hasta que alcanzaron un 100% de confluencia, tras lo que se procedió a la tripsinización.

4.6.2.2. Tripsinización y Siembra en Placas de 24 Pocillos.

Una vez alcanzado una confluencia del 100% en los frascos T conteniendo las células MAC-T, se procedió al descarte del medio, lavando con el mismo los bordes y bases de los frascos. Posteriormente, se agregaron 2 ml de tripsina 0,25% - EDTA 0,1% y los frascos se incubaron durante 10 min a 37°C en estufa con CO₂ para permitir la obtención de células en suspensión. Seguido, se añadieron 10 ml de medio completo suplementado con suero fetal bovino al 10%, a modo de inactivar el efecto de la tripsina. Por último, se

llevó a cabo una dilución 1/20 de la suspensión celular y se realizó el recuento de células viables mediante azul Tripán en cámara de Neubauer. La concentración celular se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento de células mamarias (cél/ml)} = \text{promedio de células} \times 10.000 \times \text{factor de dilución} \quad (11)$$

En un frasco T con crecimiento confluyente de células es esperable tener 10 millones de células. Por tal motivo, los experimentos de adherencia se llevaron a cabo en placas de fondo plano de 24 pocillos, colocando alrededor de 100.000 células por pocillo. Para ello, una vez conocido el número de células/ml, se realizaron las diluciones correspondientes para obtener la cantidad necesaria de células para sembrar en los pocillos. Se agregó 1 ml de la suspensión conteniendo alrededor de 100.000 células en cada pocillo y se incubó en estufa con CO₂ a 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 100%.

4.6.2.3. Preparación de los Inóculos Bacterianos.

Previamente a la realización de los ensayos de adherencia bacteriana, resultó necesario obtener los cultivos bacterianos de las cepas a evaluar: *S. aureus* ATCC 25923, *S. uberis* UT109 y *E. coli* ATCC 25922.

En primer lugar, los microorganismos fueron sembrados en medio sólido TS o TH e incubados durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, varias colonias fueron resuspendidas en caldo e incubadas durante 18 h a 37 °C. Seguidamente, una dilución 1/50 de cada una de las cepas en caldo de cultivo se incubó durante 2 h a 37 °C (de modo que el microorganismo se encuentre en fase exponencial) y se utilizó para infectar las células MAC-T.

4.6.2.4. Recuento de Células Previo al Ensayo.

Con el fin de conocer el número real de células epiteliales presentes en los pocillos luego de alcanzar una confluencia del 100%, se realizó la tripsinización (200 µl de tripsina 0,25% - EDTA 0,1% por pocillo) y el recuento celular de dos pocillos destinados a tal fin, según lo descrito en el punto 4.6.2.2.

Para los ensayos de adherencia, se eligió trabajar con una multiplicidad de infección

(MOI: del inglés *multiplicity of infection*) = 100 (100 bacterias por cada célula mamaria), basándose en resultados previos obtenidos en ensayos experimentales realizados en el Laboratorio de Genética Microbiana, por lo que además también se calculó el número de bacterias a agregar en cada pocillo: una vez conocido el número de MAC-T por pocillo y definida la MOI = 100, la cantidad de bacterias por pocillo fue igual a: (número de células) x 100. Con la curva de crecimiento de cada uno de los microorganismos, fue posible extrapolar el recuento bacteriano aproximado a las 2 h de incubación (aproximadamente en el orden de 10^5 para *S. uberis* y 10^7 UFC/ml para *S. aureus* y *E. coli*).

4.6.2.5. Ensayos de Adherencia Bacteriana.

Con el objeto de evaluar la capacidad de las diferentes cepas de adherirse a las células MAC-T, se descartó el medio viejo y las células fueron lavadas 3 veces con 500 μ L de PBS. Seguidamente, se añadió 1 ml de las suspensiones bacterianas (considerando obtener MOI de 100) en cada pocillo, por triplicado (se siembran 3 pocillos). A modo de favorecer el contacto de las bacterias con las células, se centrifugó la placa durante 5 min a 1000 r.p.m., y posteriormente se incubó durante 2 h en estufa con CO_2 a 37 °C.

A continuación, cada pocillo fue lavado 3 veces con PBS con el fin de descartar todas aquellas bacterias no adheridas. Luego, se agregó en cada pocillo 1 ml de tritón 0,025% en agua destilada y se colocó la placa en un agitador durante 10 minutos a 160 r.p.m. a temperatura ambiente con el objetivo de romper las células mamarias. Transcurrido dicho tiempo, el contenido de cada uno de los pocillos fue transferido a un tubo Eppendorff, raspando el fondo de éstos, para realizar el recuento de las bacterias adheridas e internalizadas. Luego, se sembraron en placas de medio sólido 2 gotas de 20 μ L de las mezclas sin diluir y las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

Además, 2 gotas de 20 μ l (duplicado) de la suspensión bacteriana inicial sin diluir y de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} se sembraron también en placas de medio sólido con el objetivo de cuantificar la cantidad de bacterias agregada, la cual se calculó usando la siguiente fórmula:

Recuento de colonias (UFC/ml) = promedio de colonias x 50 x factor de dilución (12)

4.6.2.6. Ensayos de Adherencia Bacteriana sobre células MAC-T en Presencia de Nanopartículas de Plata.

Con el fin de evaluar el efecto de las nanopartículas biosintetizadas sobre la capacidad de adherencia de diferentes cepas bacterianas a las células MAC-T, se realizaron ensayos como los descritos previamente en la sección 4.2.2.5. los cuales incluyeron el agregado de AgNPs. Estas últimas fueron añadidas a concentración sub-CIM (5 pM) a las células MAC-T confluentes, lo que permitió valorar su efecto sobre la adherencia sin inhibir el microorganismo. La mezcla de MAC-T y AgNPs se incubó durante 30 min a 37 °C. Pasado dicho tiempo, se llevó a cabo el agregado de las bacterias y se continuó el ensayo de acuerdo a lo indicado en la sección 4.2.2.5. Dicha secuencia de contacto fue definida considerando el potencial uso de las AgNPs biosintetizadas para la prevención de eventos de mastitis bovina, donde inicialmente tendría lugar el contacto de las nanopartículas con las células epiteliales bovinas, seguido del posible ingreso de los microorganismos y el establecimiento de la infección en la glándula mamaria.

4.6.2.7. Análisis Estadístico

Los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado, siendo los datos obtenidos expresados como media \pm error estadístico (E.E.).

La evaluación de la significación estadística de los tratamientos se realizó mediante ANOVA usando el test de LSD Fisher con el software InfoStat. Las barras de error en la presentación de datos representan el error estándar de la media. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó de manera independiente para cada cepa

4.7. Citotoxicidad

4.7.1. Materiales

4.7.1.1. Línea Celular.

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó la línea celular detallada en el punto 4.6.1.2.

4.7.1.2. Medios de Cultivo Celular.

En el ensayo de citotoxicidad, además del medio de crecimiento detallado en el punto 4.6.1.2., se utilizó el medio de mantenimiento descrito a continuación:

- Medio de mantenimiento de las MAC-T: Medio esencial mínimo Eagle-Earle (Gibco) con aminoácidos no esenciales (Gibco), suplementado con 2% de suero fetal bovino (NATOCOR), 1% de L-glutamina (Gibco) y 50 µg/ml de gentamicina (Laboratorio Veinfar).

4.7.1.3. Soluciones y Reactivos.

- Rojo neutro (Cicarelli)
- Solución decolorante: agua, etanol, ácido acético (50:49:1)

4.7.1.4. Equipos de Laboratorio

- Estufa de CO₂
- Lector de microplacas

4.7.2. Metodología.

4.7.2.1. Citotoxicidad de Nanopartículas de Plata sobre Células MAC-T.

Para evaluar la existencia de un efecto citotóxico de las AgNPs biosintetizadas sobre células MAC-T, se empleó la metodología de captación de Rojo Neutro (Repetto Jiménez y col., 2009), realizándole algunas modificaciones al protocolo original.

Se utilizó una placa de cultivo de 96 pocillos con células alveolares mamarias MAC-T. A las 24 h se eliminó el medio de crecimiento de la placa y se le agregó medio de mantenimiento nuevo conteniendo 8 concentraciones diferentes (por triplicado) de las AgNPs biosintetizadas, dejándose los cultivos de células MAC-T con medio de mantenimiento solo como controles celulares. Al cabo de 48 h de incubación, el medio fue removido y se agregó durante 3 h una solución de rojo neutro (50 µg/ml en medio

esencial mínimo Eagle-Earle). Posteriormente, el colorante contenido en los lisosomas y endosomas de las células viables, se extrajo con una solución de agua:etanol:ácido acético (50:49:1) durante 15 min en agitación continua. La DO del rojo neutro extraído se obtuvo mediante la utilización de un lector de microplacas realizando las lecturas a 540 nm. Los porcentajes de viabilidad celular se determinaron sobre la base de los valores obtenidos de los controles celulares, tomados como 100% de viabilidad, y empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad celular (VC\%)} = \left(\frac{DO_t}{DO_c} \right) \times 100 \quad (13)$$

donde DO_t y DO_c son la densidad óptica del cultivo tratado y del cultivo control, respectivamente. A partir de los resultados obtenidos con esta fórmula, se confeccionaron curvas de viabilidad graficando la concentración de AgNPs en escala logarítmica *versus* el porcentaje de viabilidad celular, las cuales permitieron calcular la CC_{50} de las AgNPs biosintetizadas ensayadas.

*RESULTADOS
Y DISCUSIÓN*

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Caracterización de Cepas Productoras de Mastitis Bovina.

5.1.1. Identificación Bioquímica.

5.1.1.1. Morfología y Tamaño.

Las cepas de patógenos de mastitis bovina previamente aisladas y pertenecientes al cepario de Genética Microbiana de la UNRC, fueron crecidas en los medios sólidos correspondientes (TS o TH) para corroborar la pureza mediante la observación de la homogeneidad en el tamaño y la coloración de las colonias crecidas. Se observaron tres tipos de colonias en los patógenos aislados, por un lado, colonias amarillas, de tamaño mediano y bordes netos; otros aislados exhibieron colonias pequeñas, crecidas como gotas de rocío; y, por último, algunos de los microorganismos crecieron formando colonias blanquecinas, grandes, de aspecto cremoso. Esta observación preliminar de los patógenos fue luego complementada por pruebas metabólicas y/o moleculares.

5.1.1.1.2. Tinción Gram.

Con el objeto de complementar lo observado en cuanto a morfología de las colonias se llevó a cabo la tinción Gram. En este ensayo, los aislados correspondientes a las colonias amarillas, se visualizaron como cocos violetas, mostrando una agrupación en forma de racimos.

Por otro lado, aquellos patógenos que, en medio sólido formaron colonias pequeñas, como gotas de rocío, se observaron como cocos grampositivos dispuestos en cadenas cortas.

Por último, los aislados que crecieron en colonias grandes de aspecto cremoso, se pudieron divisar en forma de bacilos color rosado.

5.1.1.1.3. Catalasa.

Las colonias bacterianas que mostraron ser grampositivos, se sometieron a un ensayo para determinar la presencia de la enzima catalasa en las mismas.

Aquellos patógenos que previamente habían crecido formando colonias medianas amarillas, resultaron positivos para catalasa. Este resultado indicó su pertenencia a la Familia *Staphylococaceae*. Por el contrario, los aislados que crecieron como gotas de rocío en colonias pequeñas, no fueron capaces de degradar el peróxido, por lo que se los clasificó como catalasa negativo. En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos para aquellos aislados negativos (A) y positivos (B) para catalasa.

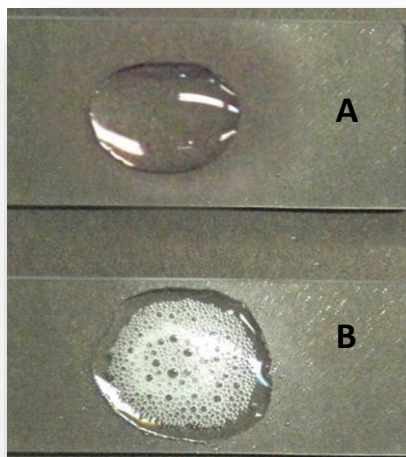


Figura 12. Fotografía que muestra un resultado negativo (A) y positivo (B) para la prueba de la catalasa.

5.1.1.1.4. Medio Selectivo Diferencial.

Las colonias de *E. coli* se sembraron en medio selectivo diferencial E.M.B. exhibiendo un tamaño de 2 a 4 mm de diámetro con un centro grande de color oscuro y brillo verde metálico.

Los microorganismos previamente clasificados como estafilococos (aquellos grampositivos con disposición en racimos y catalasa positivos) se sembraron en el medio selectivo diferencial Chrom Agar, el cual permite diferenciar especies de *Staphylococcus* mediante una coloración distintiva, como se menciona en la sección 4.1.1.2.4.

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos al sembrar los diferentes aislados en medio Chrom Agar. Las cepas de *S. aureus* se observaron de color malva (Figura 13. A.1., A.3., A.4., B.1., B.4., C.3., C.4.), mientras que las cepas *S. haemolyticus* (Figura 13.B.3.) y *Staphylococcus* sp. 1017 TI (Figura 13.C.2.) crema. Las cepas *S. simulans* 9001 TD T7D (Figura 13.C.1.) y *S. hyicus* 1017 TD T7D (Figura 13.A.2.) crecieron exhibiendo

un color amarillo fuerte. Por último, la cepa *S. simulans* 9001 TD (Figura 13.B.2.) puede visualizarse de color grisáceo.

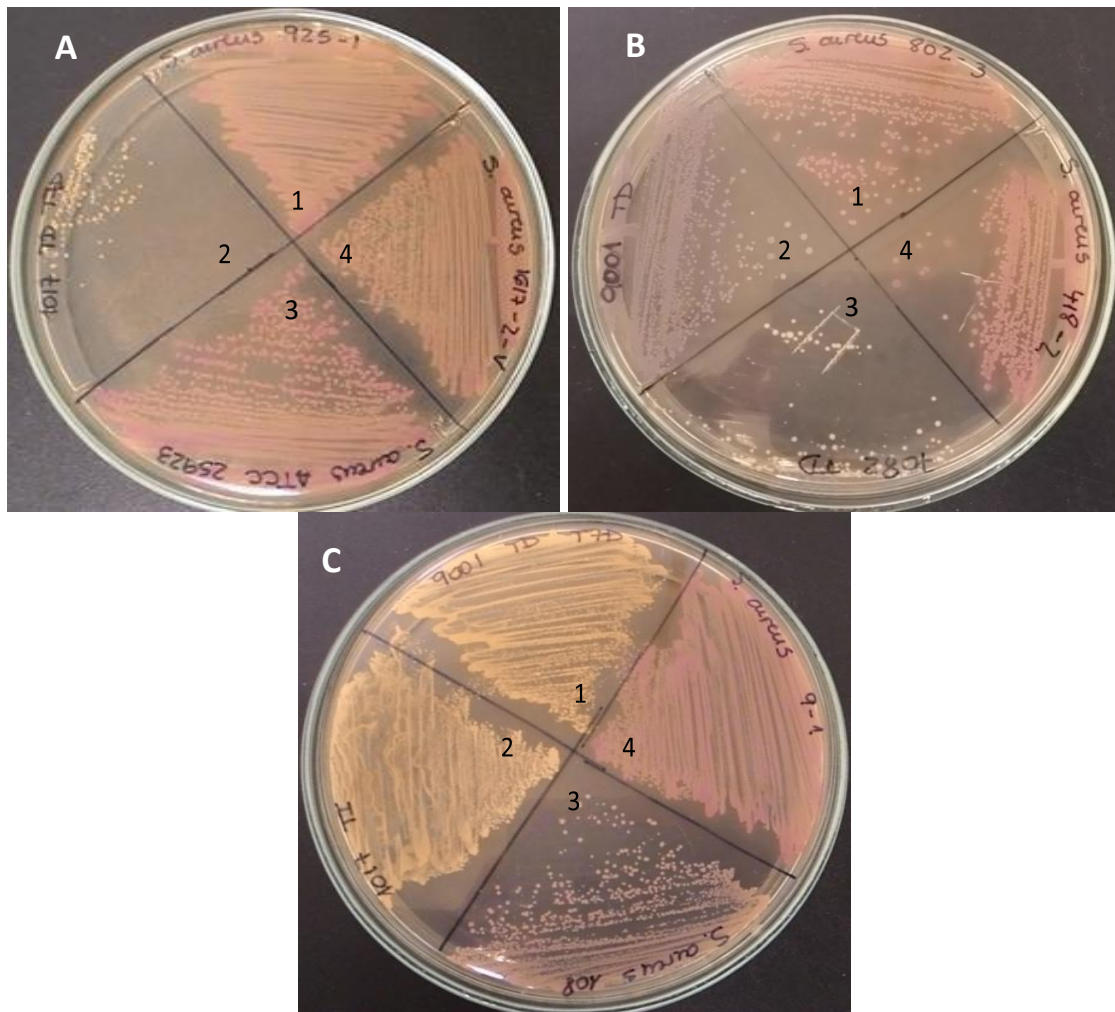


Figura 13. Crecimiento de diferentes cepas de estafilococos en medio selectivo diferencial Chrom Agar. A.1., A.3., A.4., B.1., B.4., C.3. y C.4.: cepas de *S. aureus*. A.2.: *S. hyicus*. B.2.: *S. simulans*. B.3.: *S. haemolyticus*. C.1.: *S. simulans*. C.2.: *Staphylococcus* spp 1017 TL.

5.1.2. Identificación Molecular.

5.1.2.1. Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Luego de realizar la extracción del ADN según lo detallado en la sección 4.1.2.2.1.1. de Materiales y Métodos, se amplificó el gen *groEL* a partir del ADN genómico, según se detalla en punto 4.1.2.2.1.2., y los productos de la reacción de PCR se sembraron en

un gel agarosa al 1%. Para todas las cepas de *Staphylococcus*, se observó una única banda de 550 pb correspondiente al gen *groEL* (Figura 14).

Para las cepas 1 y 4, correspondiente a los aislados *S. aureus* 108 y *Staphylococcus* spp. 1017 TI, no fue posible obtener ADN mediante la técnica de extracción utilizada. Ésto puede deberse a que estas cepas presentarían algún tipo especial de cápsula, por lo que la concentración de lisostafina o el tiempo de incubación no fueron lo suficiente para romper las células y liberar el ADN.

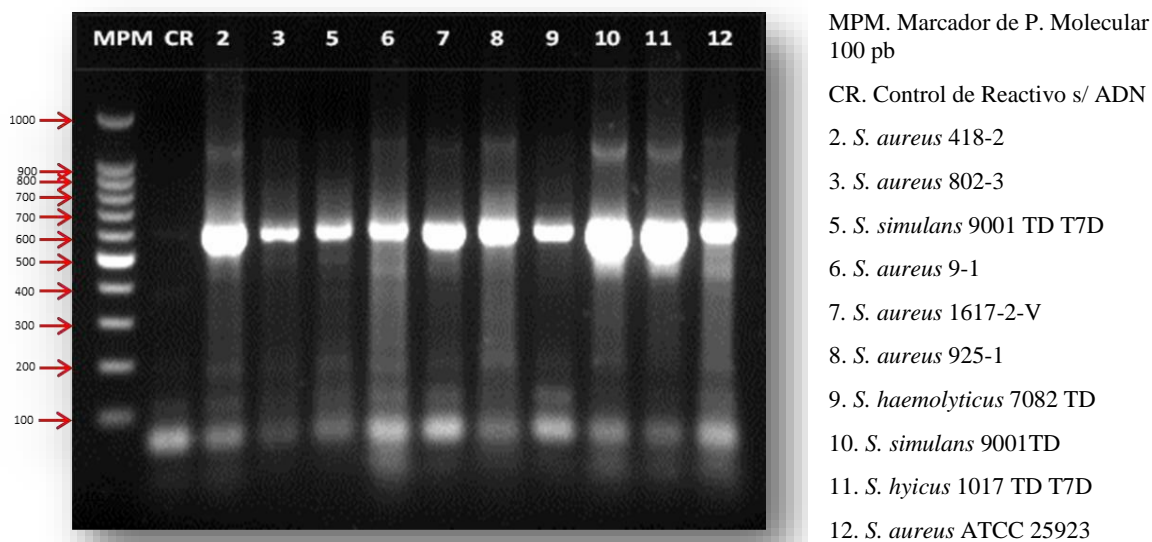


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de 550 pb del gen *groEL* de cepas de *Staphylococcus* spp. utilizando los cebadores H279A y H280A.

5.1.2.2. Digestión con Enzima de Restricción *AluI*.

Los productos de 550 pb resultantes de la amplificación del gen *groEL*, fueron digeridos con la enzima *AluI* según lo documentado en literatura (Barros y col., 2007) con el objetivo de identificar a nivel de especie los microorganismos aislados, como se describe en la sección 4.1.2.2.1.4.

En la Figura 15 se observan los perfiles obtenidos para cada uno de los microorganismos. Los aislados **2, 3, 6, 7, 8 y 12** presentaron una banda a 258 pb, otra a 204 pb y por último una a la altura de 78 pb, perfil correspondiente a *S. aureus*. Los aislados **5 y 10** presentaron 3 bandas, una a 246 pb, otra 147 pb y una última a 114 pb, siendo dicho perfil perteneciente a la especie *S. simulans*. Para el aislado **9** se observó una banda a 438 y otra a 107 pb, correspondiente a *Staphylococcus haemolyticus*. Por último, el aislado **11**, que presentó bandas a la altura de 400 pb, entre 100 y 200 pb y por debajo

de 100 pb, no pudo ser identificado utilizando una digestión enzimática simple, debido a que el perfil arrojado podría corresponder a *S. chromogenes*, *S. capitis* o *S. hyicus*. Por ello, se llevó a cabo entonces, una doble digestión con *Hind*III y *Pvu*II, con el fin de identificar con exactitud a nivel de especie.

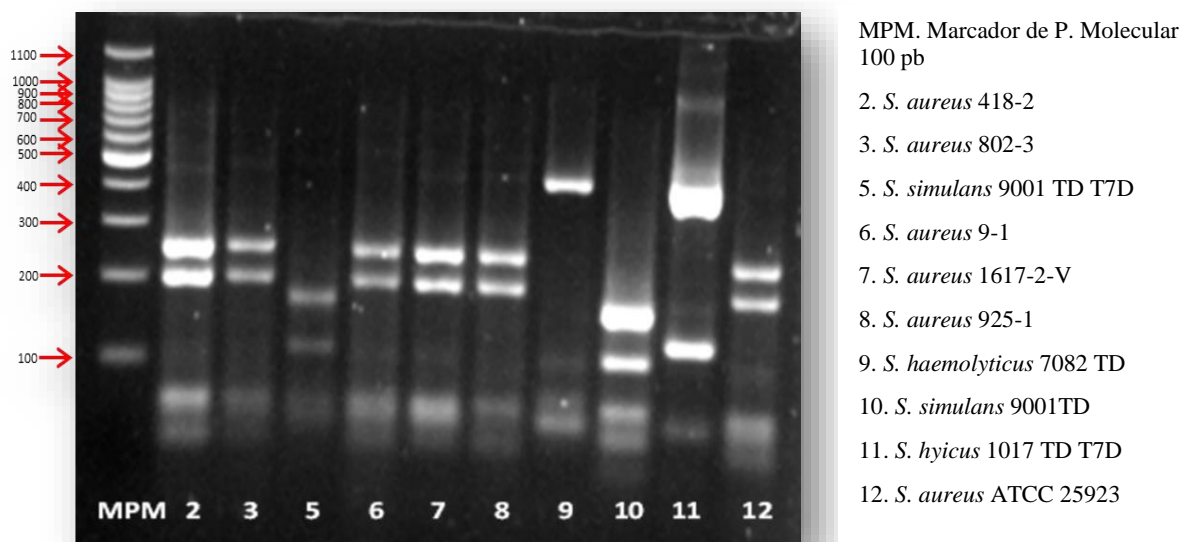
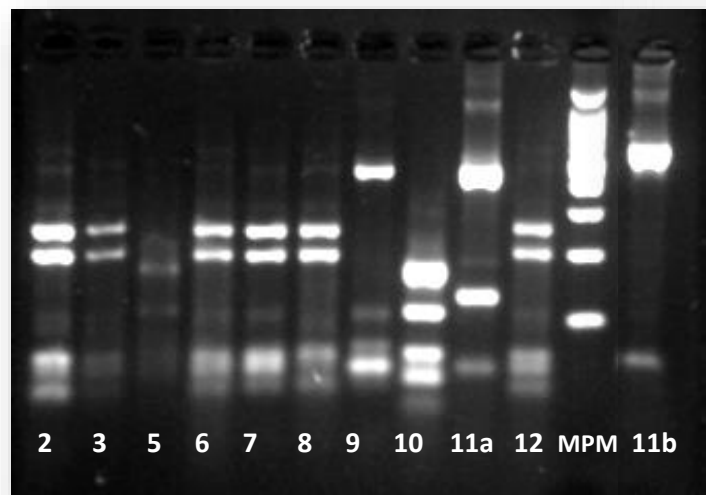


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos por la digestión con *Alu*I de los amplicones estafilocócicos.

5.1.2.3. Doble Digestión con Enzimas de Restricción *Hind*III y *Pvu*II.

Si bien a partir de la digestión con *Alu*I la mayoría de las cepas pudieron ser identificadas, el aislado **11** no mostró patrones que permitan su identificación, por lo cual se llevó a cabo una doble digestión enzimática con *Hind*III y *Pvu*II, como se detalló en la sección 4.1.2.2.1.5.

La Figura 16 muestra los perfiles obtenidos al digerir todas las cepas de estafilococos con *Alu*I (calles de la 1 a la 10) y la doble digestión de con *Hind*III y *Pvu*II (calles 12 y 13). El perfil obtenido para el doble corte de la cepa **11** (una única banda en 539 pb, calle 11b) nos permite identificarla como *S. hyicus* según lo descrito previamente en literatura (Santos y col., 2008).



- 2. *S. aureus* 418-2
- 3. *S. aureus* 802-3
- 5. *S. simulans* 9001 TD T7D
- 6. *S. aureus* 9-1
- 7. *S. aureus* 1617-2-V
- 8. *S. aureus* 925-1
- 9. *S. haemolyticus* 7082 TD
- 10. *S. simulans* 9001TD
- 11a. *S. hycus* 1017 TD T7D (digestion simple)
- 12. *S. aureus* ATCC 25923
- MPM. Marcador de P. Molecular 100 pb
- 11b. *S. hycus* 1017 TD T7D (digestion doble)

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos por la digestión con *AluI* (2-12) y *HindIII* y *PvuII* (11b) de los amplicones estafilocócicos.

La identificación de los microorganismos causantes de mastitis bovina se llevó a cabo mediante diferentes pruebas bioquímicas y técnicas moleculares. Dentro de las primeras, la tinción de Gram permitió realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, mientras que los resultados arrojados por la siembra de las cepas de estafilococos en medio selectivo diferencial Chrom Agar fueron los más significativos en cuanto a identificación. Para los aislados pertenecientes a la especie *S. aureus*, los resultados obtenidos por ambas metodologías fueron consistentes y acordes entre sí, ya que los mismos comparten tanto características fenotípicas como patrones genéticos. Con respecto a los aislados correspondientes a otras especies estafilocócicas, si bien pueden compartir características fenotípicas, no ocurre lo mismo a nivel genético donde cada una de las especies presentó un perfil de bandas específico que permitió su identificación. En conclusión, la utilización de Chrom Agar es confiable como método de identificación cuando se trata de diferentes cepas de *S. aureus*, debido a que las características de los cultivos se corresponden en todas las cepas microbianas pertenecientes a esta especie. En tanto que, la sospecha de *Staphylococcus* spp. no pertenecientes a *S. aureus* requieren herramientas moleculares para realizar una correcta identificación de las mismas.

Como ya se mencionó previamente, los microorganismos causantes de mastitis bovina pueden ser clasificados como contagiosos o ambientales, dependiendo de su modo de transmisión. Además, algunos de ellos se caracterizan por estar asociados a un tipo de infección específica, ya sea clínica o subclínica. Otros son capaces de evadir los mecanismos de defensa de la vaca, persistiendo en la glándula mamaria y generando una

enfermedad crónica convirtiendo, de este modo, al animal en un potencial reservorio del microorganismo lo que significaría una fuente de infección para el rebaño (Fernandez Bolaños y col., 2012). Debido a lo expuesto, en este trabajo resultó de gran importancia la identificación a nivel de especie de los microorganismos aislados de muestras de leche de vacas con mastitis, provenientes de la cuenca lechera de Córdoba, para poder luego evaluar el efecto antimicrobiano de las AgNPs biosintetizadas sobre especies específicas (Taponen y col., 2016). Además, teniendo conocimiento de cuáles son los microorganismos patógenos productores de la enfermedad, es posible generar un tratamiento adecuado y específico de la mastitis bovina a su vez, emplear distintas estrategias para la prevención de episodios con *S. aureus*, ya que es uno de los principales patógenos productores de mastitis que causa un impacto negativo en la salud de la vaca, la calidad de la leche y la productividad, así como también un aumento en el uso de medicamentos y servicios veterinarios (Puacz y col., 2015). En respuesta a ello, es de suma importancia evaluar el efecto de las AgNPs sobre varias cepas de esta especie, ya que pueden presentar perfiles de factores de virulencia variados. En este estudio la mitad de los aislamientos estafilocócicos correspondieron a cepas de *S. aureus*, lo que indica nuevamente que dicho microorganismo se presenta como el patógeno de mayor relevancia en los tambos relevados.

Una de las posibles razones de la marcada prevalencia de *S. aureus* en la mayoría de los rodeos lecheros, se debe a la dificultad que se presenta al momento de eliminar la infección por este microorganismo. Esto puede explicarse por la amplia variedad y cantidad de factores de virulencia que posee: toxinas, enzimas, factores involucrados en la adhesión a la célula hospedadora y factores asociados a la evasión de la respuesta inmune, ya sea a nivel del complemento, opsonización o péptidos antimicrobianos (Zecconi y col., 2013). Estos diferentes factores de virulencia, convierten a este microorganismo en un patógeno capaz de resistir a la terapia antimicrobiana.

Además de *S. aureus*, los estafilococos coagulasa negativos (SCN) han tomado relevancia como patógenos causantes mastitis bovina en muchos países. Por ello, los estafilococos se identificaron a nivel de especie mediante los métodos moleculares detallados previamente. Así, el tamaño y número de los fragmentos obtenidos por las digestiones con *AluI* o *HindIII/PvuII* permitió la generación de patrones claros de diferenciación.

A pesar de las variaciones entre rodeos y países, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* se presentan como los SCN más frecuentemente aislados

de muestras de leche de vaca de todo el mundo (Taponen y col., 2015; Raspanti y col., 2016). En el presente trabajo de tesis doctoral, de los SCN aislados, 2 correspondieron a *S. simulans*, 1 a *S. hyicus* y 1 a *S. haemolyticus*.

Considerando que la correcta identificación a nivel de especie es de importancia para el control de la mastitis, la PCR-RFLP del gen *groEL* resultó ser una herramienta adecuada para la identificación de los estafilococos más comunes, patógenos de animales, independiente de sus características fenotípicas (Santos y col., 2008).

5.2. Síntesis y Caracterización Físicoquímica de Nanopartículas de Plata.

Como se indicó en el punto 4.2.2.2. para la obtención de AgNPs se evaluaron diferentes condiciones de síntesis variando la concentración de AgNO_3 de partida. La bioreducción de iones Ag^+ a nanopartículas coloidales se observó visualmente mediante el cambio de color de incoloro (solución de AgNO_3) (Figura 17.A) a marrón amarillento (Figura 17.B) y se confirmó mediante análisis espectral UV-vis. Esto es posible debido a que la aparición de una banda de absorción intensa alrededor de 420 nm es indicativo de la presencia de AgNPs en la solución.

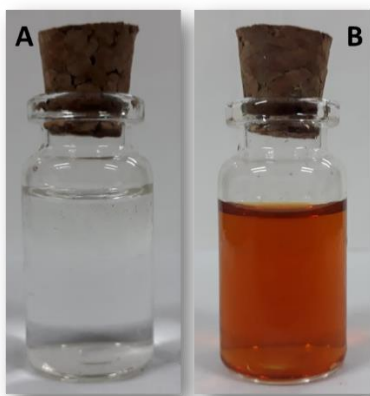


Figura 17. A) Solución de AgNO_3 . B) Suspensión coloidal de AgNPs biosintetizadas.

El color de las suspensiones coloidales de las AgNPs biosintetizadas se debe a la absorción del plasmón superficial, que se genera por las oscilaciones inducidas por la incidencia de la luz, de los electrones de la banda de conducción presentes en la superficie metálica (Mulvaney, 1996).

Para cada una de las concentraciones de AgNO_3 evaluada (0,1 mM; 1 mM y 10 mM), la síntesis se siguió vía espectroscopía UV-vis e imágenes TEM. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18.

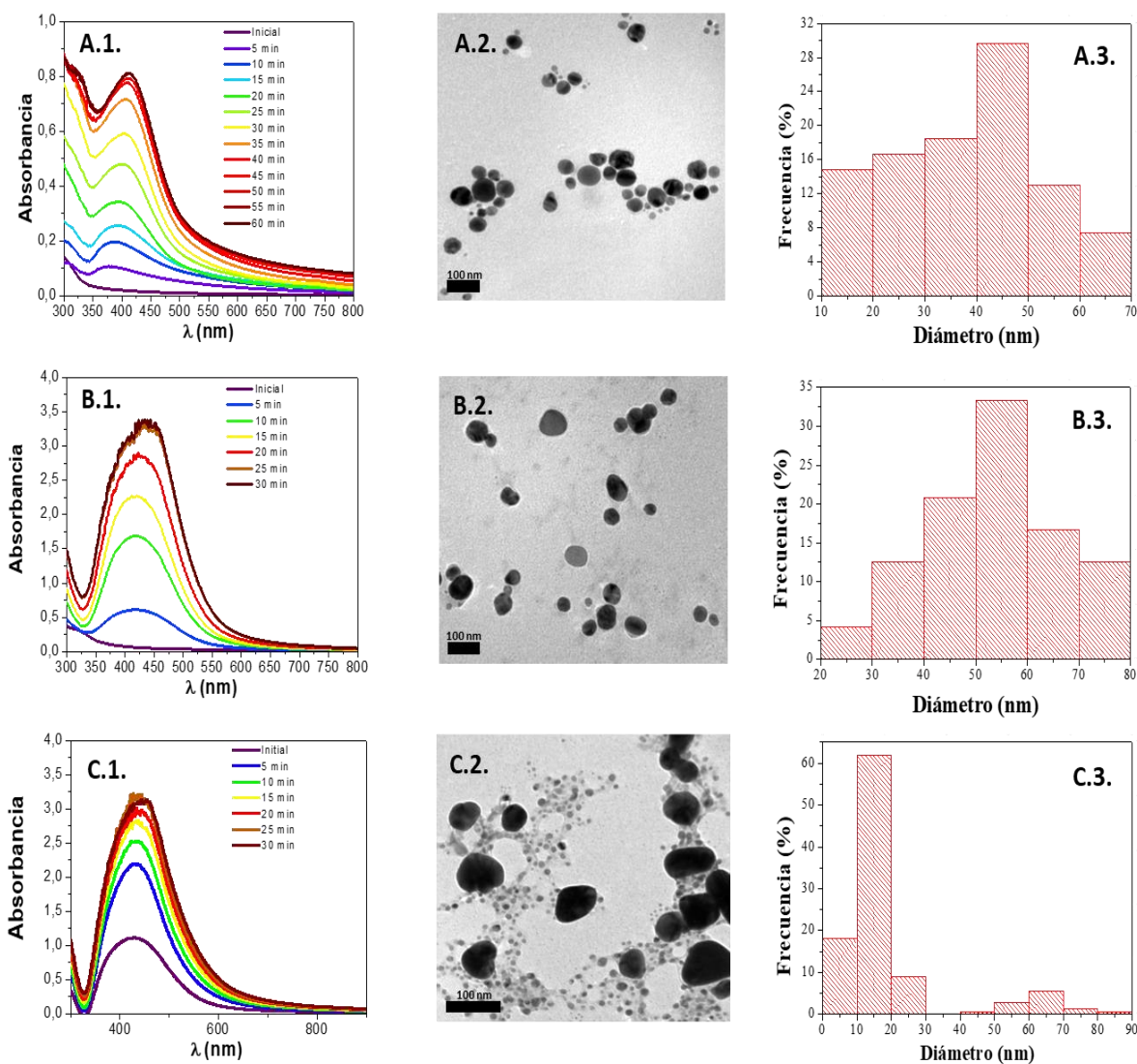


Figura 18. Evolución temporal del espectro de absorción UV-vis y micrografía TEM de histograma de distribución de tamaños de las AgNPs biosintetizadas para las diferentes concentraciones de AgNO_3 utilizadas en la síntesis A.1., A.2., A.3. 0,1 mM; B.1., B.2., B.3. 1 mM y C.1., C.2., C.3. 10 mM.

En la Figura 18.A.1. es posible notar que para la concentración de partida de AgNO_3 de 0,1 mM, el proceso biosintético se llevó a cabo durante 60 min manteniendo el calentamiento los primeros 30 min de reacción. En estas condiciones, se logró obtener AgNPs polidispersas, a bajas concentraciones, con un diámetro promedio de (42 ± 9) nm (Figuras 18.A.2. y 18.A.3.).

Por otro lado, cuando la síntesis se llevó a cabo con AgNO_3 1 mM (Figura 18.B.1.), el proceso tuvo una duración de 30 min siendo los primeros 15 con calentamiento. Se generó una mayor concentración de AgNPs y las mismas resultaron de menor polidispersidad pero con mayor tamaño ((53 ± 8) nm) (Figuras 18.B.2. y 18.B.3.)

Por último, con AgNO_3 10 mM (Figura 18.C.1.), la generación de AgNPs fue prácticamente inmediata y el sistema llega a la saturación rápidamente. Bajo estas condiciones, se obtuvieron dos poblaciones de nanopartículas con diferentes tamaños, una con un diámetro promedio de (15 ± 4) nm, mientras que las AgNPs de la otra población son de mayor tamaño, (63 ± 8) nm, con respecto a las obtenidas con las condiciones de biosíntesis precedentes (Figuras 18.C.2. y 18.C.3.).

Las concentraciones crecientes de AgNO_3 condujeron a un desplazamiento hacia el rojo de los máximos de absorción y un pico más amplio que indica un tamaño mayor de las AgNPs biosintetizadas. Esto se confirmó mediante las imágenes de TEM obtenidas para cada concentración, donde se puede observar que las nanopartículas presentan una forma predominantemente esférica con un diámetro promedio creciente (de 42 a 63 nm) que depende de la relación entre la concentración de la sal metálica y el volumen del agente reductor (extracto).

Si bien la síntesis resultó exitosa para las condiciones de síntesis ensayadas, en la Tabla 6 se indica el mejor compromiso entre dichas condiciones para obtener AgNPs con menor polidispersidad de tamaños y procesos biosintéticos reproducibles.

Tabla 6. Condiciones óptimas de síntesis *green* de AgNPs con extracto acuoso de achicoria.

Extracto acuoso vegetal	Volumen del Extracto (ml)	[AgNO_3] (mM)	Tiempo (min)
<i>Achicoria</i>	5	1	30

La Figura 19 expone como ejemplo un patrón de difracción de rayos X de las AgNPs obtenidas empleando extracto acuoso de achicoria. Los picos de difracción a $38,1^\circ$, $44,2^\circ$, y $64,5^\circ$ fueron asignados a los planos reticulares (111), (200) y (220) de una estructura cúbica centrada en la cara, respectivamente. Este resultado permite confirmar la naturaleza cristalina de las AgNPs biosintetizadas, lo cual acuerda con aquellas síntesis “*green*” de nanopartículas metálicas reportadas en literatura (Basavegowda y Lee, 2013;

Nazeruddin y col., 2014). En adición a estos picos representativos, en la Figura 20 se pueden apreciar otros picos los cuales sugieren la cristalización de una fase bioorgánica sobre la superficie de las AgNPs, la cual sería la responsable de brindar la funcionalización superficial necesaria para favorecer la estabilidad de la suspensión coloidal y evitar su aglomeración (Basavegowda y Lee, 2013).

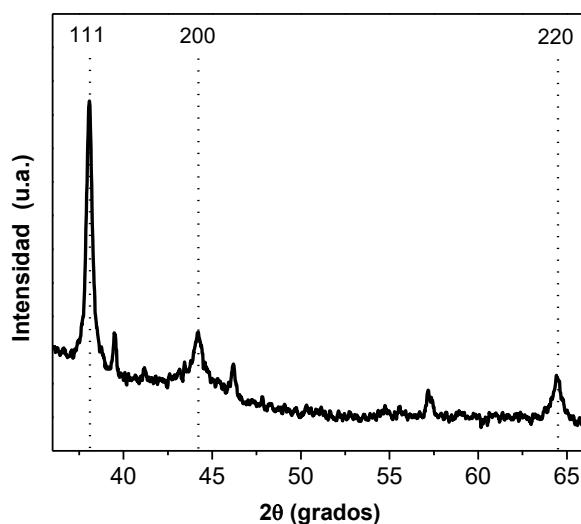


Figura 19. Espectro XRD de AgNPs biosintetizadas empleando el extracto acuoso de hojas de achicoria.

Una posible explicación de la síntesis *green* de AgNPs se basa en la capacidad de los componentes del extracto vegetal de actuar como agentes reductores. Es decir, las biomoléculas presentes en el extracto acuoso vegetal, principalmente polifenoles y flavonoides (Innocenti y col., 2005), son las responsables de la reducción de Ag^+ a Ag^0 y la funcionalización superficial de las nanopartículas.

5.3. Evaluación de la Actividad Antibacteriana de las AgNPs Biosintetizadas

5.3.1. Difusión en Placa. Técnica de Disco.

La capacidad de las nanopartículas biosintetizadas para inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas productoras de mastitis bovina previamente identificadas fue evaluada mediante la técnica de difusión en disco detallada en la sección 4.3.2.1. de Materiales y Métodos.

La Tabla 7 muestra el valor del diámetro de los halos de inhibición (en mm) obtenidos para cada cepa productora de mastitis bovina luego de la incubación con 40 pM de AgNPs biosintetizadas. En tanto que, una imagen representativa de los resultados indicados en esta tabla, para algunas cepas bacterianas, puede observarse en la Figura 20. Además, la capacidad antimicrobiana de las AgNPs *green* se comparó con la de algunos antibióticos de uso convencional en mastitis bovina. Los resultados obtenidos se muestran la Tabla 7 y la Figura 21.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de AgNPs biosintetizadas con extracto de achicoria (40 pM) y diferentes antibióticos obtenida por técnica de difusión en disco.

Cepas Bacterianas	Halo de Inhibición* (mm)						
	AgNPs (40 pM)	Novobiocina (5 µg)	Estreptomicina (10 µg)	Eritromicina (15 µg)	Ampicilina + Sublac (10 + 10 µg)	Rifampicina (5 µg)	Gentamicina (10 µg)
<i>S. aureus</i> 108	10 ± 2	22 ± 2 (#)	14,6 ± 0,6 (#)	21 ± 2 (#)	39 ± 2 (#)	23 ± 3 (#)	16 ± 2 (#)
<i>S. aureus</i> 418-2	11 ± 1	23 ± 2 (#)	15 ± 1 (#)	25,3 ± 0,6 (#)	19 ± 3 (#)	20 ± 2 (#)	18 ± 2 (#)
<i>S. aureus</i> 802-3	11 ± 2	21 ± 3 (#)	18 ± 2 (#)	24 ± 3 (#)	39 ± 1 (#)	31 ± 3 (#)	18 ± 4 (#)
<i>S. aureus</i> 9-1	12 ± 2	23 ± 4 (#)	17 ± 1 (#)	22 ± 3 (#)	41 ± 1 (#)	31 ± 3 (#)	20 ± 2 (#)
<i>S. aureus</i> 1617-2-V	13 ± 1	25 ± 2 (#)	18 ± 3 (#)	24 ± 4 (#)	42 ± 1 (#)	33 ± 3 (#)	21 ± 3 (#)
<i>S. aureus</i> 925-1	9,3 ± 0,6	23 ± 1 (#)	16 ± 2 (#)	23 ± 2 (#)	40 ± 2 (#)	27 ± 2 (#)	18 ± 3 (#)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10,6 ± 0,6	23 ± 3 (#)	19 ± 2 (#)	25 ± 4 (#)	43 ± 3 (#)	28 ± 4 (#)	19 ± 3 (#)
<i>S. simulans</i> 9001 TD T7D	10 ± 1	22 ± 3 (#)	17 ± 2 (#)	29 ± 2 (#)	20 ± 2 (#)	3 ± 2 (#)	20 ± 3 (#)
<i>S. simulans</i> 9001 TD	10,6 ± 0,6	22 ± 2 (#)	16,3 ± 2 (#)	29 ± 1 (#)	19 ± 2 (#)	31 ± 2 (#)	19 ± 2 (#)
<i>S. spp.</i> 1017 TI	12 ± 2	23 ± 2 (#)	16 ± 0,6 (#)	29 ± 2 (#)	22 ± 1 (#)	33 ± 4 (#)	19 ± 3 (#)
<i>S. haemolyticus</i> 7082 TD	15 ± 1	23 ± 3 (#)	17 ± 1	28 ± 2 (#)	23 ± 1 (#)	29 ± 3 (#)	21 ± 3 (#)
<i>S. hyicus</i> 1017 TD T7D	9 ± 1	23 ± 2 (#)	14,6 ± 0,6 (#)	24,6 ± 0,6 (#)	41 ± 1 (#)	31 ± 3 (#)	22 ± 2 (#)
<i>S. uberis</i> UT 102	13 ± 1	12,6 ± 0,6	13 ± 1	30 ± 1 (#)	22 ± 3 (#)	13 ± 3	16 ± 1
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	8,6 ± 0,6	13 ± 1 (#)	14,3 ± 0,6 (#)	25 ± 2 (#)	21 ± 2 (#)	14 ± 2 (#)	16 ± 2 (#)
<i>S. uberis</i> 28	9,6 ± 0,6	14 ± 3 (#)	13 ± 1 (#)	25 ± 2 (#)	19 ± 3 (#)	14 ± 2 (#)	15 ± 2 (#)
<i>S. uberis</i> 17	9,3 ± 0,6	15 ± 2 (#)	12,3 ± 0,6 (#)	27 ± 3 (#)	13 ± 1 (#)	13 ± 2 (#)	15 ± 2 (#)
<i>S. uberis</i> 10	11,6 ± 0,6	15 ± 2 (#)	13 ± 2	30 ± 1 (#)	25 ± 3 (#)	13 ± 1	14 ± 2
<i>S. uberis</i> 59	11 ± 1	14 ± 1 (#)	14,3 ± 0,6 (#)	28 ± 2 (#)	23 ± 3 (#)	12 ± 2 (#)	14 ± 2 (#)
<i>S. uberis</i> 84	11,3 ± 0,6	12 ± 2	13 ± 1	21 ± 2 (#)	30 ± 3 (#)	12 ± 3	16 ± 1 (#)
<i>S. uberis</i> 109	8,6 ± 0,6	15 ± 2 (#)	14 ± 2 (#)	15 ± 2 (#)	22,3 ± 0,6 (#)	11 ± 1	16,6 ± 0,6 (#)
<i>S. bovis</i> 9809	12 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	20 ± 1 (#)	19,6 ± 0,6 (#)	12 ± 2	12 ± 3
<i>S. dysgalactiae</i> ATCC 27957	9 ± 1	14 ± 2 (#)	13 ± 1 (#)	17 ± 2 (#)	18 ± 2 (#)	12 ± 2 (#)	10 ± 2
<i>E. coli</i> ATCC 27957	10,6 ± 0,6	19 ± 1 (#)	17,6 ± 0,6 (#)	29 ± 1 (#)	20 ± 2 (#)	23 ± 2 (#)	21 ± 2 (#)
<i>E. coli</i> (ambiental)	9,6 ± 0,6	17 ± 2 (#)	16 ± 2 (#)	28 ± 2 (#)	19 ± 1 (#)	21 ± 2 (#)	20 ± 2 (#)

*Los datos muestran la media ± E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado.

Halos de inhibición significativamente mayores ($p < 0,05$) que los generados por AgNPs

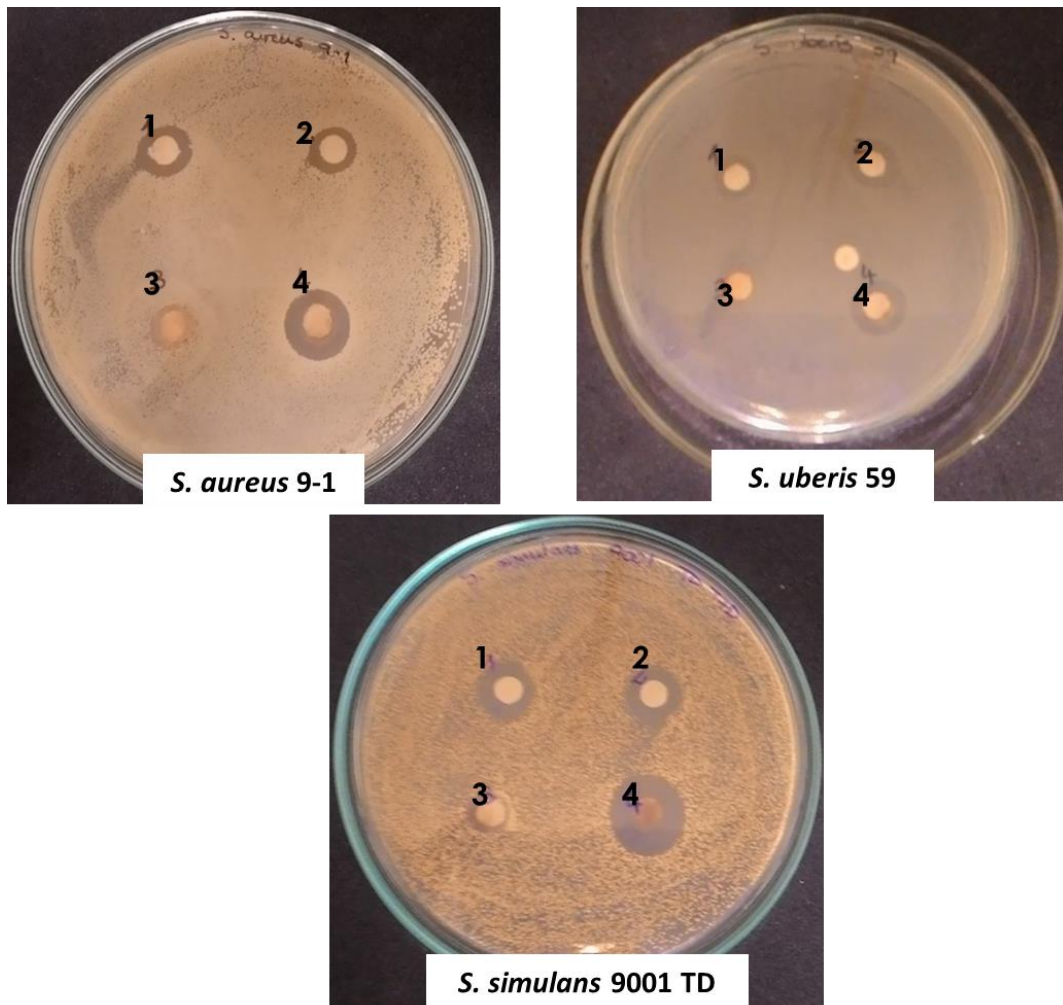


Figura 20. Halos de inhibición producidos por las AgNPs biosintetizadas sobre diferentes microorganismos. AgNPs (40 pM) (por triplicado: 1-2-4). Control AgNO_3 1 μM (3).

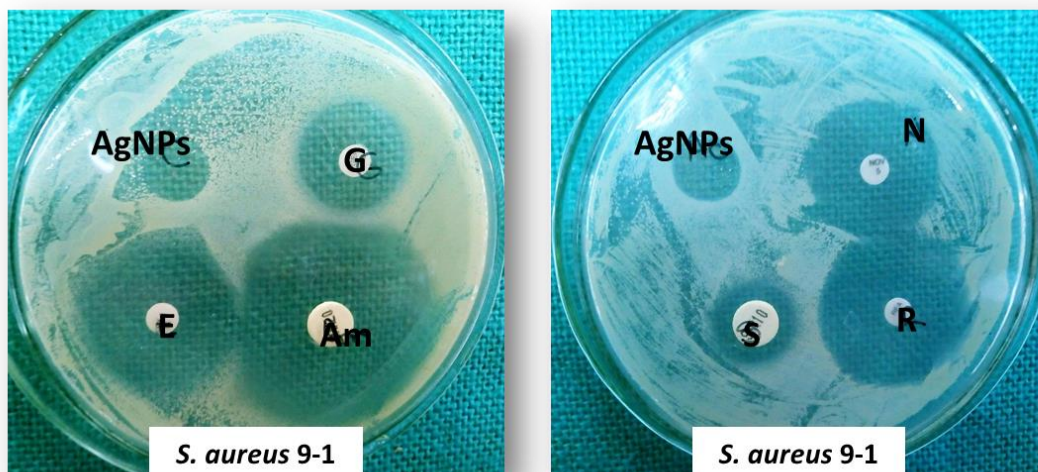


Figura 21. Comparación de la actividad antibacteriana de las AgNPs *green* y diferentes antibióticos sobre *S. aureus* 9-1 por técnica de difusión en disco. **Am:** Ampicilina + Sublac, **E:** Eritromicina, **G:** Gentamicina, **N:** Novobiocina, **S:** Estreptomicina, **R:** Rifampicina.

Como puede observarse en los resultados expuestos en la Tabla 7, las AgNPs sintetizadas a partir del extracto acuoso de achicoria tuvieron actividad antibacteriana sobre todas las cepas evaluadas, independientemente de la especie. Es de importancia resaltar que los ensayos control, llevados a cabo con el extracto acuoso vegetal y una solución de AgNO_3 1 μM , ambos precursores de síntesis, no mostraron actividad inhibitoria apreciable sobre las cepas evaluadas.

Asimismo, para todas las cepas evaluadas se pueden observar halos de inhibición comprendidos entre 8,5 y 15 mm, lo que denota una destacable actividad antimicrobiana de las AgNPs biosintetizadas si se tiene en cuenta que la concentración utilizada de las mismas es del orden del picomolar (40 pM). Estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores, los cuales evaluaron la actividad antimicrobiana de AgNPs biosintetizadas en diferentes cepas, tanto gramnegativas como grampositivas, y concluyeron que dicha actividad es dependiente de la concentración de nanopartículas utilizada (Mata y col., 2015). Otros estudios han indicado que la capacidad antibacteriana de las AgNPs sintetizadas de manera *green* sobre diferentes cepas patógenas de humanos es también dependiente de factores tales como su tamaño y morfología (Ashokkumar y col., 2015). Así, una disminución en el tamaño de las AgNPs podría conducir a un aumento de la sustancia antimicrobiana en la superficie de la bacteria, lo que sugiere a su vez, un aumento en su capacidad de penetrar la membrana celular con la consecuente mejora de la actividad antibacteriana.

Es posible notar en los resultados exhibidos en la Tabla 7 que todos los antibióticos utilizados tuvieron actividad sobre los tres géneros bacterianos evaluados. Resulta de importancia resaltar que, si bien los halos de inhibición generados por estos antibióticos fueron en la mayoría de los casos significativamente mayores que los producidos por las AgNPs ($p < 0,05$), para algunas cepas no se registraron diferencias significativas entre los halos de inhibición producidos por el antibiótico y las AgNPs. En tal sentido, los halos generados por las AgNPs y por la estreptomina no resultaron significativamente diferentes para *S. haemolyticus* 7082 TD ($p > 0,05$); lo mismo ocurrió para *S. uberis* 102 y *S. bovis* 9809, donde no se registraron diferencias significativas entre las AgNPs con rifampicina, novobiocina, estreptomina ni gentamicina ($p > 0,05$); en el caso de *S. uberis* 10, los halos generados por las AgNPs no resultaron significativamente diferentes a aquéllos producidos con rifampicina, estreptomina y gentamicina ($p > 0,05$); para *S. uberis* 84, las AgNPs produjeron halos que no fueron significativamente diferentes a los de novobiocina, rifampicina y estreptomina ($p > 0,05$); en cuanto a *S. uberis* 109, las

AgNPs no mostraron diferencias con respecto a rifampicina ($p > 0,05$); y por último, para *S. dysgalactiae* ATCC 25957, la inhibición generada por las AgNPs no resultó significativamente diferente que con gentamicina. Sin embargo, se debe destacar que las AgNPs se utilizaron a una concentración mucho menor (40 pM) que las de los antibióticos (entre 5 y 20 µg), demostrando así que las AgNPs exhiben *in vitro* una considerable actividad antibacteriana a concentraciones 6 órdenes de magnitud menores que los antibióticos de uso convencional en veterinaria.

5.3.2. Microdilución en Caldo

Para cuantificar la inhibición del crecimiento bacteriano observada previamente con la técnica de difusión en disco, se determinó la CIM de las AgNPs biosintetizadas utilizando la técnica de microdilución en placa.

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos con esta técnica, la cual además de confirmar la capacidad antimicrobiana de las AgNPs que denotaban los halos de inhibición del crecimiento en placa, permitió valorar la concentración mínima necesaria para generar dicha inhibición.

Tabla 8. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de AgNPs biosintetizadas con extracto de achicoria obtenida por técnica de microdilución en caldo.

Cepas Bacterianas	CIM de AgNPs* (pM)
<i>S. aureus</i> 108	30
<i>S. aureus</i> 418-2	29
<i>S. aureus</i> 802-3	30
<i>S. aureus</i> 9-1	30
<i>S. aureus</i> 1617-2-V	28
<i>S. aureus</i> 925-1	29
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	30
<i>S. simulans</i> 9001 TD T7D	27
<i>S. simulans</i> 9001TD	25
<i>S. spp.</i> 1017 TI	24
<i>S. haemolyticus</i> 7082 TD	25
<i>S. hyicus</i> 1017 TD T7D	26

<i>S. uberis</i> UT 102	24
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	30
<i>S. uberis</i> 28	21
<i>S. uberis</i> 17	28
<i>S. uberis</i> 10	25
<i>S. uberis</i> 59	24
<i>S. uberis</i> 84	26
<i>S. uberis</i> 109	30
<i>S. bovis</i> 9809	24
<i>S. dysgalactiae</i> ATCC 27957	25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	28
<i>E. coli</i> (ambiental)	30

*Los datos muestran la media de realizar cada ensayo por triplicado. El rango del E.E.R. asociado se encontró entre el 10 y 18%.

Los datos expuestos en la Tabla 8 permiten indicar que, en términos generales, todas las cepas evaluadas requieren concentraciones similares de AgNPs para inhibir su crecimiento. Asimismo, se debe destacar que, dentro del género *Staphylococcus*, las cepas identificadas como *S. aureus* fueron las que presentaron los valores de CIM más elevados. Esto puede racionalizarse al considerar el extraordinario repertorio de factores de supervivencia que esta especie presenta, que la convierte a su vez en un microorganismo resistente al tratamiento antibiótico y hace, además más difícil su eliminación del rodeo (Camussone y Calvino, 2013).

Se ha reportado susceptibilidad diferencial a las AgNPs entre bacterias gramnegativas y grampositivas, la cual se han fundamentado en las diferencias existentes en la estructura de su pared celular, requiriendo estas últimas concentraciones más elevadas de AgNPs para inhibir su desarrollo. Las bacterias gramnegativas serían más susceptibles debido a que los iones Ag^+ provenientes de la disolución oxidativa de las nanopartículas interactuarían con el LPS de la membrana celular, cargado negativamente, con mayor afinidad en comparación con los grampositivos, lo que resultaría en la formación de poros en la membrana celular alterando de este modo su funcionalidad (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Gogoi y col., 2006).

Sin embargo, a pesar de que la pared celular de peptidoglicanos relativamente gruesa y continua en bacterias grampositivas podría restringir la entrada de AgNPs, las interacciones de ácido teicoico (que abarca la capa de peptidoglicano) con los agentes de protección bio reductivos de las AgNPs (fenol, proteínas, ésteres) podrían facilitar su entrada en especies bacterianas grampositivas (Jain y col., 2015).

En el presente trabajo, las discrepancias en la capacidad antibacteriana de las AgNPs no fueron puestas de manifiesto, siendo todos los microorganismos inhibidos por similares concentraciones de AgNPs, denotando de ese modo una acción antibacteriana equipotente de amplio espectro. Estos resultados son acordes a los reportados por otros investigadores donde se informa una acción antibacteriana de amplio espectro similar de las AgNPs *green* (Otunola y Afolayan, 2018).

Si bien el mecanismo de acción por el cual las AgNPs ejercen su efecto antibacteriano aún no se encuentra completamente establecido, muchas investigaciones indican que ejercen su actividad bactericida a través de la liberación de iones Ag^+ (individualmente o en combinación) seguido de un aumento de la permeabilidad de la membrana y una pérdida de fuerza protón-motriz lo que induce la desenergización de las células y flujo de salida de fosfato, fuga de contenido celular y alteración de la replicación del ADN (Zhang y col., 2010). La plata tiene una naturaleza ácida suave y actúa sobre las bases de azufre y fósforo del ADN desactivando su replicación, lo que deshabilita a su vez la maquinaria nuclear de la célula. En general, el efecto se debe a la interacción entre los iones Ag^+ con el ribosoma y la supresión o expresión de diferentes enzimas y proteínas que desempeñan funciones esenciales en el mantenimiento de las células y el metabolismo (Sana y Dogiparthi, 2018). Además, se ha demostrado que las AgNPs se acumulan dentro de la membrana y, posteriormente, pueden penetrar en las células y dañar la pared celular o las membranas celulares. Se cree que los átomos de plata se unen a los grupos tiol (-SH) de las enzimas formando enlaces S-Ag estables con compuestos que contienen tiol, causando luego la desactivación de las enzimas en la membrana celular que participan en la generación de energía transmembrana y el transporte de iones. Se ha propuesto que los iones Ag^+ entran en la célula y se intercalan entre los pares de bases de purina y pirimidina, lo que interrumpe el enlace de puente de hidrógeno entre las dos cadenas antiparalelas y desnaturaliza la molécula de ADN (Ahmed y col., 2016). Además, se ha reportado que los microorganismos expuestos a AgNPs presentan rugosidad y ruptura en los componentes de la membrana plasmática y en algunos casos, fragmentación del ADN (Figura 22) (Tamboli y col., 2013). También, se ha sugerido que el efecto antimicrobiano

de AgNPs está estrechamente relacionado con la formación de poros en la membrana celular como fue indicado anteriormente (Sondi y Salopek-Sondi, 2004).

Por otro lado, se ha propuesto que los iones Ag^+ liberados *vía* la oxidación superficial de las AgNPs, son capaces de generar radicales superóxido y otras ERO, las cuales pueden alterar la función del ADN y las enzimas bacterianas, perturbando el metabolismo celular normal y desencadenando finalmente la muerte de la bacteria (Singh y col., 2009). Sumado a esto, las AgNPs podrían oxidar el ADN siendo el daño resultante perjudicial para los microorganismos, ya que introduce mutaciones en el genoma bacteriano que podría trasladarse a la siguiente generación de bacterias (Cooke y col., 2003). Además, el superóxido podría causar la lixiviación del hierro de los cofactores enzimáticos [4Fe-4S]. El Fe liberado, a su vez se adsorbería en la superficie del ADN y lo oxidaría a través de un proceso catalítico de Fenton, en el que el Fe reduciría los peróxidos de hidrógeno intracelulares en radicales reactivos. Consecuentemente, estos radicales reactivos atacarían y romperían las cadenas de ADN, propagando daño en los orgánulos subcelulares (Zheng y col., 2018).

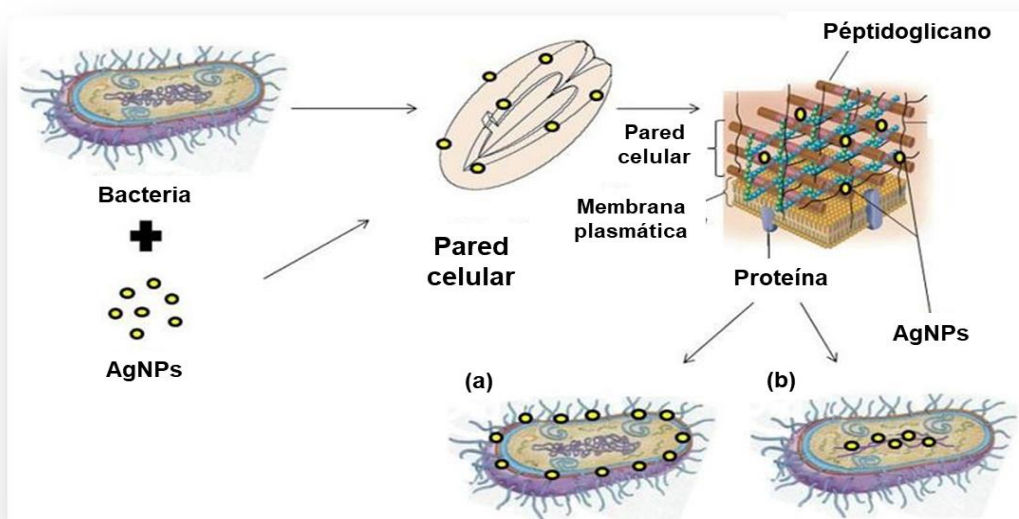


Figura 22. Diagrama del mecanismo de acción propuesto para AgNPs *green*. (a) Muerte celular por lisis de la membrana celular (b) Muerte celular por ruptura de doble cadena de ADN (Tamboli y col., 2013).

5.4. Interacción de AgNPs Biosintetizadas con Membranas Modelo y Microorganismos.

5.4.1. Afinidad de las Nanopartículas de Plata por Membranas Lipídicas.

Debido a que la membrana lipídica es el blanco de acción de numerosos agentes antimicrobianos, caracterizar la afinidad de las AgNPs por membranas modelo resultó de relevancia a fin de conocer y predecir su actividad antibacteriana, lo cual permitirá contribuir al entendimiento del mecanismo de acción de este tipo de nanomaterial. En respuesta a ello, se determinó la afinidad de las AgNPs biosintetizadas con extracto acuoso de achicoria (como agente reductor y estabilizante), utilizando dos modelos de membrana lipídica (monocapas y liposomas) compuestas por DMPC o DMPC:DMPG 5:1.

5.4.1.1. Interacción de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Monocapas Lipídicas Determinada *vía* Presión Superficial.

La interacción de las AgNPs biosintetizadas con superficies lipídicas se evaluó determinando las variaciones de la presión superficial ($\Delta\Pi$) de monocapas lipídicas en una interfase aire-agua, inducidas por la inyección de las AgNPs en la subfase. Con fines comparativos, también se utilizaron AgNPs sintetizadas por reducción química con citrato de sodio (AgNPs-cit) como agente reductor y estabilizante.

Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 23, los cuales muestran $\Delta\Pi$ en función de la concentración de AgNPs añadida en la subfase. Se puede apreciar que el agregado de las nanopartículas *green* inducen un considerable aumento en la presión superficial en las monocapas compuestas por ambos tipos de lípidos (Figura 23.A). Este fenómeno comúnmente observado luego de la unión de algún agente externo a la monocapa lipídica, indica la existencia de interacciones entre las nanopartículas *green* y la membrana lipídica. A su vez, es posible notar que el agregado de AgNPs biosintetizadas fue capaz de causar un mayor incremento en el valor de Π (lo cual resulta a su vez en un mayor valor de $\Delta\Pi$) en la monocapa de composición DMPC:DMPG 5:1, que exhibe carga neta negativa, en comparación a la monocapa zwitteriónica compuesta

solamente por DMPC. Este resultado denota que las AgNPs biosintetizadas podrían interactuar con mayor afinidad con monocapas cargadas negativamente.

Por otro lado, como muestra la Figura 23.B, si bien las AgNPs-cit inducen un aumento en la presión superficial de la monocapa, este incremento no es capaz de generar un $\Delta\Pi$ significativo en comparación con las nanopartículas provenientes de síntesis *green*. Asimismo, las concentraciones de AgNPs-cit que se requieren para lograr este pequeño cambio en la presión superficial son mucho mayores que las necesarias de AgNPs *green*, por lo que para los siguientes ensayos solo se evaluaron los efectos de las nanopartículas obtenidas mediante un protocolo biosintético.

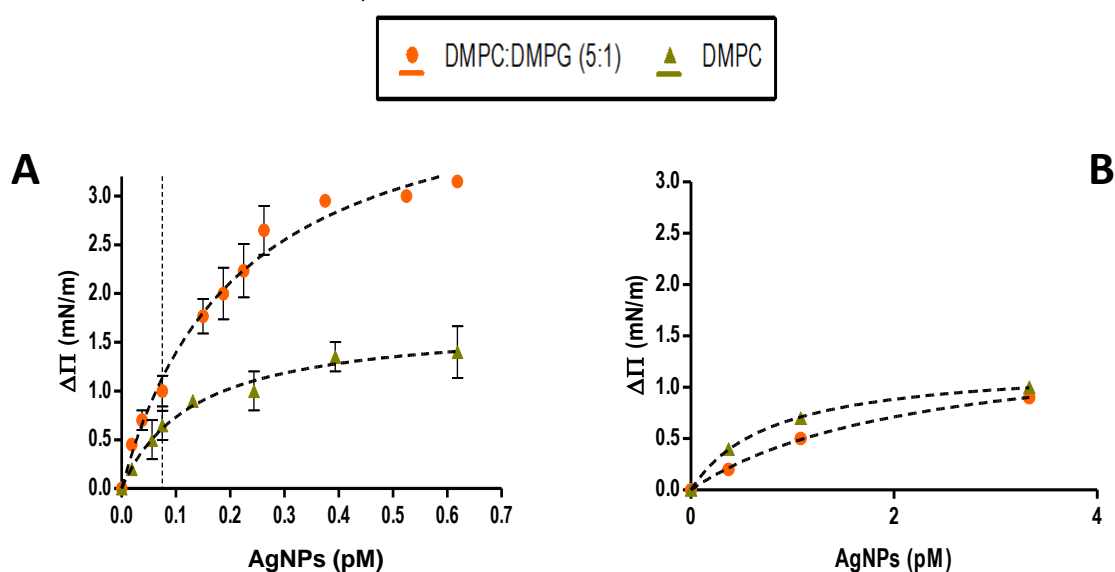


Figura 23. Interacción de AgNPs sintetizadas de manera *green* (A) y químicamente (B) con monocapas lipídicas. Cambios en la presión superficial expresada como $\Delta\Pi^*$ en función de la concentración de AgNPs en monocapas DMPC puras o monocapas DMPC:DMPG (5:1). Las líneas continuas son adecuaciones de la ecuación 14 a los datos experimentales. Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura constante ($20,0 \pm 0,5$ °C) utilizando una presión inicial de (20 ± 1) nM/m. Cada punto es el promedio de al menos triplicado de muestras independientes.

(*) $\Delta\Pi = \Pi_t - \Pi_0$ donde Π_t es el valor de la presión después de la inyección de las nanopartículas y Π_0 es la presión inicial

A partir del análisis del comportamiento de las AgNPs *green*, es posible notar una saturación en el valor de Π en ambos tipos de monocapas, manteniéndose prácticamente constante con la adición de cantidades crecientes de nanopartículas. Este comportamiento puede ajustarse a una isoterma de adsorción tipo Langmuir, donde la presión aumenta con

la cantidad de nanopartícula adsorbida hasta alcanzar un valor límite en donde todos los sitios de interacción de la superficie (monocapa) se encuentran ocupados o interaccionando con AgNPs. Esto permitió profundizar la interpretación de los resultados mediante un análisis cuantitativo de las interacciones AgNPs-lípido con el cálculo de las constantes de disociación aparente (K^*_d), las cuales son mostradas en la Tabla 9. Es importante destacar que, en este sistema las constantes de disociación aparente (K^*_d) y las constantes de afinidad (K_a) mantienen una relación inversamente proporcional, por lo que un menor valor de K^*_d indica una mayor afinidad del nanomaterial por la membrana.

Tabla 9. Constantes de disociación aparente (K^*_d) y perturbación de la presión superficial inicial ($\Delta\Pi_{\text{máx}}$) obtenidas para las AgNPs *green*.

Mezcla lipídica	K^*_d	$\Delta\Pi_{\text{máx}}$
DMPC	$0,21 \pm 0,03$	$1,7 \pm 0,2$
DMPC:DMPG (5:1)	$0,13 \pm 0,05$	$4,4 \pm 0,3$

Los resultados expuestos en la Tabla 9 confirman los resultados cualitativos de $\Delta\Pi_{\text{máx}}$ descritos previamente; es decir, las AgNPs biosintetizadas producen un mayor incremento en el valor de Π en monocapas DMPC:DMPG que en monocapas DMPC puras. Además, se puede inferir de los valores de K^*_d aparentes una mayor afinidad de las nanopartículas ensayadas por la monocapa DMPC:DMPG, puesto que, el valor de K^*_d en la monocapa zwitteriónica casi duplica el valor obtenido en la monocapa con carga neta negativa.

Asimismo, y con el objeto de complementar los resultados presentados previamente, resultó de interés realizar un análisis cinético de los datos experimentales obtenidos con las medidas de presión superficial. La interfase de una membrana lipídica es una estructura donde los cabezas polares se embeben en agua (Ulrich y Watts, 1994). Esta región es una barrera cinética, junto con las colas hidrofóbicas, para la permeabilidad de solutos polares y la inserción de macromoléculas. Tal se mencionó anteriormente, la interacción de un soluto (proteínas, péptidos o nanopartículas) en la subfase con monocapas lipídicas se refleja por un aumento de la presión superficial (Borioli y col., 2001; Martini y Disalvo, 2007). Tras la inyección del nanomaterial soluble en la subfase

acuosa de una monocapa de lípidos estabilizada a una presión superficial inicial Π_0 , se observa un aumento de la presión superficial en el tiempo hasta que se alcanza un valor estable. En esta condición, los cambios observados en la presión superficial de la monocapa tras la inyección de las AgNPs biosintetizadas pueden atribuirse a un efecto sobre la tensión interfacial de la monocapa. Así, el estudio cinético de interacción de un determinado soluto con una monocapa lipídica en una interfase aire-agua proporciona información valiosa con respecto a cambios de conformación y acumulación superficial, permitiendo dilucidar las fuerzas que priman en la interacción entre un soluto y la monocapa, así como también información acerca del proceso cinético.

En consecuencia, en lugar de evaluar el incremento final en la presión superficial después de la inyección de las nanopartículas y el sistema llega al equilibrio, se estudió el proceso cinético hasta que el sistema alcanzó el equilibrio, es decir, se valoraron los cambios en la presión superficial en función del tiempo. En la Figura 24 se representan las cinéticas de interacción obtenidas de las AgNPs biosintetizadas en ambos tipos de monocapas ensayadas. Para la obtención de estas curvas se realizó una única adición de nanopartículas, de manera tal que en la subfase la concentración de las mismas fuese de 0,075 pM. La elección de esta concentración se basó en los datos obtenidos en la Figura 23, donde se observa que, en ese punto, el sistema aún se encuentra lejos de la saturación.

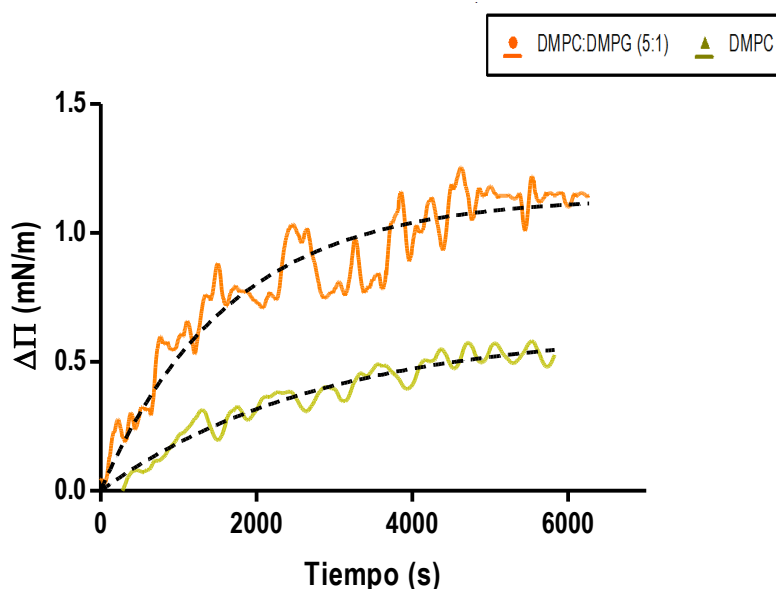


Figura 24. Cinéticas de interacción AgNPs-lípidos. Cambios en la presión superficial expresada como $\Delta\Pi$ en función del tiempo después de la adición de AgNPs biosintetizadas para alcanzar una concentración final de 0,075 pM en monocapas DMPC puras o monocapas DMPC:DMPG (5:1). La presión inicial fue de

(20 ± 1) nM/m a temperatura constante ($20,0 \pm 0,5$ °C) para todos los ensayos. Cada punto es el promedio de al menos triplicado de muestras independientes.

Con la finalidad de determinar parámetros cinéticos de la interacción nanopartícula-lípido, se evaluaron los datos de $\Delta\Pi$ en función del tiempo, asumiendo una cinética de primer orden. Después de ajustar las curvas para las diferentes composiciones lipídicas se obtuvieron las constantes de velocidad específica (k), parámetro que permitió cuantificar cuán rápido ocurre la interacción de las AgNPs *green* con la membrana. De este modo, cuanto mayor es el valor de k , más significativa es la velocidad de interacción.

Los resultados obtenidos revelaron que las AgNPs biosintetizadas exhiben una velocidad específica de interacción más rápida (mayor valor de k) en la monocapa de DMPC:DMPG, mientras que su velocidad específica es menor (k disminuye) en monocapa de DMPC puro (Tabla 10). Estos resultados reafirman la mayor afinidad de las AgNPs *green* por las membranas cargadas negativamente (DMPC:DMPG) que por las zwitteriónicas (DMPC puro) (Figura 23), y son de relevancia dado el hecho de que el PG es uno de los fosfolípidos principales constituyentes de las membranas plasmáticas bacterianas, lo cual indicaría una selectividad de las AgNPs por las membranas bacterianas sobre las membranas de células eucariotas.

Tabla 10. Constantes de velocidad específica (k) de interacción de AgNPs *green* y membranas lipídicas.

Mezcla lipídica	k ($s^{-1} \times 10^{-4}$)
DMPC	$3,51 \pm 0,06$
DMPC:DMPG (5:1)	$6,07 \pm 0,09$

Los resultados obtenidos muestran una clara correlación entre la afinidad de la membrana con la actividad antibacteriana y la naturaleza química de los ligandos de cobertura en la superficie de los AgNPs. Los restos aromáticos adsorbidos en las AgNPs *green* podrían tener relevancia en las interacciones con la cadena de lípidos de hidrocarburos favoreciendo un contacto cercano de este nanomaterial con la superficie de los lípidos y facilitando su inserción en la membrana. Esta interacción hidrofóbica para las *green* AgNPs debería ser responsable de su mayor afinidad con los sistemas miméticos

de membrana bacteriana que las AgNPs sintetizadas con citrato, lo que a su vez, podría explicar la fuerte actividad antibacteriana de los AgNPs *green* con respecto a las provenientes de síntesis química (Ferreira Maillard y col., 2018).

5.4.1.2. Interacción de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Bicapas Lipídicas Determinada *vía* Potencial Zeta.

Las fuerzas electrostáticas podrían jugar un rol fundamental en las interacciones primarias entre las AgNPs *green* y la membrana lipídica. En este contexto, para complementar la información obtenida con los estudios de presión superficial, se llevaron a cabo medidas de potencial zeta (ξ) utilizando liposomas multilamelares (MLVs) como membranas modelo.

Los cambios en el ξ indican la variación en el potencial superficial de la membrana (ψ_0). Por ello, representan de manera indirecta la variación de la carga superficial expuesta luego de la interacción con AgNPs en solución.

Basados en los resultados obtenidos en los experimentos de presión superficial, los ensayos de potencial zeta se realizaron con MLVs de composición lipídica DMPC:DMPG 5:1, los cuales fueron incubados con concentraciones crecientes de nanopartículas. Los resultados de estos ensayos pueden observarse en la Figura 25, donde se muestra tanto el valor del potencial zeta como la variación del mismo en función de la concentración de AgNPs biosintetizadas agregada.

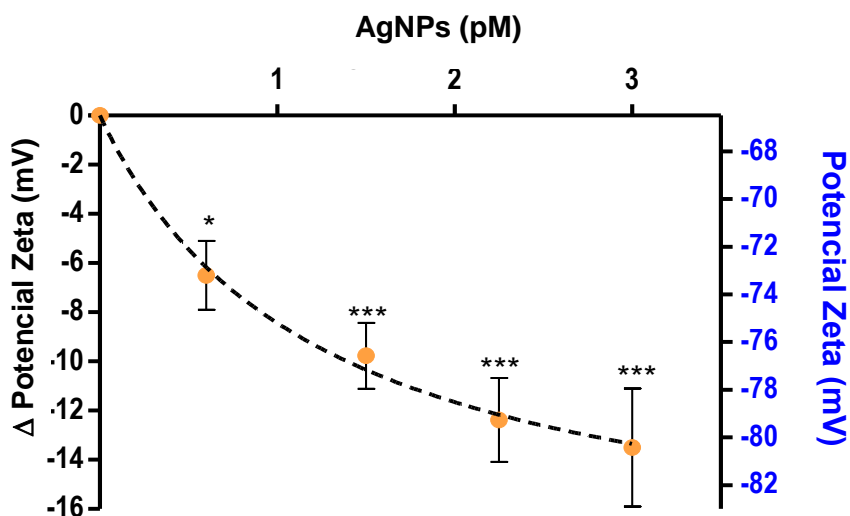


Figura 25. Valores de potencial zeta de liposomas incubados con diferentes concentraciones de AgNPs *green*. Cada punto representa el promedio de 20 medidas independientes de 2 diferentes ensayos. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 20°C.

Las barras de error indican desviaciones estándar de los promedios. *, $p < 0.5$; ***, $p < 0,001$, ANOVA seguido de una prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples vs. la columna de control (sin AgNps).

En la literatura se ha reportado la atracción electrostática entre células bacterianas cargadas negativamente y nanopartículas con carga positiva y la importancia de esta interacción para la actividad de estos nanomateriales como agentes bactericidas (Hamouda y Baker, 2000; Stoimenov y col., 2002). Sin embargo, las AgNPs *green* utilizadas en este estudio presentaron carga neta negativa (-22 ± 5 mV) determinada previamente por potencial zeta. A pesar de su carga superficial negativa, este nanomaterial demostró ser capaz de interactuar con la membrana lipídica modelo causando cambios en la presión superficial como se mencionó anteriormente.

Como se puede apreciar en la Figura 25, el potencial zeta de los liposomas compuestos por DMPC:DMPG se vuelve más negativo con la adición de AgNPs *green*, lo que es posible debido a la carga negativa de las nanopartículas. Estos resultados confirman la interacción entre las nanopartículas y la membrana lipídica, acordes a los resultados previos. Además, el hecho que la carga neta negativa sobre el liposoma experimente un incremento luego de la adición de las AgNPs indica una interacción del tipo interfacial entre éstas y la membrana lipídica donde las nanopartículas o parte de ellas deben

permanecer adsorbidas a la membrana de manera tal que justifique el aumento observado en la carga negativa de los liposomas (Figura 26).

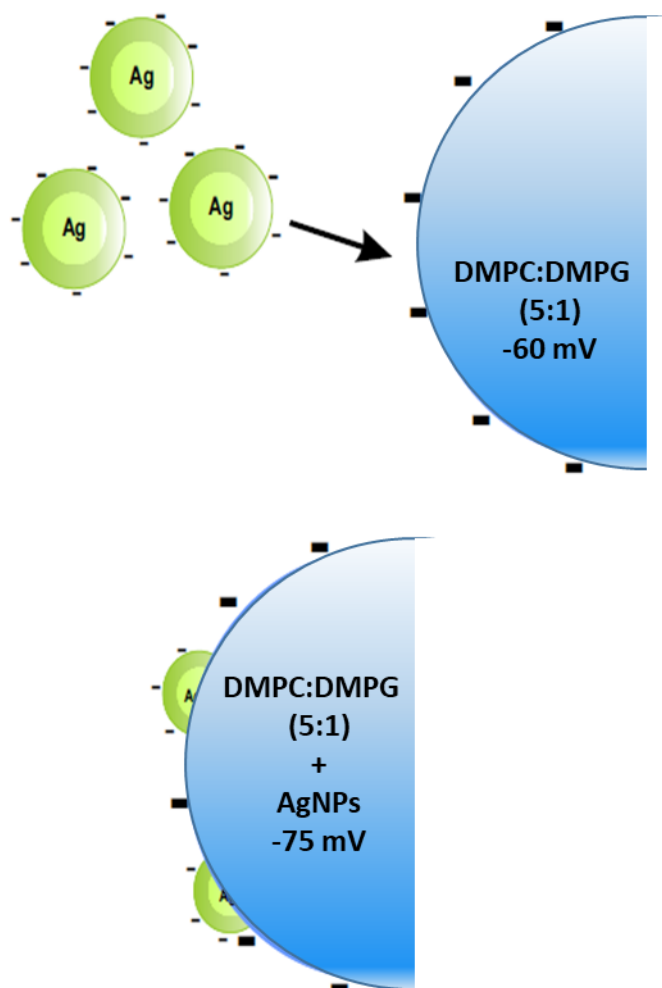


Figura 26. Esquema simplificado de las AgNPs *green* y su interacción con liposomas cargados negativamente, mostrando el aumento del valor negativo del potencial por la adsorción total o parcial de las nanopartículas a la membrana lipídica.

En virtud de los resultados obtenidos, tanto de los ensayos de presión superficial con monocapas lipídicas o mediante el potencial zeta con liposomas, fue posible observar una mayor afinidad de las AgNPs *green* con ambas monocapas ensayadas, en comparación con las AgNPs provenientes de síntesis química. Estas últimas, incluso a concentraciones 10 veces mayores que las requeridas para AgNPs *green*, no son capaces de generar un aumento significativo en la presión superficial en cualquiera de las monocapas evaluadas,

evidenciando una pobre interacción con las mismas. Cabe destacar que, a pesar de su carga neta negativa, las AgNPs biosintetizadas exhiben una mayor afinidad (representada por un mayor aumento en la presión superficial) en las monocapas cargadas negativamente, compuestas por DMPC:DMPG (5:1), mostrando a su vez, una velocidad de interacción mayor en estas monocapas. Fue posible observar, además, una variación en el potencial zeta hacia valores más negativos cuando los mismos fueron incubados con AgNPs *green* (cargadas negativamente), denotando una adsorción interfacial total o parcial sobre los liposomas compuestos por DMPC:DMPG. Estos resultados obtenidos en membranas modelo apuntan a que la membrana lipídica tendría un rol de importancia en el mecanismo de acción antibacteriano de las AgNPs biosintetizadas.

5.4.1.3. Interacción de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Bicapas Lipídicas Determinada *vía* Dispersión Dinámica de Luz.

Con el objetivo de corroborar que el incremento en el potencial zeta de los liposomas resulta de la adsorción interfacial de las AgNPs *green*, se evaluó la interacción AgNPs-liposomas a diferentes tiempos de incubación mediante DLS. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27.

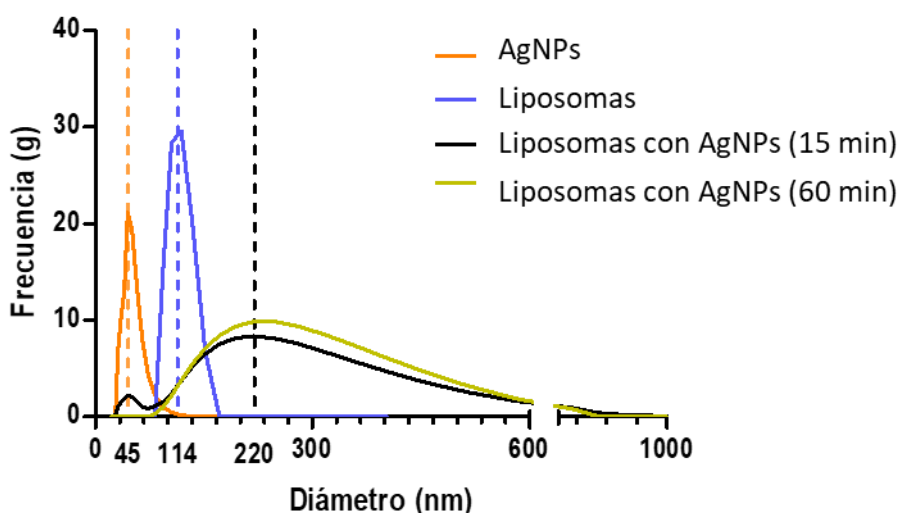


Figura 27. Distribución de tamaño de LUVs DMPC:DMPG, AgNPs *green* y liposomas en presencia de nanopartículas luego de 15 y 60 minutos de incubación.

Como se puede observar en la Figura 27, tanto los liposomas como las AgNPs *green* exhiben picos con un diámetro definido de 101 ± 15 nm y 46 ± 9 nm, respectivamente. Sin embargo, cuando los liposomas fueron incubados con las AgNPs se observó un cambio hacia mayores diámetros (220 ± 100 nm), concomitante con un aumento en la amplitud del pico. Además, a cortos tiempos de incubación (15 min) después de la adición de AgNPs, se observó un pequeño pico correspondiente a nanopartículas puras, el cual desapareció a mayores tiempos de incubación, asociado a un nuevo aumento del tamaño de los liposomas (257 ± 106 nm). Estos resultados pueden ser racionalizados considerando el tipo de interacción que está ocurriendo. Así, la adsorción interfacial de las AgNPs *green* sobre los liposomas puede explicar el incremento observado y que el tamaño final del complejo formado (liposomas-AgNPs) depende del número de nanopartículas adsorbidas (Figura 28).

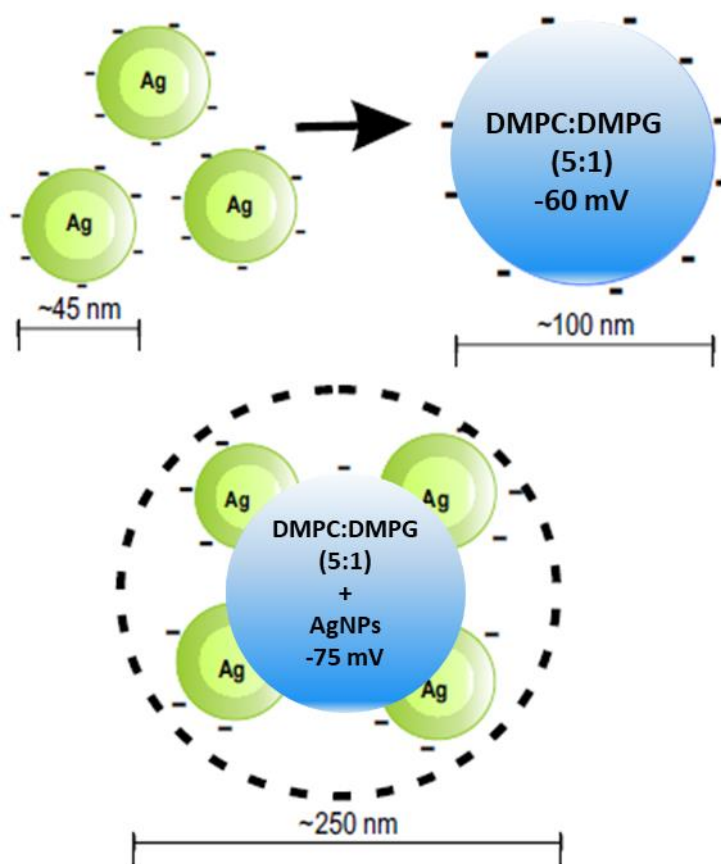
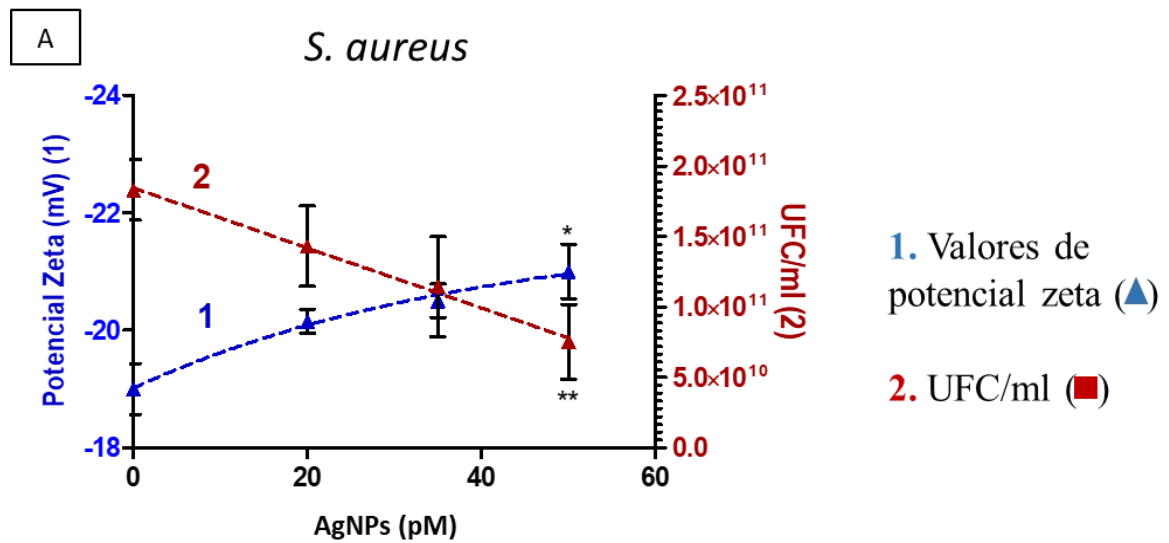


Figura 28. Esquema simplificado de las AgNPs *green* y su interacción con liposomas cargados negativamente, mostrando el aumento en el tamaño de los liposomas cuando son incubados en conjunto.

5.4.2. Interacción de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas con Microorganismos Bacterianos de Relevancia Veterinaria Determinada *vía* Potencial Zeta

Sobre la base de los resultados obtenidos anteriormente, que posicionan a la membrana plasmática como un posible blanco de acción para las AgNPs *green* y, con el fin de validar lo observado en membranas modelo en un sistema más fisiológico, se evaluó, mediante potencial zeta, la capacidad de las AgNPs para unirse a la superficie de diferentes bacterias. Se llevaron a cabo ensayos con microorganismos sensibles al nanomaterial (*S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli*), los cuales fueron representativos tanto de bacterias grampositivas como gramnegativas, así como también de las cepas más prevalentes causantes de mastitis bovina. Paralelamente, se realizó el recuento de bacterias viables tras la incubación de 1 h con AgNPs a iguales concentraciones que las empleadas para realizar los ensayos de medición de potencial zeta. Los resultados obtenidos para cada especie bacteriana se muestran en la Figura 29.



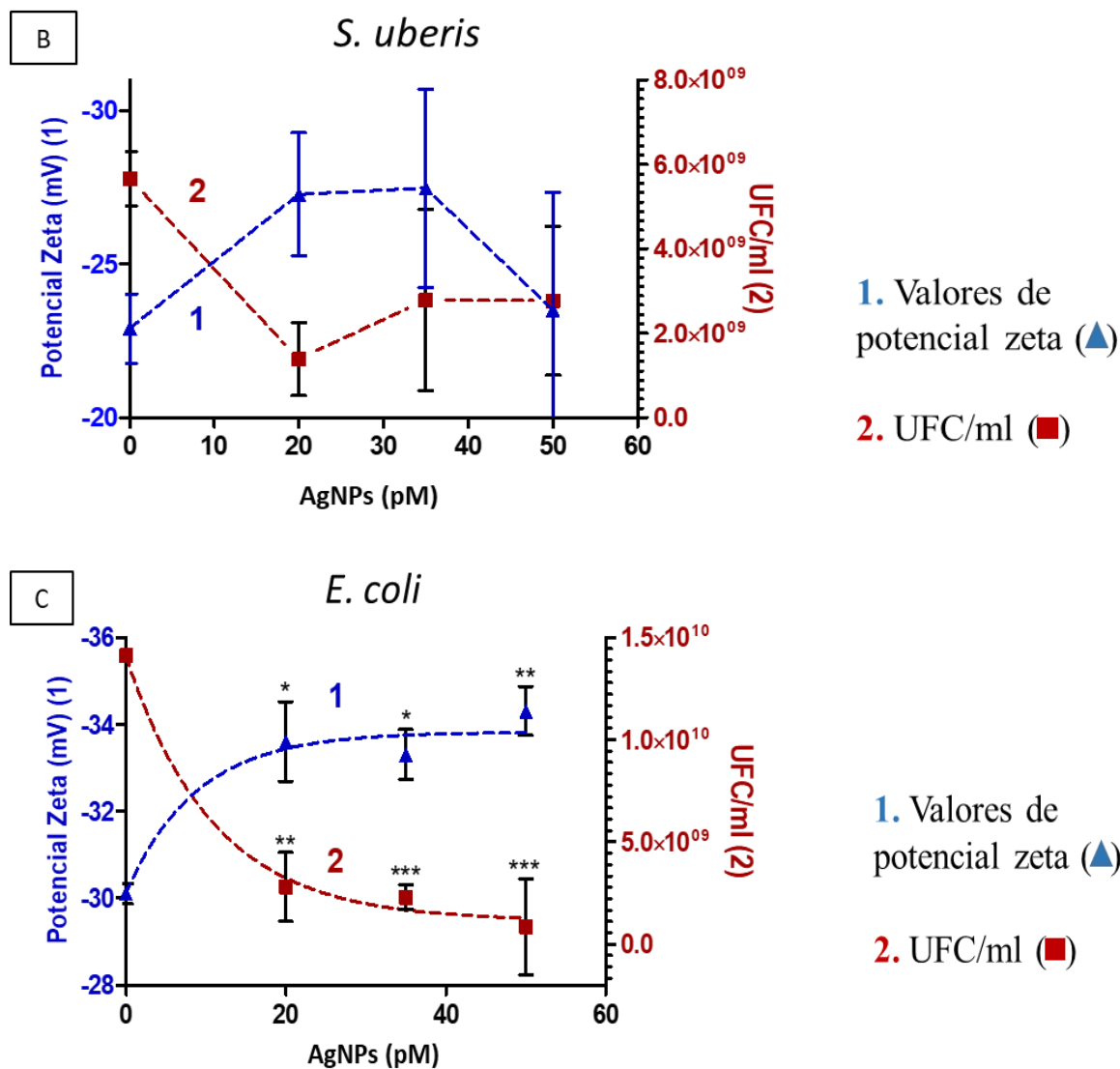


Figura 29. Valores de potencial zeta (mV) y UFC/ml en A. *S. aureus*, B. *S. uberis* y C. *E. coli* incubadas con diferentes concentraciones de AgNPs biosintetizadas.

Cada punto representa la media de veinte medidas independientes en tres ensayos diferentes. Las barras muestran la media ± E.E. obtenidos de realizar veinte medidas independientes en cada ensayo por triplicado.

Cuando se analiza la interacción de las AgNPs *green* con *S. aureus* (Figura 29.A), es posible apreciar como el potencial zeta se hace más negativo cuando el microorganismo es incubado 1 h con 20 pM de AgNPs biosintetizadas. Esta variación en el potencial se acentúa cuando la concentración de nanopartículas se incrementa a 50 pM, dando lugar a valores de potencial zeta más negativos, lo cual se espera debido a los valores de potencial zeta negativos de las AgNPs. Paralelamente, el agregado de AgNPs fue capaz de producir una disminución progresiva de UFC/ml, logrando una caída de 0,3 unidades logarítmicas a la máxima concentración de AgNPs ensayada. Esto demuestra que las nanopartículas

son capaces de adsorberse a la superficie de esta bacteria, interaccionando en principio con la gruesa capa de péptidoglicano, el cual podrían atravesar y llegar a la membrana plasmática, aunque esto aún no ha sido demostrado experimentalmente.

En cuanto a *S. uberis* (Figura 29.B), es posible observar que, con una incubación de 1 h con AgNPs *green* a una concentración de 20 pM, se produjo un marcado cambio en el potencial zeta, haciéndose mucho más negativo con respecto al control, en concordancia con una disminución en las UFC/ml. Con el agregado de 50 pM, contrario a lo que puede observarse para *S. aureus* y *E. coli*, el valor de potencial zeta es prácticamente igual al control sin el agregado de AgNPs y se registró un incremento en las UFC/ml con respecto a los valores obtenidos con 20 pM de AgNPs. La particularidad observada para esta cepa podría deberse a una aglomeración de las AgNPs cuando se encuentran presentes a concentraciones elevadas, inducida por algún factor liberado por *S. uberis*, por lo cual no se adsorberían sobre el microorganismo, provocando una disminución del potencial zeta. Se necesitarían estudios adicionales a modo de comprender exactamente que es lo que sucede específicamente con este patógeno.

En el caso de *E. coli*, como puede observarse en la Figura 29.C, 1 hora de incubación con 20 pM del nanomaterial fue capaz de inducir un cambio significativo ($p < 0,05$) hacia valores más negativos de potencial zeta del microorganismo, comparado con la bacteria sin agregado alguno. Ante un agregado de 50 pM de nanopartículas, y nuevamente tras una incubación de 1 h, el potencial zeta se torna aún más negativo, denotando la capacidad de las mismas para unirse a la membrana externa de estas bacterias. Existe para este microorganismo una correlación con la viabilidad bacteriana, encontrándose que a la máxima concentración de AgNPs ensayada el potencial zeta exhibe valores de -34.3 ± 0.8 , mientras que, una disminución mayor a 1,6 unidades logarítmicas en el recuento bacteriano fue registrada.

Analizando las tres especies bacterianas y su interacción con las AgNPs biosintetizadas a través de medidas de potencial zeta, es posible concluir que *E. coli* presenta la mayor variación en los valores de potencial, tornándose el mismo cada vez más negativo frente a la incubación con concentraciones crecientes de nanopartículas. Este hecho pone de manifiesto la existencia de una interacción de tipo superficial de las AgNPs con la membrana externa de este microorganismo gramnegativo, ya sea como su blanco de acción o bien generando algún tipo de desestabilización en la membrana que finalmente llevará a la muerte celular.

En cuanto a los microorganismos grampositivos, y como se mencionó anteriormente, las especies *S. aureus* y *S. uberis* fueron seleccionadas para la realización de los ensayos por ser representativas de los aislados predominantes causantes de mastitis bovina. En ambos casos, los ensayos de potencial zeta demostraron una interacción con dichos microorganismos, aunque provocando un menor aumento en el mismo, lo que puede traducirse como una interacción menor entre las AgNPs *green* y los microorganismos grampositivos.

Estos resultados permiten confirmar una fuerte correlación de la variación del potencial zeta con el daño bacteriano (Ferreira Maillard y col., 2019), lo que está en concordancia con los reportados anteriormente donde el potencial zeta se asocia con el daño en las estructuras de las macromoléculas de la superficie y el estado fisiológico de las células bacterianas (Domingues y col., 2014). Además, los resultados obtenidos se conciben con los publicados en trabajos realizados por otros investigadores que reportan que los microorganismos gramnegativos son más sensibles a las AgNPs que los grampositivos (Tamboli y Lee, 2013).

Trabajos previos han demostrado que la comprensión de la interacción entre agentes antimicrobianos y membranas (utilizando membranas modelo como liposomas y monocapas de Langmuir) es un aspecto clave para caracterizar dicha interacción de manera de poder elucidar su mecanismo de acción (Henriques y col., 2007; Domingues y col., 2009; Domingues y col., 2012). Si bien en muchos casos la membrana es el blanco *per se* de tales agentes, el comportamiento membranotrópico también puede aumentar la concentración de AgNPs a nivel de membrana, potenciando de este modo la eficacia antimicrobiana (Castanho y Fernandes, 2006).

En el presente trabajo de tesis doctoral, y mediante ensayos de presión superficial, potencial zeta y mediciones de DLS, se pudo demostrar que las AgNPs *green* son capaces de interactuar con membranas lipídicas cargadas y zwitteriónicas y con la superficie de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas, aunque presentando una afinidad diferencial. Si bien son necesarios experimentos adicionales con el fin de caracterizar completamente el mecanismo de acción de estas AgNPs biosintetizadas, los datos obtenidos en el presente trabajo nos permiten afirmar que la interacción de las AgNPs *green* con la membrana bacteriana debe ser un paso esencial en la actividad antibacteriana, ya sea la membrana la diana de este nanomaterial o bien permitiendo la acumulación de nanopartículas y aumentando de este modo la concentración local de iones Ag^+ que podría determinar su actividad letal.

5.4.3. Consecuencias de la Interacción de Nanopartículas de Plata *Green* con Liposomas: *Leakage*

La comprobación de la existencia de la interacción entre las AgNPs biosintetizadas y las membranas lipídicas, condujeron a la realización de nuevos ensayos con el fin de corroborar si la membrana lipídica era efectivamente el blanco de acción de este bionanomaterial.

Para evaluar si las AgNPs *green* serían capaces de causar disrupción en la membrana celular, se llevaron a cabo ensayos de *leakage* sobre liposomas DMPC:DMPG como modelos de membrana, empleando la metodología detallada la sección 4.2.3.1.5. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30.

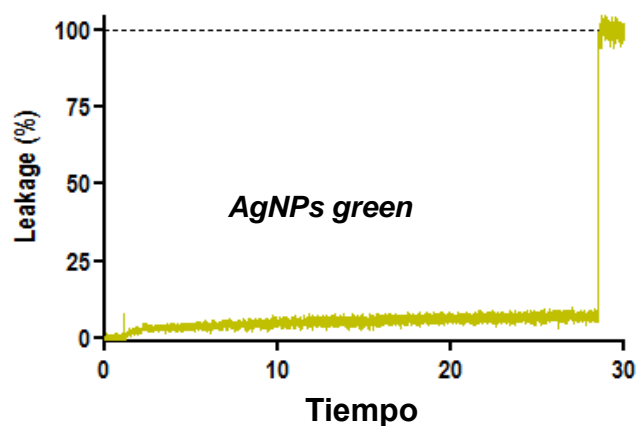


Figura 30. Porcentaje de *leakage* en función del tiempo. Al minuto 27 se procedió al agregado de tritón que provoca la disrupción de la membrana y el consecuente aumento de fluorescencia.

Como puede observarse en la Figura 30, el agregado del nanomaterial a los liposomas DMPC:DMPG no generó un porcentaje de *leakage* significativo durante el tiempo que se llevó a cabo el ensayo. El agregado de tritón en los últimos minutos provoca la disrupción de las membranas, dando como resultado un 100% de *leakage*.

Sobre la base de los datos obtenidos, se pudo demostrar que, si bien las AgNPs *green* son capaces de interactuar con las membranas tanto modelos como de microorganismos grampositivos y gramnegativos adsorbiéndose en la superficie de las mismas, no son capaces de generar poros en las membranas modelo ensayadas, puesto que, la generación de poros en la membrana conllevaría la liberación del fluoróforo contenido en el liposoma y su consecuente emisión de fluorescencia.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que, si bien la interacción interfacial de las AgNPs con las membranas lipídicas modelo no causa perturbaciones en el empaquetamiento de los lípidos, dicha interacción sigue siendo un paso esencial para la acumulación de G-AgNPs en la envoltura celular, actuando como un depósito local de plata que, a través de un proceso de disolución oxidativa puede liberar una concentración suficientemente alta de iones Ag^+ tóxicos en o cerca de la célula bacteriana. Por lo tanto, los iones Ag^+ liberados pueden: i) interactuar con proteínas que contienen tiol en la pared celular, afectando sus funciones biológicas y permeabilidad celular. ii) penetrar la pared celular y entrar en las células, convirtiendo posteriormente el ADN en una forma condensada; y, iii) generar especies reactivas de oxígeno (Ferreira Maillard y col., 2019).

En conclusión, la membrana lipídica no parecería ser el blanco de acción *per se* de la actividad antibacteriana reportada para las AgNPs biosintetizadas con extracto acuoso de achichoria, pero sí se demostró que juega un rol importante en la misma, concentrando las AgNPs en la superficie, que finalmente generan la muerte celular ya sea por el ataque a un blanco particular o bien causando una desestabilización generalizada en el funcionamiento celular (Choi y col., 2008).

5.5. Estrés Oxidativo

5.5.1. Investigación del Metabolismo Oxidativo Bacteriano. Efecto de Nanopartículas de Plata Biosintetizadas.

El mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas ha sido el blanco de numerosas investigaciones en los últimos años (Quinteros y col., 2016b). Si bien, éste no está completamente dilucidado, la generación de estrés oxidativo en diferentes especies bacterianas parece ser, al menos en parte, responsable del efecto antibacteriano de dicho nanomaterial (Zheng y col., 2018).

5.5.1.1. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno por Espectrofluorimetría.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las AgNPs para generar ERO en *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli*, las ERO fueron cuantificadas mediante espectrofluorimetría utilizando la sonda $\text{H}_2\text{-DCFDA}$, según lo detallado en la sección 4.2.3.2.1. de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos para cada una de las cepas ensayadas se muestran en la Figura 31.

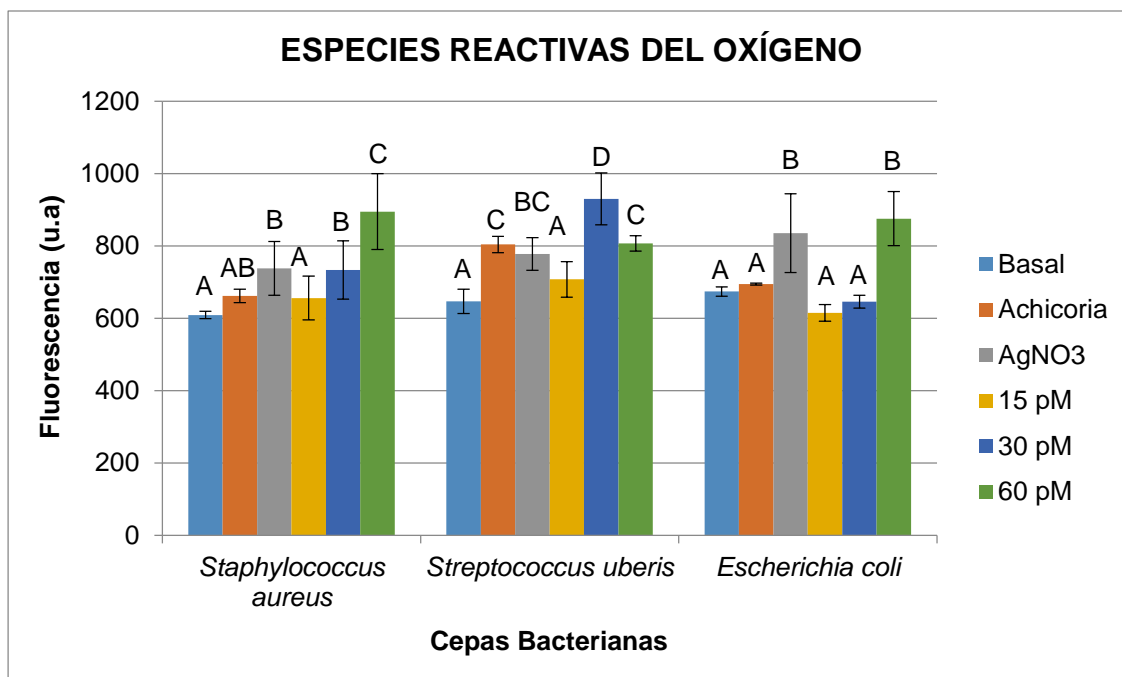


Figura 31. Cuantificación de ERO por espectrofluorometría para *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis. Fluorescencia de cada patógeno con respecto a los diferentes tratamientos: Extracto de achicoria, AgNO₃ (1mM), AgNPs (15 pM, 30 pM y 60 pM).

Las barras muestran la media \pm E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó independientemente para cada cepa.

Como puede observarse en la Figura 31, la incubación de *S. aureus* con 15 pM de AgNPs (correspondientes a valores de sub-CIM) no mostró diferencias significativas con respecto al metabolismo bacteriano basal ni al control con extracto de achicoria. A su vez, una concentración de AgNPs igual a la CIM (30 pM) generó en *S. aureus* una cantidad de ERO significativamente mayor a la del metabolismo basal de la célula, aunque estadísticamente no mostró diferencias con respecto a la concentración de AgNO₃ y sub-CIM de AgNPs. Cabe destacar que el AgNO₃ utilizado como control de precursores de síntesis, se encontraba en una concentración (1mM, concentración de partida de la síntesis) 9 órdenes de magnitud mayor que las AgNPs. Por otro lado, cuando *S. aureus* se incubó con 60 pM de AgNPs, exhibió el máximo incremento en la fluorescencia, lo que puede traducirse en la mayor producción de ERO, resultando dicho incremento significativo ($p < 0,05$) con respecto a cualquiera de los otros tratamientos.

En el caso de *E. coli*, cuando se incubó con extracto de achicoria y con concentraciones sub-CIM y CIM de AgNPs, no se observaron diferencias significativas con respecto al control con PBS. Lo contrario ocurrió con el agregado de AgNO₃ y 60 pM de AgNPs, en donde se evidenció una mayor producción de ERO, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) con respecto a los otros tratamientos.

Para *S. uberis*, el agregado de 15 pM de AgNPs no mostró diferencias con respecto al basal en la producción de ERO. Cuando el microorganismo fue incubado con concentraciones supra-CIM de AgNPs, se registró un incremento en las ERO producidas, el cual no mostró diferencias significativas con el agregado del extracto de achicoria ni de la solución del precursor de iones Ag⁺, aunque esta última se encontraba en una concentración mayor en 9 órdenes de magnitud. Esto podría indicar que los fitocompuestos presentes en el extracto de achicoria estarían contribuyendo a la generación de fluorescencia por parte de las AgNPs, los cuales se encuentran presentes en la suspensión coloidal estabilizando a las AgNPs. La máxima producción de ERO se logró al utilizar concentraciones de AgNPs iguales a la CIM, donde se observó un marcado incremento en la fluorescencia, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) a cualquiera de los demás tratamientos.

La utilización de espectrofluorometría permitió determinar un aumento de ERO cuando las cepas evaluadas fueron expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs, en comparación con el metabolismo basal de los microorganismos. A su vez, se demostró que en *S. aureus* y *E. coli* la mayor producción de ERO se registró con concentraciones supra-CIM de AgNPs, mientras que, para *S. uberis* una concentración igual a la CIM resultó en una mayor generación de ERO. En este escenario resulta adecuado considerar el estrés oxidativo como consecuencia de la acción antibacteriana de las AgNPs.

Estudios publicados por otros investigadores han evidenciado que el mecanismo antimicrobiano de las AgNPs está relacionado con la formación de radicales libres y el posterior daño a la membrana inducido por los mismos. De este trabajo se desprende que los radicales libres pueden derivarse de la superficie de las AgNPs y ser responsables de la actividad antibacteriana de éstas, observada en microorganismos tanto grampositivos como gramnegativos (Kim y col., 2007).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo están en acuerdo con los reportados por Kim y col. (2011), los cuales evidencian que AgNPs a una concentración de 100 µg/mL e incubadas durante 3 horas con *S. aureus* y *E. coli* lograron incrementar significativamente la producción de ERO en dichas cepas, comparadas con el control sin

AgNPs. Estos resultados indican que las AgNPs son capaces de formar ERO con agua y podrían dañar la membrana celular bacteriana, la estructura proteica o el sistema intracelular.

Por otro lado, otras investigaciones han demostrado que las AgNPs provenientes de síntesis *green* utilizando sobrenadantes de *P. aeruginosa* también provocan un incremento en las cantidades de ERO en *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Además, se reportó que la generación de ERO inducida por las AgNPs era dependiente del tiempo y la concentración en las tres especies bacterianas estudiadas (Quinteros y col., 2016b).

5.5.1.2. Análisis Cualitativo de ERO: Microscopía de Fluorescencia.

Con el objeto de visualizar cualitativamente el incremento de ERO, las cepas de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli*, fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizaron para el ensayo, la concentración de AgNPs en donde se presentó un mayor estímulo para la producción de EROs (60 pM para *S. aureus* y *E. coli*, y 30 pM para *S. uberis*). La Figura 32 muestra micrograffías de *S. aureus* como representativas de lo observado para todas las cepas bacterianas tratadas con AgNPs donde se evidencia la fluorescencia generada en la misma.

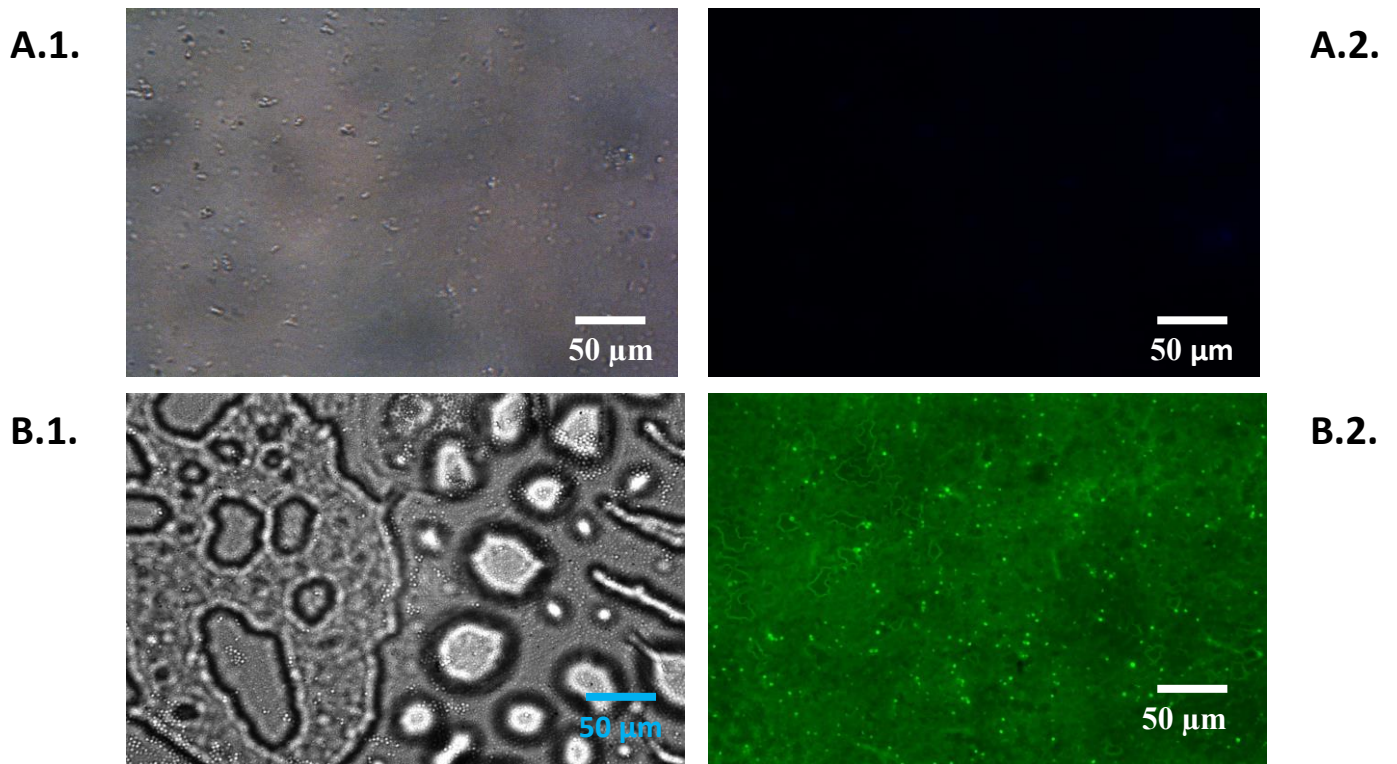


Figura 32. Microscopía de fluorescencia de *S. aureus* incubado con (A) PBS (A.1. campo claro, A.2. fluorescencia) y (B) AgNPs biosintetizadas (B.1. campo claro, B.2. fluorescencia).

Mediante microscopía de fluorescencia, los microorganismos evaluados pudieron visualizarse como cocos y bacilos fluorescentes tras la incubación con AgNPs, evidenciando diferencias con el metabolismo basal bacteriano donde no fue posible percibir dicha fluorescencia. Estos resultados corroboraron lo observado por espectrofluorimetría, donde se mostró que el incremento en los niveles de fluorescencia, traducido en un aumento en la producción de ERO, se produjo cuando las cepas fueron incubadas con diferentes concentraciones de AgNPs biosintetizadas.

5.5.1.3. Determinación de Especies Reactivas del Nitrógeno por el Método de Griess.

La generación de especies reactivas del nitrógeno (ERN) por el agregado de AgNPs en las diferentes cepas bacterianas fue evaluada *vía* la cuantificación de nitritos por el método de Griess. Dado que los nitritos son los productos más estables provenientes de la degradación del óxido nítrico (NO), pueden ser utilizados como indicadores de la concentración total de NO.

Los ensayos se llevaron a cabo bajo condiciones similares a las detalladas para la determinación de las ERO, según se describe en el punto 4.2.3.2.3. de la sección Materiales y Métodos, utilizando idénticas concentraciones de AgNPs y controles de síntesis. De manera adicional, la determinación de ERN también se efectuó en presencia de Tirón, un secuestrante físico de anión superóxido, a modo de determinar si la generación de estrés ante el agregado de AgNPs se produce por vía oxidativa y/o nitrosativa. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 33, 34 y 35.

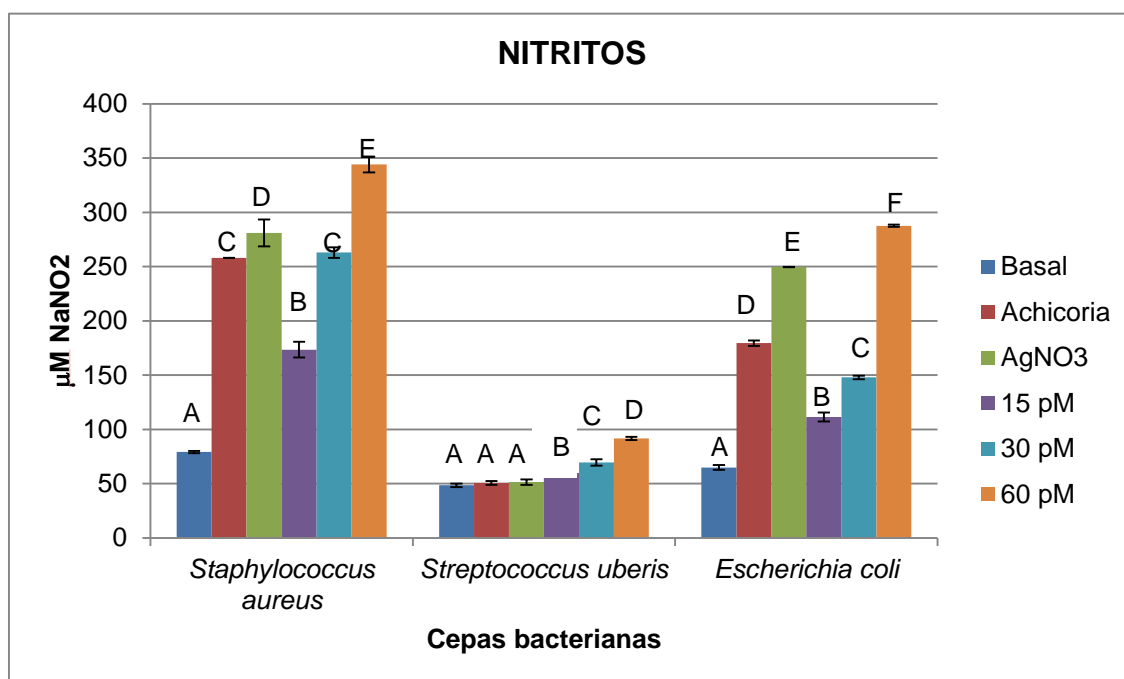


Figura 33. Cuantificación de ERN por espectrofotometría para cepas de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis. NaNO₂ (µM) con respecto a los diferentes tratamientos: Extracto de achicoria, AgNO₃ (1mM), AgNPs (15 pM, 30 pM y 60 pM).

Las barras muestran la media ± E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó independientemente para cada cepa.

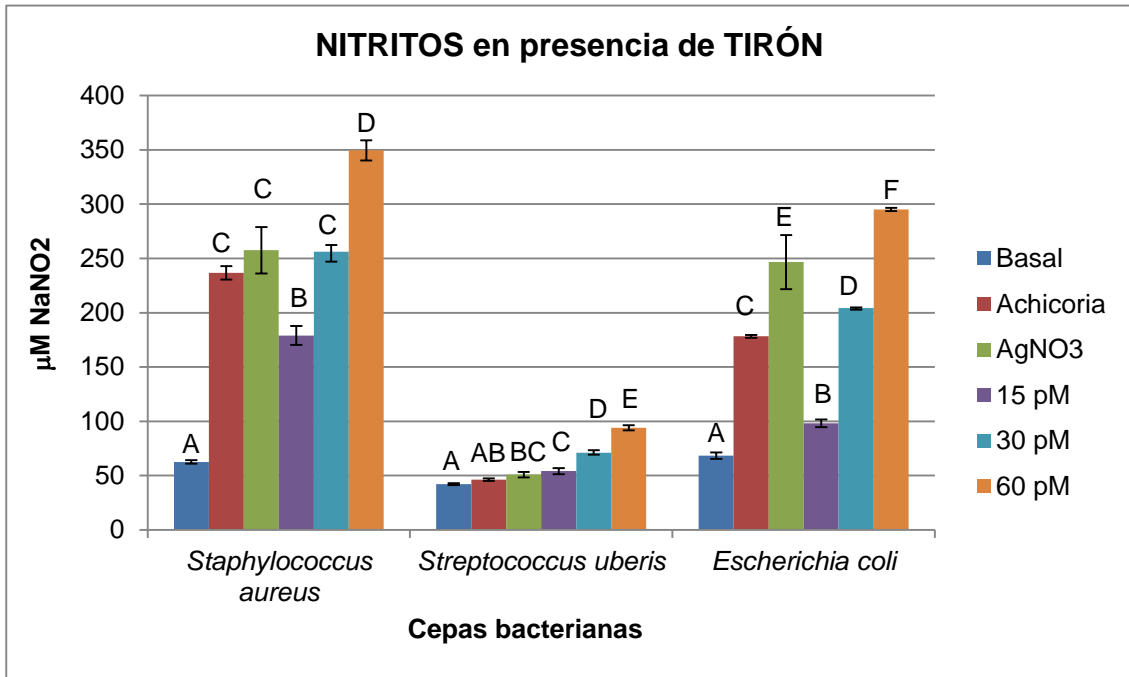
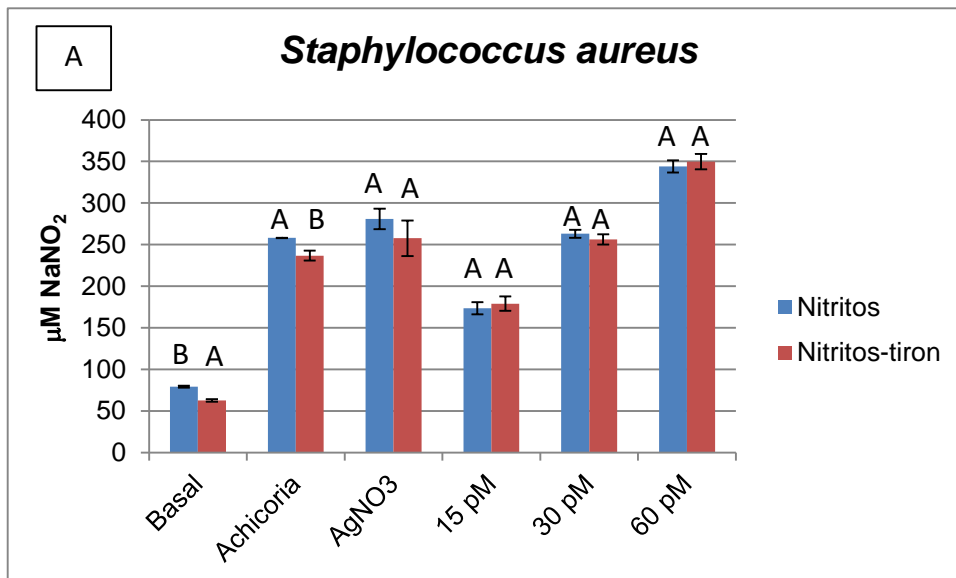


Figura 34. Cuantificación de ERN por espectrofotometría en presencia de Tirón para cepas de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis. NaNO₂ (µM) con respecto a los diferentes tratamientos: Extracto de achicoria, AgNO₃ (1mM), AgNPs (15 pM, 30 pM y 60 pM). Las barras muestran la media ± E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó independientemente para cada cepa.



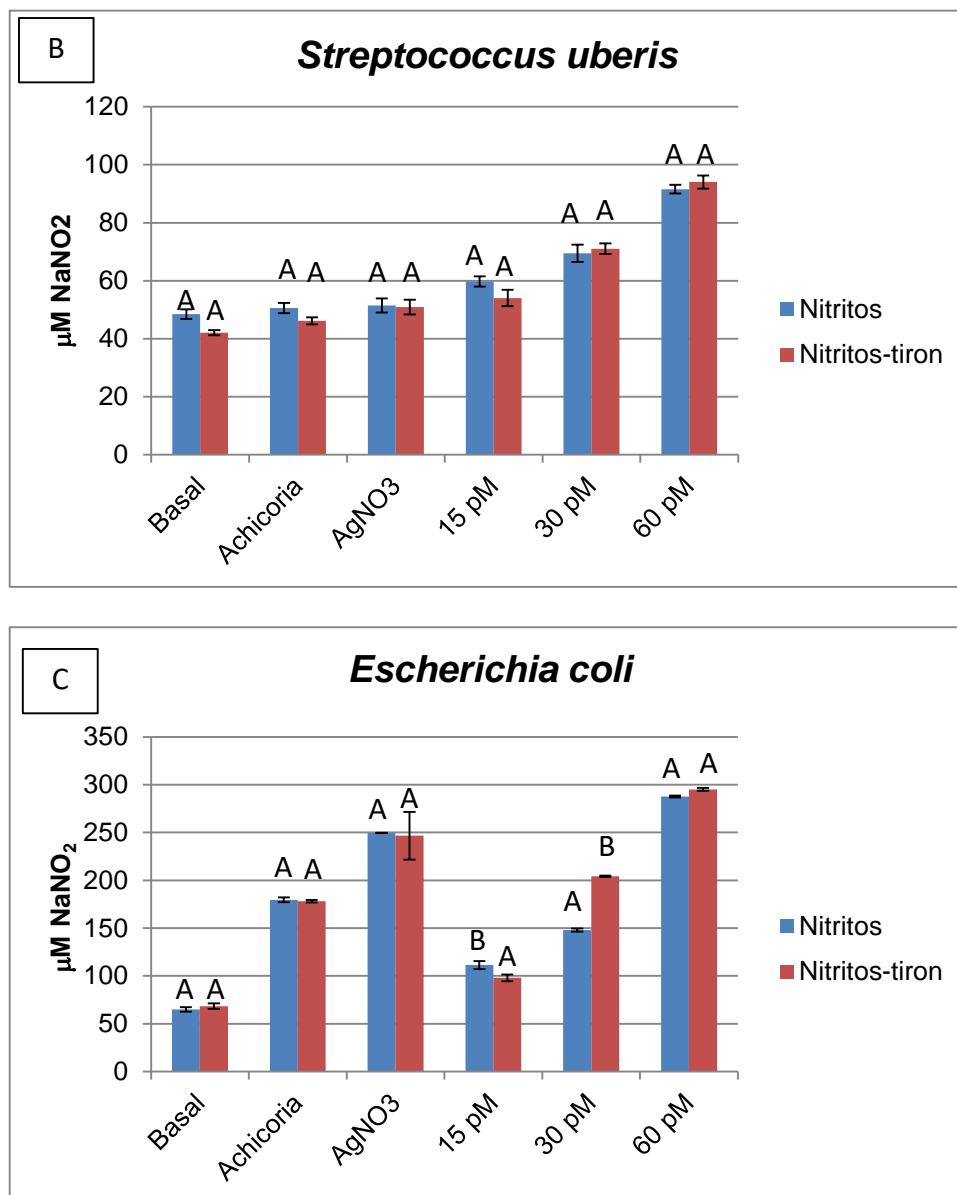


Figura 35. Cuantificación de ERN por espectrofotometría en ausencia y en presencia de Tirón para cepas de (A) *S. aureus*, (B) *S. uberis* y (C) *E. coli* frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis. NaNO₂ (µM) con respecto a los diferentes tratamientos: Extracto de achicoria, AgNO₃ (1mM), AgNPs (15 pM, 30 pM y 60 pM).

Las barras muestran la media ± E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó independientemente para cada cepa.

Cada uno de los microorganismos fue analizado estadísticamente por separado, evaluando los diferentes tratamientos entre sí. Además, para cada una de las bacterias se comparó estadísticamente cada tratamiento en presencia o no de Tirón (Figura 35).

Como es posible apreciar en la Figura 33, todas las cepas evaluadas muestran una producción de nitritos dependiente de la concentración de nanopartículas añadida. Los valores máximos de producción se alcanzaron cuando las bacterias fueron incubadas con concentraciones de AgNPs *green* supra-CIM (60 pM). A esta concentración de AgNPs, la generación de ERN fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que para cualquiera de los otros tratamientos ensayados.

Para *S. aureus*, la incubación con las diferentes concentraciones de AgNPs mostró diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto tanto al basal como también entre cada una de las concentraciones ensayadas. El máximo de producción se alcanzó cuando el tratamiento se realizó con concentraciones superiores a la CIM.

En *S. uberis*, puede observarse que, si bien hay un aumento significativo en las ERN, en ningún escenario la producción alcanzó los valores observados en *S. aureus* y *E. coli*. Aún así, cuando las bacterias fueron incubadas con 60 pM de AgNPs, la producción de ERN fue 1,7 veces mayor que la registrada cuando el tratamiento se realizó con AgNO_3 1 mM ($p < 0,05$).

Por último, todos los tratamientos sobre *E. coli* evidenciaron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$) y con respecto al control con PBS ($p < 0,05$), registrándose los valores máximos en la generación de ERN cuando la bacteria fue incubada con 60 pM de AgNPs biosintetizadas.

Con respecto a los resultados obtenidos en presencia de Tirón (Figura 34), es posible notar la misma tendencia evidenciada en la producción de ERN que cuando dicho compuesto no fue añadido. Para *S. aureus*, solo el tratamiento con extracto de achicoria mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) ante el agregado del secuestrante. Frente a los demás tratamientos, no se registraron diferencias entre el ensayo con y sin Tirón ($p > 0,05$). En el caso de *S. uberis*, ninguno de los tratamientos ensayados registró un cambio significativo ($p > 0,05$) en los valores obtenidos en presencia de Tirón. En cuanto a *E. coli*, cuando el microorganismo fue incubado con concentraciones menores a la CIM (15 pM), se evidenció una disminución significativa ($p < 0,05$) cuando el ensayo se realizó en presencia de Tirón. Por otro lado, cuando el tratamiento se realizó con concentraciones iguales a la CIM (30 pM), se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en los valores de ERN.

El Tirón actúa secuestrando físicamente el $\text{O}_2^{\cdot-}$, por lo que no permite que esta ERO reaccione con el óxido nítrico proveniente del metabolismo bacteriano generando peroxinitrito. Ello conlleva a un exceso de NO, lo cual se detecta como un aumento en la

generación de nitritos. Sin embargo, en la mayoría de las cepas ensayadas, el agregado de Tirón no mostró diferencias significativas en la generación de ERN con respecto al ensayo llevado a cabo en ausencia del secuestrante, lo que es indicativo que la vía nitrosativa no sería la principal contribuyente a la generación de estrés.

Los resultados obtenidos evidenciaron que, para todas las cepas evaluadas, tanto en presencia como en ausencia de Tirón, la generación de ERN es un evento dependiente de la concentración de AgNPs, y que las AgNPs biosintetizadas son capaces de interactuar con bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, contribuyendo a un estado de estrés oxidativo por la generación de ERO como de ERN.

Estos resultados denotan diferencias a los reportados por otros autores, en los que se manifiesta una asociación entre el aumento de ERO y la disminución de ERN como efecto de AgNPs y algunos antibióticos (Quinteros y col., 2016b). En general, las ERO y ERN pueden interactuar con numerosos objetivos celulares, incluidos tioles, centros metálicos, residuos de tirosina en proteínas, bases de nucleótidos y lípidos. Frente a este tipo de daño, las bacterias tienen estrategias de defensa específicas y generales para contrarrestar cambios ambientales, incluida la desintoxicación de factores estresantes, así como mecanismos de protección y sistemas de reparación (Hochgräfe y col., 2008).

Es posible concluir que estas perturbaciones en el balance oxidativo podrían estar relacionadas con la actividad antibacteriana de las AgNPs biosintetizadas en las cepas evaluadas. La consecuencia de este estado de estrés oxidativo parece ser una desestabilización general de las funciones celulares del microorganismo, induciendo daños irreparables sobre ADN, lípidos, proteínas y enzimas que culminarían con la muerte celular.

5.5.2. Oxidación de Macromoléculas Bacterianas. Efecto de las Nanopartículas de Plata Biosintetizadas

5.5.2.1. Valoración de la Peroxidación Lipídica

Como se ha mencionado previamente, una de las consecuencias de la generación de un exceso de radicales libres es la peroxidación lipídica. Los lípidos de la membrana, especialmente los residuos de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos son más susceptibles a la oxidación por los radicales libres. El resultado de dicha oxidación es la

pérdida del funcionamiento de la membrana, por ejemplo, disminución de la fluidez, inactivación de las enzimas unidas a la membrana y receptores (Phaniendra y col., 2015).

La determinación de MDA como indicador de oxidación lipídica, se llevó a cabo con el objetivo de evaluar, en las mismas cepas que se ensayaron previamente, el efecto de diferentes concentraciones de AgNPs biosintetizadas. Los resultados se muestran en la Figura 36.

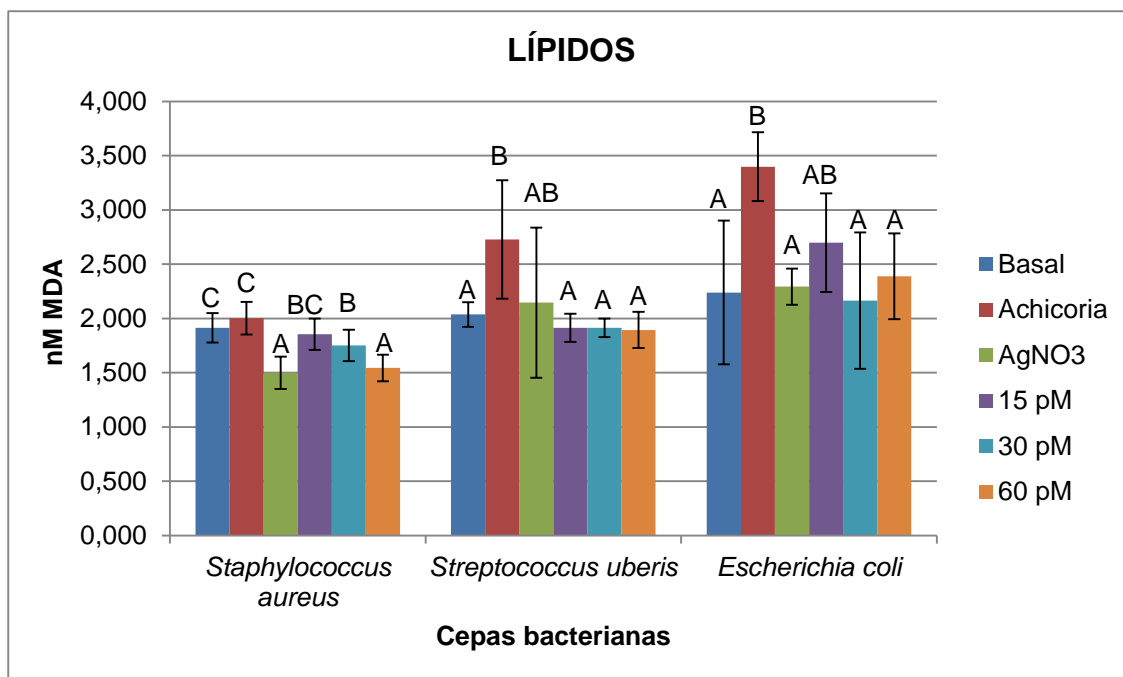


Figura 36. Determinación de malondialdehído (MDA) por espectrofotometría para cepas de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis. MDA (nm) con respecto a los diferentes tratamientos: Extracto de achicoria, AgNO₃ (1mM), AgNPs (15 pM, 30 pM y 60 pM). Las barras muestran la media ± E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó independientemente para cada cepa.

De los resultados del ensayo se desprende que a medida que aumenta la concentración de AgNPs con la que se incubó a *S. aureus*, se observa una disminución progresiva en la cantidad de MDA producido. Los menores valores en la producción de MDA se registraron con AgNO₃ (1 mM) y concentraciones supra-CIM de AgNPs, entre los cuales no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) aunque si entre éstos con respecto al control con PBS. Por otro lado, los tratamientos con 15 pM y 30 pM de AgNPs *green* no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sí, aunque a concentraciones

iguales a la CIM la reducción de MDA si resultó significativa ($p < 0,05$) respecto al basal con PBS.

Por su parte, no se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ninguno de los tratamientos ensayados sobre *S. uberis* y el control con PBS, a excepción de cuando la incubación se llevó a cabo con extracto de achicoria, donde se reportó un incremento significativo con respecto al metabolismo basal del microorganismo ($p < 0,05$).

Por último, la oxidación lipídica en *E. coli* no mostró una relación directa con la concentración de AgNPs agregadas, puesto que, no se observaron diferencias significativas entre el metabolismo basal y el agregado de AgNPs a ninguna de las concentraciones estudiadas.

Los resultados obtenidos indican que el agregado de las diferentes concentraciones AgNPs no produjo oxidación lipídica en las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo. En consecuencia, es posible que se requieran mayores tiempos de incubación de los microorganismos con AgNPs para poder apreciar un incremento significativo en las concentraciones de MDA.

5.5.2.2. Determinación de la Oxidación de Proteínas

Otro de los marcadores de estrés oxidativo son los AOPP. Sobre la base de esto, los niveles de AOPP fueron determinados en presencia y en ausencia de AgNPs biosintetizadas para evaluar el efecto de las mismas, siendo expuestos en la Figura 37.

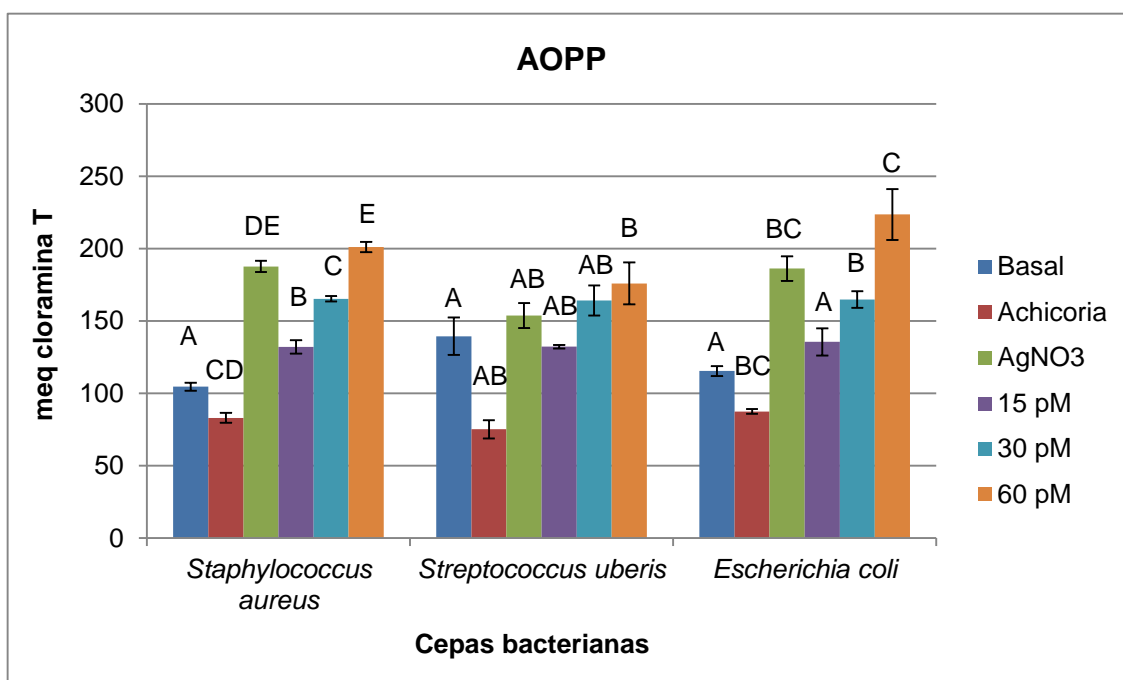


Figura 37. Determinación de productos proteicos de oxidación avanzada por espectrofotometría para cepas de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* frente al agregado de AgNPs o precursores de síntesis. mEq de cloramina T con respecto a los diferentes tratamientos: Extracto de achicoria, AgNO₃ (1mM), AgNPs (15 pM, 30 pM y 60 pM).

Las barras muestran la media \pm E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó independientemente para cada cepa.

Los resultados obtenidos muestran un efecto dependiente de la concentración de AgNPs para todas las cepas evaluadas, alcanzándose en todos los casos la máxima producción de AOPP a concentraciones supra-CIM de AgNPs (60 pM).

En el caso de *S. aureus*, se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el basal y cualquiera de las concentraciones de AgNPs evaluadas (15, 30 y 60 pM), reportándose la máxima producción de AOPP a concentración supra-CIM, incluso mayor que para AgNO₃ presente en una concentración de 9 órdenes de magnitud más elevada con respecto a las AgNPs.

Para *S. uberis*, si bien la generación de AOPP fue dependiente de la concentración de AgNPs como se mencionó previamente, solo el agregado de concentraciones supra-CIM de AgNPs mostró un aumento significativo ($p < 0,05$) con respecto al control del metabolismo basal. Sin embargo, entre las concentraciones de AgNPs evaluadas, no se evidenciaron diferencias significativas.

Los valores máximos de producción se registraron para *E. coli* incubada con 60 pM de AgNPs. Sin embargo, a concentraciones de AgNPs menores a la CIM (15 pM), las diferencias con el microorganismo incubado con PBS no fueron significativas. Contrario a esto, los agregados de concentraciones CIM y supra-CIM (30 y 60 pM, respectivamente) de AgNPs, produjeron un incremento significativo ($p < 0,05$) con respecto al metabolismo basal, además de presentar diferencias significativas entre sí.

El análisis de los datos presentados permite evidenciar el daño oxidativo que generan las AgNPs *green* sobre todas las cepas evaluadas involucrando incluso la oxidación de proteínas. Es de importancia destacar que los AOPP son un marcador de estrés oxidativo más preciso que los productos de peroxidación lipídica, ya que permanecen más tiempo que el MDA en las células afectadas.

Resulta relevante indicar que el efecto nocivo antimicrobiano en bacterias es irreparable cuando las macromoléculas proteicas se ven afectadas, como fue demostrado en los ensayos precedentes. Sobre la base de esto, se demostró que la interacción de las AgNPs biosintetizadas con extracto de achicoria con las bacterias evaluadas, genera un estado de estrés oxidativo que finalmente puede desencadenar en la muerte de los microorganismos. Los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con los reportados por Gomaa (2017), en los cuales, tras 6 horas de incubación, se detectó un aumento significativo en la producción de ERO en *S. aureus* y *E. coli* tratadas con AgNPs pero no en los controles, indicando que las AgNPs pueden formar ERO y éstos a su vez, son capaces de dañar la membrana celular bacteriana, la estructura de las proteínas y el sistema intracelular (Gomaa, 2017).

5.6. Capacidad de Adherencia de Diferentes Cepas Bacterianas a Células MAC-T

Se ha demostrado que las diferentes especies bacterianas utilizan distintos factores de virulencia que les permiten invadir y sobrevivir en el ambiente de la glándula mamaria bovina. Son capaces, de este modo, de provocar infecciones ya sean subclínicas, clínicas e incluso crónicas, dependiendo del tipo de estrategia expuesta por el microorganismo para desarrollar la infección (Almeida y col., 1996b; Döpfer y col., 2000; Camussone y col., 2013; Souza y col., 2016).

Como se ha mencionado previamente, un paso esencial para la colonización de los microorganismos en el epitelio mamario bovino y el establecimiento de la infección es la adherencia de las bacterias a las células epiteliales. Seguidamente, la internalización de

los patógenos en dichas células, se considera una importante estrategia de virulencia que les permite ocupar un microambiente protegido de los mecanismos de defensa del hospedador (Souza y col., 2016). Sobre la base de esto, en el presente trabajo se llevaron a cabo ensayos *in vitro* con el objeto de evaluar la capacidad de diferentes cepas bacterianas para adherirse a las células del epitelio mamario bovino y evaluar de este modo, si dicha adherencia es un paso clave en el mecanismo de patogenicidad de los mismos. Para ello se utilizaron células de glándula mamaria bovina (línea celular MAC-T), las cuales fueron enfrentadas a cepas correspondientes a las tres especies más frecuentemente aisladas de casos de mastitis bovina. Los resultados obtenidos para cada cepa se muestran en la Figura 38.

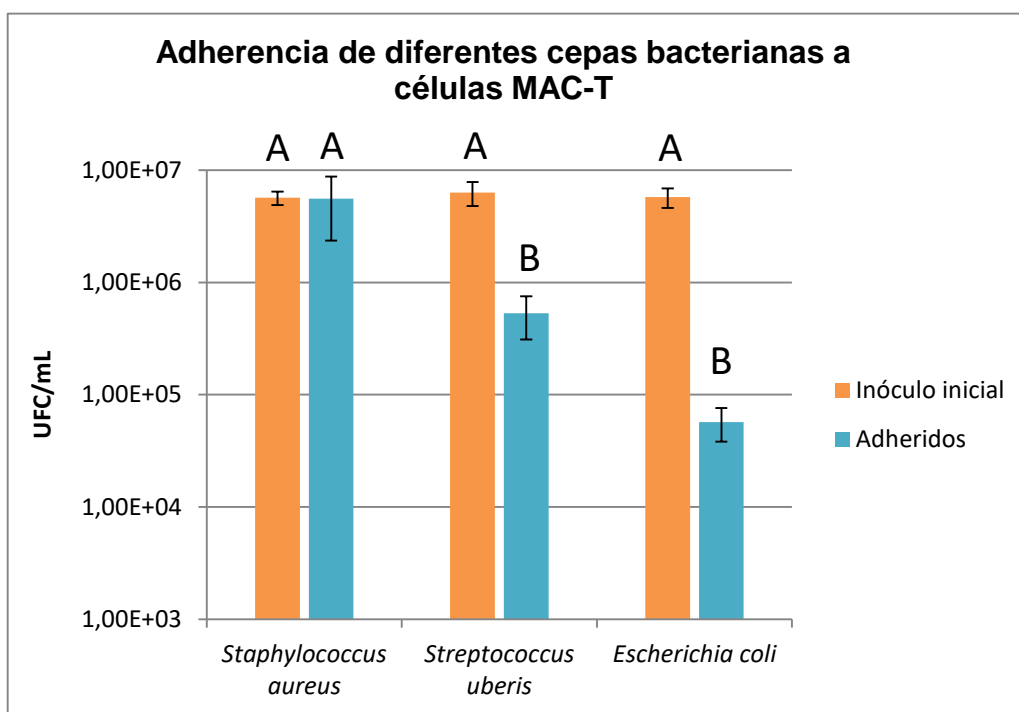


Figura 38. Capacidad de adherencia de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* a células MAC-T. UFC/ml de cada patógeno inoculado inicialmente y UFC/ml de los patógenos adheridos.

Las barras muestran la media \pm E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó independientemente para cada cepa.

Como puede observarse en la Figura 38, cada una de las especies bacterianas difirió en el perfil exhibido en cuanto a adherencia a la línea celular.

S. aureus mostró una capacidad de adherirse a las células epiteliales mayor en comparación con los demás patógenos evaluados, exhibiendo un 98% de adherencia. Este

resultado está estrechamente relacionado a los factores de virulencia de dicho microorganismo (Camussone y col., 2013), entre los cuales se encuentran algunos asociados a su capacidad de adherencia. Los resultados obtenidos son acordes a los presentados por Armas y col. (2017), en los que se evaluó la capacidad de diferentes patógenos y BAL para adherirse e invadir células MAC-T. En el mismo, si bien los porcentajes de adherencia fueron menores a los obtenidos en el presente trabajo, la cepa de *S. aureus* 357-08 fue una de las que mayor adherencia presentó resultando también la más invasiva.

Seguidamente, *S. uberis* fue el microorganismo que más se adhirió a las células MAC-T, aunque mostrando solo valores cercanos al 8% de adherencia ($5,31 \times 10^5$ UFC/ml). Si bien se encuentra clasificado como un patógeno de carácter ambiental, ha sido reportado como causante de numerosos casos de mastitis bovina (Tamilselvam y col., 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran en concordancia con los presentados por Almeida y col. (1996a). En los mismos se evaluó la capacidad de adherencia de dos cepas de *S. uberis*; la cepa capsulada, *S. uberis* UT 101 exhibió un porcentaje de adherencia de 9,28%, mientras que, para la cepa no capsulada, *S. uberis* 102, el porcentaje de adherencia a células MAC-T fue mayor, alcanzando valores de 16,44%.

Por último, *E. coli* expresó capacidad de adherencia a células MAC-T prácticamente nula (1%, es decir, $5,71 \times 10^4$ UFC/ml). Lo observado para este microorganismo, podría deberse en gran parte a que la patogenia del mismo se basa fundamentalmente en la producción de endotoxinas, las cuales son liberadas cuando la bacteria muere por efecto de la actividad macrofágica de defensa (Döpfer y col., 2000, Corbellini, 2002). Otros investigadores reportaron, contrariamente a lo encontrado en el presente trabajo, una elevada capacidad de adhesión en diferentes cepas de *E. coli* provenientes de infecciones intramamarias persistentes y transitorias (Dogan y col., 2006). Por otro lado, para la cepa *E. coli* 285-05 se reportó un elevado porcentaje de adherencia aunque nula capacidad de invadir las células MAC-T (Armas y col., 2017).

Es relevante destacar que el microorganismo que mostró mayor capacidad de adherencia fue *S. aureus*, el cual, a su vez, resulta el más frecuentemente aislado de muestras de leche de vacas con mastitis y es, además, considerado como el patógeno contagioso principalmente productor de mastitis subclínica crónica. Esto hace que, incluso que bajo tratamiento con antibióticos, sea muy difícil de eliminarlo del rodeo, lo

que convierte a los bovinos infectados en reservorios bacterianos poniendo en riesgo a todo el ganado.

S. uberis, a diferencia de *S. aureus*, es considerado un patógeno ambiental con importancia emergente como causante de mastitis bovina debido a la elevada prevalencia de infecciones intramamarias asociadas a dicho microorganismo. La adherencia a células epiteliales bovinas es, en el caso de *S. uberis*, un paso fundamental en su mecanismo de patogenicidad. En este microorganismo se ha reportado, incluso, la presencia de una molécula de adhesión (SUAM), indicando que para invadir las células epiteliales y colonizar la glándula mamaria, la adhesión del patógeno es un evento esencial (Almeida y col., 2011).

E. coli es el microorganismo que demostró el menor porcentaje de adherencia a las células MAC-T. Dicho patógeno es clasificado como oportunista y se asocia principalmente a casos de mastitis clínica aguda (Döpfer y col., 2000). Según diferentes reportes, este microorganismo puede unirse a las células epiteliales mamarias *in vitro* pero dicha adhesión no se considera esencial para la patogenia de la mastitis clínica causada por *E. coli* (Döpfer y col., 2000). Se cree que la inflamación mamaria aguda se desarrolla a partir de la liberación de endotoxinas, como resultado de la lisis del microorganismo. Por otro lado, se ha evaluado la patogenia de aislados de *E. coli* de infecciones intramamarias únicas y recurrentes, demostrando en ambos casos idénticas capacidades de adhesión, pero diferentes cinéticas de invasión en las células epiteliales. Esto podría ser la explicación de las infecciones persistentes causadas por *E. coli*, ya que, si la invasión a dichas células ocurre *in vivo* lo suficientemente rápido antes de ser fagocitadas por polimorfonucleares o macrófagos, podría constituirse un reservorio intramamario del microorganismo, lo que sería una fuente constante de infección (Döpfer y col., 2000; Dogan y col., 2006).

Como se ha discutido en esta sección, las distintas especies de microorganismos asociados a mastitis bovina presentan diferentes mecanismos de patogenicidad. Esto conlleva a que, para el desarrollo de estrategias alternativas para el tratamiento y/o prevención de dicha infección, el conocimiento del mecanismo de virulencia de cada uno de los patógenos resulta relevante, a modo de aumentar su eficacia contra los mismos.

5.6.1. Capacidad de Diferentes Cepas Bacterianas para Adherirse a Células del Epitelio Mamario Bovino en Presencia de AgNPs Biosintetizadas

Sobre la base de lo expuesto en lo referente a los distintos mecanismos de infección de los microorganismos y con relación al planteamiento de utilizar las AgNPs *green* como alternativa para la prevención y/o tratamiento de la mastitis bovina, se llevó a cabo el ensayo de adherencia en presencia de AgNPs. Resultó necesario evaluar de qué manera las AgNPs afectaban la adherencia de los microorganismos a células epiteliales mamarias bovinas, siendo éste un paso clave para muchos patógenos al momento de establecer la infección.

Se llevó a cabo un ensayo de adherencia clásico, con la variación de que las monocapas de células MAC-T fueron previamente tratadas durante 30 min con 5 pM de AgNPs (concentración sub-CIM). Posteriormente, los patógenos a evaluar se agregaron a las células a una MOI = 100, siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.2.3.4.6. de Materiales y Métodos. Al momento de realizar el ensayo, se escogieron estas condiciones de pre-tratamiento, debido al enfoque en la utilización de las AgNPs *green* como método preventivo de mastitis bovina, en el que las mismas serían inoculadas en los pezones post-ordeño. Por ello, se evaluó la adherencia de las diferentes cepas en presencia y en ausencia de AgNPs, comparando ambas situaciones.

En la Figura 39 se muestra el efecto del agregado de AgNPs biosintetizadas con extracto de achicoria a las células MAC-T sobre la adherencia de los diferentes patógenos.

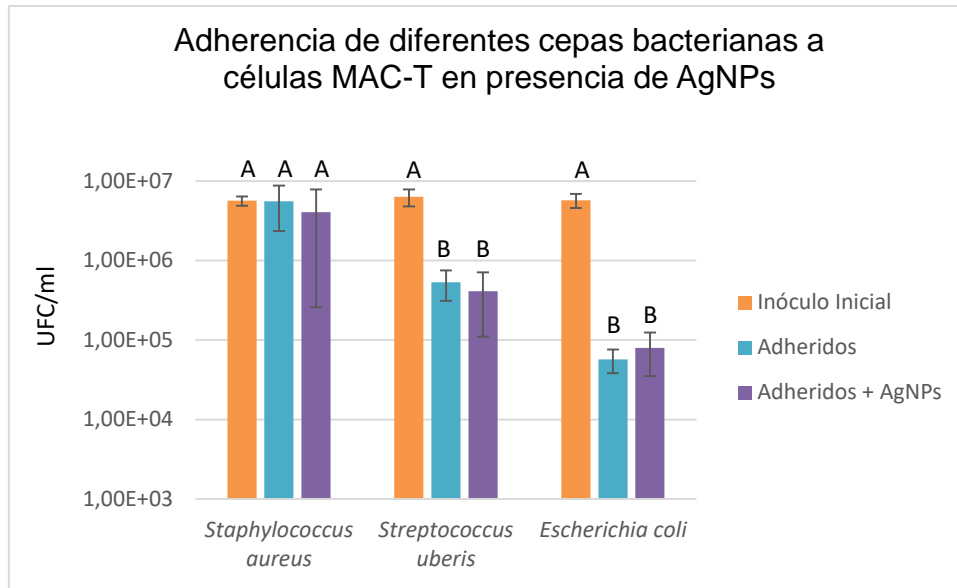


Figura 39. Capacidad de adherencia de *S. aureus*, *S. uberis* y *E. coli* a células MAC-T en ausencia y presencia de AgNPs a concentraciones sub-CIM: UFC/ml de cada patógeno inoculado inicialmente y UFC/ml de los patógenos adheridos sin AgNPs y con AgNPs.

Las barras muestran la media \pm E.E. obtenidos de realizar cada ensayo por triplicado. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó independientemente para cada cepa.

De los resultados obtenidos se desprende que, frente a los patógenos que presentaron una mayor capacidad de adherencia a células MAC-T, como es el caso de *S. aureus* y *S. uberis*, la presencia de nanopartículas produjo una disminución en la cantidad de bacterias adheridas, aunque la misma no resultó significativa en ninguno de los dos casos ($p > 0,05$). Por el contrario, para *E. coli* pudo observarse un pequeño aumento en cantidad de bacterias adheridas cuando el ensayo se realizó en presencia de AgNPs *green*, aunque, al igual que en casos anteriores, la diferencia entre las dos situaciones testeadas no resultó significativa ($p > 0,05$).

Podría concluirse entonces que, a la concentración evaluada, la utilización de AgNPs biosintetizadas como método preventivo no sería una estrategia factible para el control de mastitis bovina en cuanto a la disminución de la adherencia de los patógenos. Sin embargo, sería interesante evaluar su efecto sobre la internalización de estos microorganismos, a modo de determinar si las AgNPs son capaces, a este nivel, de reducir la capacidad de invasión y, por consiguiente, la persistencia de los patógenos.

5.7. Citotoxicidad de AgNPs Biosintetizadas

Uno de los problemas principales en veterinaria y en la salud pública en las últimas décadas, son los mecanismos de resistencia a uno o más antibióticos que han desarrollado la mayoría de las especies patógenas. Ante este escenario, el empleo de AgNPs capaces de eliminar microorganismos a través de un mecanismo que destruye las cadenas de ADN, podría impedir que éstos recopilen información de la funcionalidad de la nanopartícula y, por ende, no pueden generar resistencia. Es por ello, y sobre la base de los resultados obtenidos, que el presente plan de trabajo doctoral ambiciona la aplicación de las AgNPs obtenidas por procesos sintéticos ecoamigables y, por ende, más biocompatibles, como estrategia terapéutica y/o preventiva no convencional contra la mastitis bovina y así evitar la proliferación de nuevos microorganismos resistentes a antibióticos. Tal aplicación se proyecta en el mejoramiento de la producción animal del sector agropecuario afectada por dicha enfermedad, favoreciendo el incremento de la productividad y competitividad de la región.

Uno de los principales desafíos en la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias para el control de mastitis bovina es alcanzar agentes antimicrobianos que inhiban selectivamente el crecimiento de microorganismos patógenos sin alterar la fisiología normal de las células de los animales donde se aplique. Por ello, uno de los primeros pasos en el estudio de cualquier nuevo producto como potencial agente antimicrobiano tales como las AgNPs *green*, consiste en la evaluación de los efectos adversos que dicho producto provoca sobre las células eucariotas específicas, es decir, su citotoxicidad.

Una línea celular epitelial mamaria bovina, células MAC-T, fue utilizada para la determinación del efecto citotóxico de las AgNPs biosintetizadas. Diferentes concentraciones de las nanopartículas fueron ensayadas a 37 °C por 48 horas, siendo la viabilidad celular valorada mediante el ensayo de captación de Rojo Neutro. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 40 y 41.

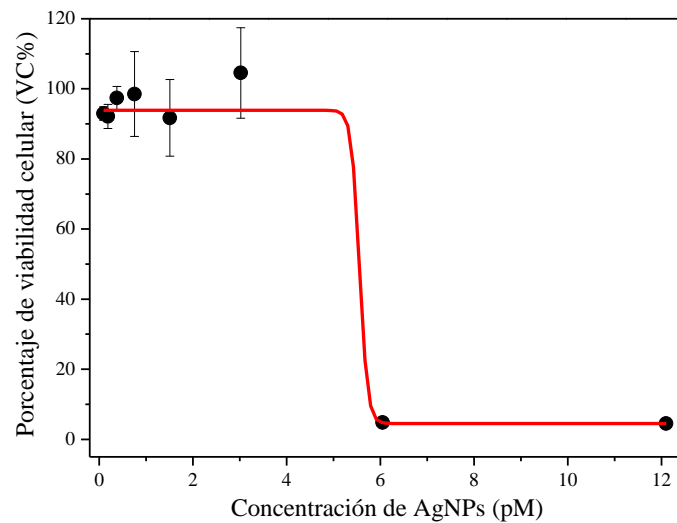


Figura 40. Curva dosis-respuesta de células MAC-T incubadas con AgNPs *green* a 37 °C por 48 h.

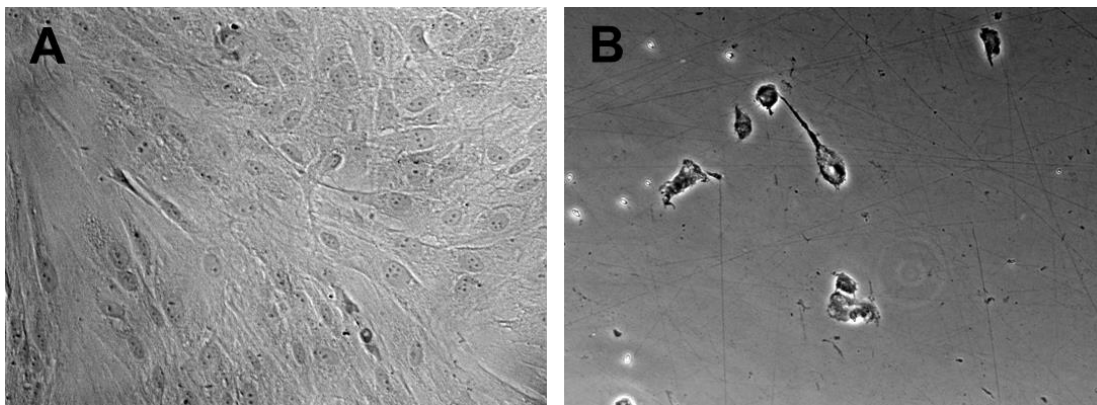


Figura 41. Células MAC-T incubadas con dos concentraciones diferentes de AgNPs biosintetizadas: (A) 3 pM y (B) 12 pM.

La curva dosis-respuesta obtenida (Figura 40) muestra que las AgNPs empleadas a concentraciones menores a 3 pM no presentan significativa toxicidad, puesto que la viabilidad celular fue mayor al 90% a las 48 horas de exposición (Figuras 40 y 41.A). Sin embargo, concentraciones superiores a 6 pM mostraron un incremento significativo en la toxicidad, encontrándose que disminuyen a un 5% la viabilidad de las células MAC-T (Figuras 40 y 41.B). Adicionalmente, el efecto citotóxico de los precursores de biosíntesis del nanomaterial fue despreciable, puesto que el extracto acuoso de achicoria puro y el ión plata a concentraciones menores 1 μ M no mostraron significativa toxicidad, siendo para ambos el porcentaje de células dañadas menor al 10%. Estos resultados son acordes a los publicados por otros investigadores donde se reportó un efecto altamente tóxico de

nanopartículas de ZnO sobre células HK-2, con una CC_{50} (concentración citotóxica media) alrededor de $2,42 \pm 0,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Pujalté y col, 2011).

La Figura 41 muestra las células MAC-T tratadas con diferentes concentraciones de AgNPs. Cuando dicho tratamiento se llevó a cabo con 3 pM de AgNPs, no se observó daño en las células eucariotas, mostrando características morfológicas iguales a las células control (sin tratamiento). Por otro lado, cuando las células MAC-T fueron tratadas con 12 pM de AgNPs biosintetizadas fue posible evidenciar su efecto citotóxico, observándose la retracción, el redondeamiento y el desprendimiento de células, y la consecuente disminución de la densidad celular (Figura 41.B).

Se debe indicar que la citotoxicidad experimental obtenida permitió determinar la CC_{50} de las AgNPs biosintetizadas mediante estimación por regresión sigmoidea de la curva dosis-respuesta. A partir del análisis de regresión obtenido con un $R^2 > 0,98$, se puede informar un valor de este parámetro de $(5,1 \pm 0,6)$ pM, el cual es menor que el valor promedio de CIM de AgNPs biosintetizadas (30 pM) sobre las tres cepas bacterianas productoras de mastitis bovina.

El valor de CC_{50} obtenido para las AgNPs indica que las mismas son citotóxicas *in vitro* si son empleadas a concentraciones mayores o iguales a CIM. Debido a que los ensayos *in vitro* son una herramienta primaria en la toma de decisiones acerca de la toxicidad de un nuevo producto, los resultados obtenidos en el presente trabajo no permiten un abordaje *in vivo* de la aplicación de AgNPs biosintetizadas con extracto acuoso de achicoria sobre animales en experimentación. Es decir, los efectos citotóxicos de este nanomaterial en células MAC-T imposibilitan su aplicación en ensayos a campo.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- Los diferentes microorganismos aislados de leche de bovinos que presentaban signos de mastitis pudieron ser identificados mediante características bioquímicas y técnicas moleculares.
- Se corroboró que todas las cepas aisladas pertenecieron a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia*, los cuales representan los principales agentes etiológicos causantes o asociados a mastitis bovina.
- A su vez, la mitad de los aislamientos estafilocócicos correspondieron a cepas de *S. aureus*, reafirmando de ese modo que dicho microorganismo corresponde al patógeno de mayor relevancia en los casos de mastitis bovina.
- El aprovechamiento de las biomoléculas presentes en el extracto acuoso de hojas de achicoria propició la exitosa producción “green” de AgNPs, las cuales fueron caracterizadas por espectroscopía UV-visible, microscopía electrónica de transmisión y difracción de rayos X.
- La optimización de las condiciones de síntesis de las AgNPs permitió la obtención de nanopartículas mediante procesos sintéticos reproducibles.
- Las AgNPs biosintetizadas mostraron actividad inhibitoria sobre las cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *E. coli* aisladas de casos de mastitis bovina
- Todas las cepas evaluadas requirieron concentraciones extremadamente bajas de AgNPs para ser inhibidas.
- Las AgNPs biosintetizadas fueron capaces de inhibir el crecimiento de los patógenos ensayados a concentraciones del orden del picomolar (pM), es decir, 6 órdenes de magnitud más bajas que las necesarias para los antibióticos convencionales de rutina en medicina veterinaria, evaluados *in vitro* en concentraciones del orden del nanomolar (nM).

- La interacción de las AgNPs biosintetizadas con extracto de achicoria con las cepas bacterianas evaluadas conlleva a la generación de un estado de estrés oxidativo, relacionado con su efecto antibacteriano.
- Las AgNPs biosintetizadas con extracto de achicoria (AgNPs *green*), en comparación con las obtenidas por un método químico convencional (AgNPs-cit), exhiben mayor afinidad por las monocapas ensayadas (DMPC y DMPC:DMPG).
- Incluso a concentraciones 10 veces mayores que las requeridas para AgNPs *green*, las AgNPs-cit no son capaces de generar un aumento significativo en la presión superficial en cualquiera de las monocapas evaluadas, lo que denota una pobre interacción con las mismas.
- Las AgNPs *green* ($\xi = -22 \pm 5$ mV) presentan mayor afinidad (representada por un mayor aumento en la presión superficial) por las monocapas cargadas negativamente compuestas por DMPC:DMPG (5:1) que por las zwitteriónicas compuestas por DMPC, a pesar de la carga neta negativa. Asimismo, la velocidad de interacción de las AgNPs *green* es mayor en monocapas compuestas por DMPC:DMPG que en aquéllas con DMPC puro.
- Los cambios observados en el potencial zeta de los liposomas cargados negativamente luego de ser incubados con las AgNPs *green*, permiten indicar la adsorción interfacial de las nanopartículas, ya sea total o parcial, sobre los liposomas compuestos por DMPC:DMPG.
- Los resultados obtenidos en membranas modelos fueron corroborados a partir de ensayos de interacción entre microorganismos grampositivos y gramnegativos con AgNPs *green*. Nuevamente, se observó un incremento en valor absoluto del el potencial zeta de dichas bacterias, confirmando el evento de adsorción interfacial, el cual fue diferencial de acuerdo al tipo de pared que presentan las bacterias ensayadas.
- Las AgNPs *green* no fueron capaces de generar poros en membranas modelos, lo

cual denota que la membrana lipídica no sería el blanco principal *per se* de la actividad antimicrobiana de este bionanomaterial. Sin embargo, se puede destacar que la membrana lipídica jugaría un rol de importancia en el evento de anclaje de las AgNPs *green* mediado por interacción interfacial.

- Todas las bacterias ensayadas mostraron un aumento en la generación de EROs cuando fueron incubados con diferentes concentraciones de AgNPs.
- Para todos los microorganismos ensayados, la generación de ERNs fue dependiente de la concentración de AgNPs agregada.
- El agregado de nanopartículas no parecería provocar la peroxidación lipídica, ya que no se observó una correlación entre el malondialdehído producido y las concentraciones de AgNPs evaluadas.
- La generación de productos proteicos de oxidación avanzada fue dependiente de la concentración de AgNPs para todas las cepas ensayadas. Esto podría estar indicando que el daño oxidativo causado por las AgNPs sobre dichas cepas es capaz de alcanzar incluso el nivel proteico.
- *S. aureus* fue el microorganismo que demostró la mayor capacidad de adherencia a las células MAC-T. Estos resultados estarían en concordancia con el tipo de infección con el que se vincula a este patógeno, principalmente mastitis subclínica persistente.
- *S. uberis* en contacto con las células MAC-T evidenció un bajo porcentaje de adherencia. Esto podría estar relacionado a su clasificación dentro de los patógenos ambientales con importancia emergente como causante de mastitis bovina.
- *E. coli* fue el patógeno que menos adhirió a células MAC-T.
- El añadido de AgNPs mostró, para las cepas de *S. aureus* y *S. uberis*, una tendencia a disminuir la adherencia de dichos patógenos, aunque en ningún caso

las diferencias entre las condiciones con y sin AgNPs resultaron significativas.

- Los resultados obtenidos indican que, bajo las condiciones evaluadas (concentración y tiempo de pre-tratamiento de las MAC-T) las AgNPs no son capaces de reducir la adherencia de los patógenos. Esto indica que no serían, al menos en este aspecto, una estrategia para la prevención de la mastitis bovina.
- La evaluación de citotoxicidad *in vitro* demostró que las AgNPs son tóxicas para las células MAC-T a concentraciones iguales o mayores a los valores de CIM, pudiendo no obstante, ser utilizadas a concentraciones menores a 5 pM.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- A.J. Huh, Y.J. Kwon. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. 156: 128-145.
- Adabi, M., Naghibzadeh, M., Adabi, M., Zarrinfard, M. A., Esnaashari, S. S., Seifalian, A. M., Faridi-Majidi, R., Aiyelabegan, H.T., Ghanbari, H. (2017). Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 45: 833-842.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*. 7: 17-28.
- Aires de Souza, M., Sanches, I. S., Van Belkum, A., Van Leeuwen, W., Verbrugh, H., De Lencastre, H. (1996). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods. *Microbial Drug Resistance*. 2: 331-341.
- Alatawi, F. S., Faridi, U. A., Alatawi, M. S. (2018). Effect of treatment with vitamin D plus calcium on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 26: 1208-1213.
- Albesa, I., Becerra, M. C., Batán, P. C., Páez, P. L. (2004). Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 317: 605-609.
- Almeida, R. A., Luther, D. A., Kumar, S. J., Calvinho, L. F., Bronze, M. S., Oliver, S. P. (1996a). Adherence of *Streptococcus uberis* to Bovine Mammary Epithelial Cells and to Extracellular Matrix Proteins. *Journal of Veterinary Medicine B*. 43: 385-392.
- Almeida, R. A., Luther, D. A., Oliver, S.P. (1999b). Incubation of *Streptococcus uberis* with extracellular matrix proteins enhances adherence to and internalization into bovine mammary epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*. 178: 81-85.
- Almeida, R. A., Matthews, K. R., Cifrian, E. Guidry, A. J., Oliver, S. P. (1996b). *Staphylococcus aureus* Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells. *Journal of Dairy Science*. 79: 1021-1026.

- Almeida, R. A., Matthews, K. R., Cifrian, E., Guidry, A. J., Oliver, S. P. (2016). *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. 79: 1021–1026
- Almeida, R.A., Luther, D. A., Patel, D., Oliver, S. P. (2011). Predicted antigenic regions of *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM) are involved in adherence to and internalization into mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*. 148: 323-328.
- Angel Villegas, N., Baronetti, J., Albesa, I., Etcheverría, A., Becerra, M.C., Padola, N.L., Paraje, M.G., 2015. Effect of antibiotics on cellular stress generated in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 biofilms. *Toxicology in Vitro*. 29: 1692-1700.
- Armas, F., Camperio, C., Marianelli, C. (2017). *In Vitro* Assessment of the Probiotic Potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against Ruminant Mastitis-Causing Pathogens. *PLoS One*. 2: e0169543.
- Ashokkumar, S., Ravi, S., Kathiravan, V., Velmurugan, S. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using *A. indicum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 134: 34-39.
- Bach, K. D., Sipka, A., McArt, J. A. A. (2019). Case study: Evaluating quarter and composite milk sampling for detection of subclinical intramammary infections in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*. 163:51–57
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Zadoks, R.N. (2006). Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*. 89: 1877-1895.
- Barros, E. M., Iorio, N. L., Bastos, M. F. B., Dos Santos, K. R., Giambiagi-de Marval, M. (2007). Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 59: 251–257.
- Basavegowda, N., Lee, Y. R. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) peel extract: a novel approach towards waste utilization. *Materials Letters*. 109: 31-33.
- Becerra, M. C., Páez, P. L., Laróvere, L. E., Albesa, I. (2006). Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 285: 29-34.

- Berni, E., Marcato, P. D., Nakazato, G., Kobayashi, R. K. T., Vacchi, F. I., Umbuzeiro, G. A., Durán, N. (2013). Violacein/poly (-caprolactone)/chitosan nanoparticles against bovine mastitis: Antibacterial and ecotoxicity evaluation *Journal of Physics: Conference Series*. 429: 012030.
- Bohinc, K., Giner-Casares, J. J., and May, S. (2014). Analytic model for the dipole potential of a lipid layer. *Journal of Physical Chemistry B*. 118: 7568-7576.
- Borioli, G. A., Caputto, B. L., Maggio, B. (2001). c-FOS is Surface active and interacts differentially with phospholipid monolayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 280: 9-13.
- Bouchard, D. S., Seridan, B., Saraoui, T., Rault, L., Germon, P., Gozalez-Moreno, C., Nader-Macias, F. M. E., Baud, D., François, P., Chuat, V., Chain, F., Langella, P., Nicoli, J., Le Loir, Y., Even, S. (2015). Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. *PLoS One*. 10: e0144831
- Breser, M. L.; Felipe, V., Bohl, L. P., Orellano. M. S., Isaac, P., Conesa, A., Rivero, V.E, Correa, S. G., Bianco, I. D., Porporatto, C. (2018). Chitosan and cloxacillin combination improve antibiotic efficacy against different lifestyle of coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from chronic bovine mastitis. *Scientific Reports*. 8: 5081-5093.
- Brezesinski, G., Möhwald, H. (2003). Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 100-102: 563-584.
- Brockman, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?. (1999). *Current Opinión in Structural Biology*. 9: 438-443.
- Caggiano, N., Lorenzo Smirnoff, A., Bottini, J. M., De Simone, E.A. (2019) Protease activity and protein profile in milk from healthy dairy cows and cows with different types of mastitis. *International Dairy Journal*. 89:1-5.
- Camussone, C. M, Calvino, L. F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*. 45:119-130.
- Cardozo, V. F., Lancheros, C. A., Narciso, A. M., Valereto, E. C., Kobayashi, R. K., Seabra, A. B., Nakazato, G. Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. (2014). *International Journal of Pharmaceutics*. 473: 20-29.

- Castanho, M. A. R. B., Fernandes, M. X. (2006). Lipid membrane-induced optimization for ligand–receptor docking: recent tools and insights for the “membrane catalysis” model. *European Biophysics Journal*. 35: 92-103.
- Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 157: 1-11.
- Cavallini E. R. *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica. (2005).
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N. J., Ross, L. Jr., Surampalli, R. Y., Hu, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*. 42: 3066-3074.
- Cioffi, N., Rai, M. (Eds.). *Nano-Antimicrobials. Progress and Prospects*. Springer Science & Business Media (2012).
- CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, approved Standard M100-S15, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2005.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*. 17: 1195-1214.
- Corbeil, A., Labrie, J., Goetz, C., Dufour, S., Doghri, I, Rivière, L., Jacques, M. (2018). *Short communication: Search for superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk in Canada*. *Journal of Dairy Science*. 102: 1-3.
- Corbellini, C. M. La mastitis bovina y su impacto económico sobre la calidad de leche. Medellín: Memorias III Seminario internacional sobre competitividad en carne y leche COLANTA (2002) 251.
- Dallard, B. E., Baravalle, C., Andreotti, C., Ortega, H. H., Neder, V., Calvinho, L. F. (2011). Intramammary inoculation of Panax ginseng extract in cows at drying off enhances early mammary involution. *Journal of Dairy Research*. 78: 63-71.
- Daphedar, A., Taranath, T. C. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Albizia saman* (Jacq.) Merr. and their cytotoxic effect on mitotic chromosomes of *Drimia indica* (Roxb.) Jessop. *Environmental Science and Pollution Research*. 24:25861-25869.
- Davies, K. J. (1993). Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes. *Biochemical Society Transactions*. 21: 346-353.

- Diepers, A. C., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Pan, L., Paulsen, K., Paduch, J. H. (2016). In vitro ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 5: 84-92.
- Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., R. A. Almeida, R. A., Oliver, S. P., Simpson, K., Schukken, Y. H. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 116 (2006) 270-282.
- Domingues, M. M., Castanho, M. A. R. B., Santos, N. C. (2009). rBPI₂₁ Promotes Lipopolysaccharide Aggregation and Exerts Its Antimicrobial Effects by (Hemi)fusion of PG-Containing Membranes. *PLoS One*. 4: e8385.
- Domingues, M. M., Inácio, R. G., Raimundo, J. M., Martins, M., Castanho, M. A., Santos, N. C. (2012). Biophysical characterization of polymyxin b interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Peptide Science*. 98: 338-344.
- Domingues, M. M., Silva, P. M., Franquelim, H. G., Carvalho, F. A., Castanho, M. A. R. B., Santos, N. C. (2014). Antimicrobial protein rBPI21-induced surface changes on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 10: 543–551.
- Döpfer, D., Almeida, R. A., Lam, T.J.G.M., Nederbragt, H., Oliver, S. P., Gaastra, W. (2000). Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Veterinary Microbiology*. 74 331-343.
- Dos Santos Courrol, D.; Regina Borges Lopes, C.; da Silva Cordeiro, T.; Regina Franzolin, M.; Dias Vieira Junior, N.; Elgul Samad, R.; Coronato Courrol, L. (2018). Optical properties and antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by femtosecond laser photoreduction. *Optics and Laser Technology*. 103: 233–238.
- E. Puacz, E., Ilczyszyn, W.M., Kosecka, M., Buda, A., Dudziak, W., Polakowska, K., Panz, T., Białecka, A., Kasprowicz, A., Lisowski, A., Krukowski, H., Cuteri, V., Międzobrodzki, J. (2015). Clustering of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis strains from regions of Central-Eastern Poland based on their biochemical and genetic characteristics. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 18: 333-342.
- Espeche, M. C., Otero, M. C., Sesma, F., Nader-Macías M. E. F. (2009). Screening of Surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology*. 135: 346-357.

- Espeche, M. C., Pellegrino, M. S., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., Nader-Macías, M. E. F. (2012). Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*. 18: 103-109.
European Biophysics Journal. 46: 103-119.
- Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 65: 899-910.
- Fernandez Bolaños, O.F., Trujillo Graffe, J.E., Peña Cabrera, J. J., Cerquera Gallego, J., Granja Salcedo, Y. T. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 13:11
- Ferrer- Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballal, S., Romero, N., Alvarez, B., Radi, R. (2018). Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chemical Reviews*. 118: 1338-1408.
- Ferreyra Maillard, A. P. V., Dalmasso, P. R., López de Mishima, B. A., Hollmann, A. (2018). Interaction of green silver nanoparticles with model membranes: posible role in the antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 171: 320-326.
- Ferreyra Maillard, A. P. V., Gonçalves, S., Santos, N. C., López de Mishima, B. A., Dalmasso, P. R., Hollmann, A. (2019). Studies on interaction of green silver nanoparticles with whole bacteria by surface characterization techniques. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*. 1861: 1086-1092.
- Flores, C. Y. *Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida*. Tesis doctoral. UNLP, 2014.
- Frola, I. D., Pellegrino, M. S., Espeche, M. C., Giraud, J., Nader-Macias, M. E., Bogni, C. I. (2012). Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *Journal of Dairy Research*. 79: 84-92.
- Frola, I. D., Pellegrino, M. S., Magnano, G., Giraud, J. A., Espeche, M. C., Nader-Macías M. E. F., Bogni C. I. (2013). Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *Journal of Dairy Research*. 80: 28-35.
- Galano, A., Alvarez-Idaboy, J-R. (2011). Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Advances*. 1: 1763-1771.
- Gallucci, M. N., Fraire, J. C., Ferreyra Maillard, A. P. V., Páez, P. L., Aiassa Martínez, I. M., Pannunzio Miner, E. V., Coronado, E. A., Dalmasso, P. R. (2017). Silver nanoparticles

from leafy green extract of Belgian endive (*Cichorium intybus* L. var. *sativus*): Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity. *Materials Letters*. 197: 98-101.

- Ganguly, P., Breen, A., Pillai, S. C. (2018). Toxicity of nanomaterials: Exposure, pathways, assessment, and recent advances. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 4: 2237-2275.
- Giraudo, J. A., Calzolari, A., Rampone, H., Rampone, A., Giraudo, A. T., Bogni, C., Larriestra, A., Nagel, R. (1997). Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *Journal of Dairy Science*. 80:845-853.
- Gogoi, S. K., Gopinath, P., Paul, A., Ramesh, A., Ghosh, S. S., Chattopadhyay, A. (2006). Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir*. 22: 9322-9328.
- Gomaa, E. Z. (2017). Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*. 63: 36-43.
- Gomes, F., Henriques, M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*. 72:377-382
- Gonçalves, J. L., Kamphuis, C., Martins, C. M. M. R., Barreiro, J.R., Tomazi, T., Gameiro, A. H., Hogeveen, H., dos Santos, M. V. (2018). Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. *Livestock Science*. 210: 25–32.
- Gorup, L. F., Longo, E., Leite, E. R., Camargo, E. R. (2011). Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 360: 355–358.
- Haber, F., Weiss, J. (1932). Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften*. 20: 948-950.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., Jimenez de Aberasturi, D., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., Mahmoudi, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 30: 499-511.
- Hamouda, T., Baker Jr., J. R. (2000). Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 397-403.
- Hébert, A., Sayasith, K., Sénéchal, S., Dubreuil, P., Lagacé, J. (2000) Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiology Letters*. 193: 57-62.

- Heikkilä, A. M., Liski, E., Pyörälä, S., Taponen, S. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 101: 1-12.
- Henriques, S. T., Melo, M. N., Castanho, M. A. R. B. (2007). How to address CPP and AMP translocation? Methods to detect and quantify peptide internalization *in vitro* and *in vivo* (Review). *Molecular Membrane Biology*. 24: 173-184.
- Hochgräfe, F., Wolf, C., Fuchs, S., Liebeke, M., Lalk, M., Engelmann, S., Hecker, M. (2008). Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 190: 4997–5008.
- Hogan, J. S., Weiss, W. P., Todhunter, D. A., Smith, K. L., Schoenberger, P. S. (1992). Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *Journal of Dairy Science*. 75: 415-422.
- Hollmann, A., Martinez, M., Maturana, P., Semorile, L. C., Maffia, P. C. (2018). Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes and Synergism With Chemical Antibiotics. *Frontiers in Chemistry*. 6: 204-216.
- Hulkoti, N. I., Taranath, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 121: 474-483.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 54: 287-293.
- Innocenti, M., Gallori, S., Giaccherini, C., Leri, F., Vincieri, F. F., Mulinacci, N. (2005). Evaluation of the phenolic content in the aerial parts of different varieties of *Cichorium intybus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6497-6502.
- Iravani, I. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*. 13: 2638-2650.
- Jain, N., Bhargava, A., Rathi, M., Dilip, R. V., Panwar, J. (2015). Removal of protein capping enhances the antibacterial efficiency of biosynthesized silver nanoparticles. *PLoS ONE*. 10(7):e0134337.
- Jain, S., Mehata, M. S. (2017). Medicinal Plant Leaf Extract and Pure Flavonoid Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and their Enhanced Antibacterial Property. *Scientific Reports*. 7: 15867.
- Jesorka, A; Orwar, O. (2008). Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 1: 801-832.

- Jiang, D., Dinh, K. L., Ruthenburg, T. C., Zhang, Y., Su, L., Land, D. P., Zhou, F. (2009). A Kinetic Model for β -Amyloid Adsorption at the Air/Solution Interface and Its Implication to the β -Amyloid Aggregation Process. *Journal of Physical Chemistry*. 113: 3160-3168.
- Jorgensen, I. L., Kemmer, G. C., and Pomorski, T. G. (2017). Membrane protein
- K. Birdi (1989) Lipid and biopolymer monolayers at liquid interfaces, *Plenum Press New York*.
- Kazemi J, Ahmadi M, Saei HD, Adib hesami M. (2014) Antibacterial effect of silver nanoparticles along with protein synthesis-inhibiting antibiotics on *Staphylococcus aureus* isolated from cattle mastitis. *Biological Journal of Microorganism*. 2:15-22.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. H., Hwang, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H., Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 3: 95-101.
- Kim, S. H., Hyeong-Seon, L., Deok-Seon, R., Soo-Jae, C., Dong-Seo, L. (2011). Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 39: 77-85.
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W.J., Paul Ross, R., Hill, C. 2010. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *Journal of Dairy Research*. 77: 231-238.
- Knobloch, J., Suhendro, D. K., Zieleniecki, J. L., Shapter, J. G., Köper, I. (2015). Membrane-drug interactions studied using model membrane systems. *Saudi Journal of Biological Science*. 22: 714-718.
- Kobayashi, H., Cui, T., Ando, M., Hataishi, R., Imasaki, T., Mitsufuji, H., Hayashi, I., Tomita, T. (2002). Nitric oxide released from iNOS in polymorphonuclear leukocytes makes them deformable in an autocrine manner. *Nitric Oxide*. 7: 221-227.
- Krishnamoorthy, P., Suresh, K. P., Saha, S., Govindaraj, G., Shome, B. R., P. Roy. (2017). Meta-analysis of Prevalence of Subclinical and Clinical Mastitis, Major Mastitis Pathogens in Dairy Cattle in India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6: 1214-1234.
- Kromker, V., Reinecke, F., Paduch, J., Grabowski, N. (2014). Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clinical Microbiology*. 3: 157-163.
- Kumar, V., Dasgupta, N., Ranjan, S. (Eds.). *Nanotoxicology: Toxicity Evaluation, Risk Assessment and Management*. CRC Press Taylor & Francis Group (2018).

- Lara, H. H., Ayala-Nunez, N. V., Ixtepan-Turrent, L., Rodriguez-Padilla, C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology* 8: 1-10.
- Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtepan-Turrent, L., Singh D. K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*. 9: 30-37.
- Lawson, M., Jomova, K., Poprac, P., Kuča, K., Musilek, K., Valko, M. (2017). Free Radicals and Antioxidants in Human Disease. Nutritional Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives. Al-Gubory, K.H., Laher, I. (Eds.). Springer International Publishing AG 2017.
- Lee, P. C., Meisel, D. (1982). Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *Journal of Physical Chemistry* 86: 3391-3395.
- Leitner, G., Krifucks, O., Kiran, M. D., Balaban, N. (2011). Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 142: 25-35.
- Li, W., Kumar, R. K., O'Grady, R., Velan, G. M. (1992). Role of lymphocytes in silicosis: regulation of secretion of macrophage-derived mitogenic activity for fibroblasts. *International Journal of Experimental Pathology*. 73: 793-800.
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K., Chiu J. F., Che, C. M. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research* 5: 916-924.
- Lopes, C. R. B.; Courrol, L. C. (2018) Green synthesis of silver nanoparticles with extract of *Mimusops coriacea* and light. *Journal of Luminescence*. 199: 183-187
- Luo, F., Yang, D., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R. (2016). Characterization of bimetallic Fe/Pd nanoparticles by grape leaf aqueous extract and identification of active biomolecules involved in the synthesis. *Science of The Total Environment*. 562: 526-532.
- Martini, M. F., Disalvo, A. E. (2007). Superficially active water in lipid membranes and its influence on the interaction of an aqueous soluble protease. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. 1768: 2541-2548.
- Mata, R., Nakkala, J. R., Sadras, S. R. (2015). Catalytic and biological activities of green silver nanoparticles synthesized from *Plumeria alba* (frangipani) flower extract. *Materials Science and Engineering C*. 51: 216-225.
- Maya Girón, J. V.; Vico, R. V.; Maggio, B., Zelaya, E., Rubert, A., Benítez, G., Carro, P., Salvarezza, R. C., Vela, M. E. (2016). Role of the capping agent in the interaction of

hydrophilic Ag nanoparticles with DMPC as a model biomembrane. *Environmental Science: Nano*. 3: 462-472.

- McCallum, S. E., Parameswaran, N., Bordia, T., Fan, H., McIntosh, J. M., Quik, M. (2006). Differential regulation of mesolimbic alpha 3/alpha 6 beta 2 and alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptor sites and function after long-term oral nicotine to monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 318 :381–388.
- Melo, M. N., Castanho. M. A. (2012). The mechanism of action of antimicrobial peptides: lipid vesicles vs. Bacteria. *Frontiers in Immunology*. 3:236-245.
- Mulvaney, P. (1996). Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir*. 12: 788-800.
- Nazeruddin, G. M., Prasad, N. R., Waghmare, S. R., Garadkar, K. M., Mulla, I. S. (2014). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Azadirachta indica* leaf extract and its anti-microbial activity. *Journal of Alloys and Compounds*. 583: 272-277.
- Nicoli, S., Eeman, M., Deleu, M., Bresciani, E., Padula, C., and Santi, P. (2010). Effect of lipopeptides and iontophoresis on aciclovir skin delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62: 702-708.
- Nisme, S. B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RCS Advances*. 5: 27986–28006
- Nobre, T.M., Pavinatto, F.J., Caseli, L., Barros-Timmons, A., Dynarowicz-Łątka, P., Oliveira, O. N. (2015). Interactions of bioactive molecules & nanomaterials with Langmuir monolayers as cell membrane models. *Thin Solid Films*. 593: 158-188.
- Otunola, G. A., Afolayan, A. J. (2018). *In vitro* antibacterial, antioxidant and toxicity profile of silver nanoparticles green-synthesized and characterized from aqueous extract of a spice blend formulation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 32: 724-733.
- Páez, P. L., Becerra, M. C., Albasa, I. (2010). Antioxidative mechanisms protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 24: 771-776.
- Páez, P. L., Becerra, M. C., Albasa, I. (2011). Comparison of macromolecular oxidation by reactive oxygen species in three bacterial genera exposed to different antibiotics. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 61: 467-472.
- Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., Bogni, C. I. (2011). Bovine Mastitis: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 12: 7.

- Pellegrino, M., Giraud, J., Raspanti, C., Nagel, R., Odierno, L., Primo, V., Bogni, (2008). Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 127: 186-190.
- Pellegrino, M., Giraud, J., Raspanti, C., Odierno, L., Bogni, C. (2010). Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* 28: 4523-4528.
- Pellegrino, M., Rodriguez, N., Vivas, A., Giraud, J., Bogni, C. (2016). *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine induces humoral and cellular immune responses on pregnant heifers. *Vaccine*. 34: 3356-3362.
- Peralta, M. A., da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., Paraje, M. G. (2015). Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilm. *Phytomedicine*. 22: 975-980.
- Perrig, M. S., Veaute, C., Renna M.S., Pujato N., Calvinho, L., Marcipar, I., Barbagelata, M. S. (2017). Assessment of the potential utility of different regions of *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM) for mastitis subunit vaccine development. *Microbial Pathogenesis*. 105: 273-279.
- Persson, Y., Nyman, A. J., Grönlund-Andersson, U. (2011). Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 53:36.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30:11-26.
- Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I. (2013). Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013: 956792.
- Poutrel, B., Bareille, S., Lequeux, G., Leboeuf, F. (2018). Prevalence of Mastitis Pathogens in France: Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Science and Technology*. 9: 522-524.
- Prado, M. E., Almeida, R. A., Ozen, C., Luther, D.A., Lewis, M.J., Headricka, S. J., Oliver, S. P. (2011). Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule induces antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 141: 201–208.

- Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., Costa, L. (2010). Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 134: 208-217.
- Pujalté, I., Passagne, I., Brouillard, B., Tréguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtès, C., L'Azou, B. (2011). Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 8:10.
- Pyörälä, S., Taponen, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*. 134: 3-8.
- Quinteros, M.A., Aiassa Martínez, I.M., Dalmaso, P.R., Páez, P.L. (2016a). Silver nanoparticles: biosynthesis using an ATCC reference strain of *Pseudomonas aeruginosa* and activity as broad spectrum clinical antibacterial agents. *International Journal of Biomaterials*. 2016. 5971047.
- Quinteros, M.A., Cano Aristizábal, V., Dalmaso, P.R., Paraje, M. G., Páez, P.L. (2016b). Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro*. 36: 216-223.
- R. Jenkis, R. Snyder. *Introduction to X-ray powder diffractometry*. John Wiley and Sons, Inc., USA, 1996.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27: 76-83.
- Raspanti, C. G., Bonetto, C. C., Vissio, C., Pellegrino, M.S., Reinoso, E. B., Dieser, S. A., Bogni, C. I., Larriestra, A. J., Odierno, L. M. (2016). Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 48: 50-56.
- reconstitution into giant unilamellar vesicles: a review on current techniques.
- Repetto Jiménez, M., Repetto Kuhn, G. *Toxicología Fundamental*. Cap. 11: Evaluación de la Toxicidad y del Riesgo. *Toxicología Experimental*. Ediciones Díaz de Santos (2009).
- Rivas-Arancibia, S., Gallegos-Ríos, C., Gomez-Crisostomo, N., Ferreira-Garcidueñas, E., Flores Briseño, D., Navarro, L., Rodríguez-Martinez, E. (2011). Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease. *Neurodegenerative Diseases- Processes, Prevention, Protection and Monitoring*. Chung Chang, R. C. (Ed.). ISBN: 978-953-307-485-6, InTech.

- Romero, J., Benavides, E., Meza, C. (2018). Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*. 5: 273-283.
- Sadeghi, B., Rostami, A., Momeni, S. S. (2015). Facile green synthesis of silver nanoparticles using seed aqueous extract of *Pistacia atlantica* and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 134: 326–332.
- Sana, S. S., Dogiparthi, L. K. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Givotia moluccana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity. *Materials Letters*. 226: 47-51.
- Santos, O. C. S., Barros, E. M., Vasconcelos Paiva Brito, M. A., de Freire Bastos, M. C., Netto dos Santos, K. R., Giambiagi-de Marval, M. (2008). Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the *groEL* gene. *Veterinary Microbiology*. 130: 134-140.
- Schabauer, A., Pinior, B., Gruber C.M., Firth, C. L., Käsbohrer, A., Wagner, M., Rychli, K., Obritzhauser, W. (2018). The relationship between clinical signs and microbiological species, *spa* type, and antimicrobial resistance in bovine mastitis cases in Austria *Veterinary Microbiology*. 227:52–60.
- Scherpenzeel, C. G. M., Hogeveen, H., Maas, L., Lam, T. J. G. M. (2018). Economic optimization of selective dry cow treatment. *Journal of Dairy Science*. 101: 1530-1539.
- Seney, C. S., Gutzman, B. M., Goddard, R. H. (2009). Correlation of size and surface-enhanced Raman scattering activity of optical and spectroscopic properties for silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* 113: 74-80.
- Shireen, T., Basu, A., Sarkar, M., and Mukhopadhyay, K. (2015). Lipid composition is an important determinant of antimicrobial activity of alphamelanocyte stimulating hormone. *Biophysical Chemistry*. 196: 33-39.
- Shivakumar, M., Nagashree, K. L., Yallappa, S., Manjappa, S., Manjunath, K.S., Dharmaprakash, M.S. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using pre-hydrolysis liquor of *Eucalyptus* wood and its effective antimicrobial activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 97: 55-62.
- Sies, H. (Ed.) Oxidative stress. Elsevier. (2013).
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G., Wright, C. J., Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 30: 3891–3914.

- Sondi, I., Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*. 275:177–182.
- Souza, F.N., Piepers, S., Della Libera, A. M. M. P., Heinemann, M. B., Cerqueira, M. M. O. P., De Vliegher, S. (2016). Interaction between bovine-associated coagulase-negative staphylococci species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior. *Journal of Dairy Science*. 99: 2867-2874.
- Srednik, M. E., Tremblay, Y. D. N., Labrie, J., Archambault, M., Jacques, M., Fernández Cirelli, A., Gentilini, E. R. (2017). Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*. 364.
- Stefaniu, C., Brezesinski, G., Möhwald, H. (2014). Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 208: 197-213.
- Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., Klabunde, K. J. (2002). Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir*. 18: 6679-6686.
- Tamboli, D. P., Lee, D. S. (2013). Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Hazardous Materials*. 260:878-884.
- Tamilselvam, B., Almeida, R. A., Dunlap, J. R., Oliver, S. P. (2006). *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 40: 279-285.
- Tamuly, C., Hazarika, M., Borah, S. Ch., Das, M. R., Boruah, M. P. (2013). In situ biosynthesis of Ag, Au and bimetallic nanoparticles using *Piper pedicellatum* C.DC: green chemistry approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 102: 627-634.
- Taponen, S., Nykäsenoja, S., Pohjanvirta, T. Pitkälä, A., Pyörälä, S. (2016). Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 58: 12-24.
- Taponen, S., Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*?. *Veterinary Microbiology* 134: 29-36.
- Teixeira, V., Feio, M. J., Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*. 51:149- 177.

- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6: 257-262.
- Tomazi, T., Ferreira, G. C., Orsi, A. M., Gonçalves, J. L., Ospina, P. A., Nydam, D. V., Moroni, P., dos Santos, M. V. (2018). Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 161:9–18.
- Totorá, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana. (2007).
- Tremblay, Y. D. N, Lamarche, D., Chever, P., Haine, D., Messier, S. Jacques, M. (2013). Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science*. 96: 234-246.
- Turkevich, J., Stevenson, P.C, Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 11: 55-75.
- Ulrich, A. S., Watts, A. (1994). Molecular response of the lipid headgroup to bilayer hydration monitored by 2H-NMR. *Biophysical Journal*. 66: 1441-1449.
- Vissio, C. Agüero, D. A., Raspanti, C. G., Odierno, L. M., Larriestra, A. J. (2015). Productive and economic daily losses due to mastitis and its control expenditures in dairy farms in Córdoba, Argentina. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 47: 7-14.
- Wang, K., Jin, X. L., Shen, X. G., Sun, L. P., Wu, L. M., Wei, J. Q., Marcucci, M. C., Hu, F. L., Liu, J.X. (2016). Effects of Chinese Propolis in Protecting Bovine Mammary Epithelial Cells against Mastitis Pathogens-Induced Cell Damage. *Mediators of Inflammation*. 2016, 8028291.
- Wang, L., Wu, Y., Xie, J., Wu, S., Wu, Z. (2018). Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts. *Materials Science & Engineering C*. 86:1-8.
- Wang, T., Jin, X., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R. (2014). Green synthesis of Fe nanoparticles using eucalyptus leaf extracts for treatment of eutrophic wastewater. *Science of the Total Environment*. 466-467: 210-213.
- Wang, X. F., Zhang, S. L., Zhu, L. Y., Xie, S. Y., Dong, Z., Wang, Y., Zhou, W. Z. (2012). Enhancement of antibacterial activity of tilmicosin against *Staphylococcus aureus* by solid lipid nanoparticles in vitro and in vivo. *Veterinary Journal*. 191: 115-120.

- Yang, X., Ouyang, W., Sun, J., Li, X. (2009). Post-antibiotic effect of Amoxicillin nanoparticles against main pathogenic bacteria of Bovine mastitis in vitro. *Journal of Northwest A & F University - Natural Science Edition*. 37: 1-6.
- Yu, Y., Cui, Y., Niedernhofer, L. J., Wang, Y. (2016). Occurrence, Biological Consequences, and Human Health Relevance of Oxidative Stress-Induced DNA Damage. *Chemical Research in Toxicology*. 29: 2008–2039.
- Zecconi, A., Scali, F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters*. 150: 12-22.
- Zhang, Y., Yang, D., Kong, Y., Wang, X., Pandoli, O., Gao, G. (2010). Synergetic Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles@Aloe Vera Prepared via a Green Method. *Nano Biomedicine and Engineering*. 2: 252-257.
- Zhao, X., Drlica, K. (2014). Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Current Opinion in Microbiology*. 21:1-6.
- Zhao, X., Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*. 86: 57-65.
- Zheng, K., Setyawati, M. I., Leong, D. T., Xie, J. (2018). Antimicrobial silver nanomaterials. *Coordination Chemistry Reviews*. 357: 1-17.