



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2023; 13:1-16. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.15>

Artículo original. Recibido: 18/08/2022. Aceptado: 31/05/2023. Publicado: 27/06/2023. Clave: e2022-64.

<https://www.youtube.com/watch?v=vPcSyYwFcCQ>

Evaluación del efecto antiparasitario de las nanopartículas de plata contra *Trypanosoma cruzi* *in vitro*

Evaluation of antiparasitic effect of silver nanoparticles against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*



Pescador-Rojas José¹ , Lucas-Gómez Misael² , Contreras-Ortiz Eloy³ ,
Vázquez-Chagoyán Juan³ , Bahena-Uribe Daniel⁴ , Aparicio-Burgos José^{1**} 

¹Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. ²Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México. ³Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México. ⁴Laboratorio Avanzados de Nanoscopía Electrónica (LANE), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México. *Autor responsable: José Alfredo Pescador-Rojas. **Autor para correspondencia: José E. Aparicio-Burgos. Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Apan- Calpulalpan Km. 8, Chimalpa Tlalayote S/N, C. P. 43920 Apan, Hidalgo, México. E-mail: josealfredo_pescador@uaeh.edu.mx, i.lucas@utvam.edu.mx, chema_coco12@yahoo.com.mx, jcvch@yahoo.com, dbahenau@cinvestav.mx, jose_aparicio@uaeh.edu.mx

Resumen

La tripanosomiasis Americana es una de las enfermedades tropicales desatendidas a nivel mundial, y es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Tc). Actualmente, los fármacos anti-Tc son limitados y no hay vacuna disponible. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) contra los tripomastigotes de las cepas Sylvio X10/4 (Tcl) y Esmeraldo (TcII). Las AgNPs se obtuvieron por el método de reducción y se les realizó una caracterización estructural. La actividad citotóxica de las AgNPs (actividad anti-Tc) se determinó mediante el cálculo de los valores de la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) en las células HaCaT y en los parásitos. Las AgNPs no mostraron citotoxicidad contra las células HaCaT en los valores de IC₅₀ probadas en los parásitos, y la IC₅₀ calculada en los tripomastigotes fue de 4.05 µg/ml y de 6.16 µg/ml en las cepas Tcl y TcII respectivamente. Las AgNPs fueron más activas contra las dos cepas de *Trypanosoma cruzi*, que el nifurtimox (400 µg/ml) *in vitro*. Estos resultados sientan las bases para la evaluación mayor de las AgNPs, por investigar su potencial quimioterapéutico para combatir la infección por *T. cruzi* en modelos animales.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, Chagas, AgNP, *in vitro*, plata.

Abstract

American trypanosomiasis is one the globally neglected tropical disease, and is cause by the protozoan haemoflagellate *Trypanosoma cruzi* (Tc). Currently, the anti-Tc drugs are limited and no vaccine is available. The objective of the study was to determine the effects of silver nanoparticles (AgNPs) against trypomastigotes of the Sylvio X10/4 (Tcl) and Esmeraldo (TcII) strains. The AgNPs were obtained by the reduction method and a structural characterization was carried out. The cytotoxic activity of the AgNPs (anti-Tc activity) was determined by calculating the values of half the maximum inhibitory concentration (IC₅₀) in HaCaT cells and parasites. AgNPs showed no-cytotoxicity against HaCaT cells at the IC₅₀ values assayed



in parasites, and the calculated IC₅₀ trypomastigotes was 4.05 µg/ml and 6.16 µg/ml for TcI and TcII strains, respectively. AgNPs were more active against both *Trypanosoma cruzi* strains than nifurtimox (400 µg/ml) *in vitro* assays. These results lay the groundwork for further evaluation of AgNPs, to investigate its chemotherapeutic value to fight *T. cruzi* infection in animal models.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas, AgNP, *in vitro*, silver.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es un protozoo flagelado del orden Kinetoplastida (El-Sayed *et al.*, 2005). Es el agente causal de la tripanosomiasis americana, una enfermedad parasitaria transmitida por vectores y endémica en Sudamérica, Centroamérica y México. *T. cruzi* representa un importante problema de salud pública, con aproximadamente 8 millones de personas infectadas y 25 millones en riesgo de infección (Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2018). En el 3-5 % de los pacientes afectados de forma aguda, la infección puede dar lugar a varias afecciones: 1) miocarditis, que puede evolucionar a insuficiencia cardíaca y muerte; 2) lesiones destructivas de cardiomiocitos y nervios cardíacos, que también pueden evolucionar a insuficiencia cardíaca; o 3) meningoencefalitis (James *et al.*, 2005). En pacientes con infección crónica, la enfermedad puede pasar desapercibida durante varios años, hasta que el 20-35 % de estos pacientes desarrollan lesiones irreversibles del sistema nervioso autónomo. La enfermedad de Chagas representa la principal causa de lesiones cardíacas en adultos jóvenes y económicamente productivos de países endémicos (El-Sayed *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005).

En la actualidad, las opciones de tratamiento son limitadas y no se dispone de ninguna vacuna para prevenir o controlar la infección por *T. cruzi*. Los fármacos aprobados por la OMS para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, como el nifurtimox (NFMX) y el benznidazol (BNZ), presentan al menos cuatro desventajas (Colantonio *et al.*, 2016). En primer lugar, debido a los duros efectos secundarios de estos fármacos, alrededor del 40 % de los pacientes abandonan el tratamiento. En segundo lugar, estos fármacos actúan con mayor eficacia durante la fase aguda de la infección; sin embargo, como es difícil detectarla, la mayoría de las personas inician el tratamiento farmacológico hasta que se ha establecido la fase crónica de la enfermedad, con la consiguiente reducción de la eficacia antiparasitaria de los fármacos (Colantonio *et al.*, 2016). Tercero, el acceso público a los fármacos terapéuticos es limitado (Chaves *et al.*, 2017). En cuarto lugar, algunas cepas de *T. cruzi* son resistentes al NFMX y al BZN, lo que hace que su eficacia sea subóptima (Toledo *et al.*, 2004). Estos factores enfatizan la necesidad de desarrollar mejores fármacos anti-*T. cruzi* y/o nuevas estrategias de tratamiento para la tripanosomiasis americana.

Las tendencias médicas actuales incluyen nanomateriales, especialmente metales nobles como el oro y la plata. Estos materiales han tenido aplicaciones biomédicas desde



la antigüedad (Ge *et al.*, 2014). Las investigaciones recientes sobre nanopartículas de oro se han orientado al tratamiento del cáncer, mientras que las nanopartículas de plata (AgNPs) se han utilizado para combatir patógenos (bacterias, hongos, virus y protozoos) (Ge *et al.*, 2014).

Las nanoestructuras de plata cristalina están disponibles en muchas formas y tamaños (Sun *et al.*, 2002) que se pueden utilizar como tratamientos médicos (Dankovich *et al.*, 2011; Dubas *et al.*, 2006; Kokura *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2006), pero el efecto de las nanopartículas de plata sobre los protozoos parásitos aún no se conoce completamente (Mao *et al.*, 2016). En este sentido, dos estudios han reportado que el método tradicional para sintetizar las AgNPs puede tener propiedades citotóxicas contra los protozoos patógenos *Leishmania tropica* y *Toxoplasma gondii* (Allahverdiyev *et al.*, 2011; Adeyemi *et al.*, 2017) y aunque recientemente Brito *et al.*, 2020 biosintetizaron AgNPs a partir de mazorcas de maíz que contenían xilanos fueron capaces de causar la muerte de la cepa Y del *T. cruzi*.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial citotóxico de las AgNPs sobre tripomastigotes de dos biotipos de *T. cruzi in vitro*. Hasta donde sabemos, este es el primer intento de definir cómo la dosis y las características estructurales de las AgNPs afectan a los cultivos de *T. cruzi in vitro*, en un esfuerzo por encontrar una alternativa segura para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de nanopartículas de plata

La plata inorgánica (AgNO_3 , $\geq 99,0\%$), y el borohidruro de sodio (NaBH_4 , $\geq 99,99\%$) se adquirieron en Sigma-Aldrich, Estados Unidos. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando agua desionizada (18M Ω ; Millipore). El método elegido induce la dispersión de las nanopartículas a través de una solución coloidal estable, generando un gradiente de concentración. Se utilizó borohidruro sódico como agente reductor bajo un baño frío con agitación magnética (Mulfinger *et al.*, 2007). La solución de AgNP (Figura 1) se produjo utilizando 0,1 mM AgNO_3 /50 mL (H_2O).

Las AgNPs preparadas en solución acuosa facilitaron el estudio de la interacción entre las nanopartículas y el parásito, sin la intervención de ningún surfactante o medio de dispersión que no fuera agua desionizada. Esto se consiguió tras varias síntesis piloto con dos agentes reductores (citrato y borohidruro). El borohidruro produjo una síntesis más estable y concentrada (0,1 mM AgNPs) que sirvió para alcanzar las dosis de 1-12 μg utilizadas por Allahverdiyev *et al.*, 2011 contra *Leishmania tropica*. La esterilidad de las AgNPs se comprobó incubando las nanopartículas en caldo *Luria Bertani* estéril (200 $\mu\text{l/L}$) a 37 °C durante dos semanas.



Caracterización estructural de las AgNPs

Las nanopartículas se caracterizaron mediante espectroscopia UV-Vis, microscopia electrónica de transmisión (TEM) y microscopia electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) utilizando una dilución al 1 % de AgNPs suspendidas en agua desionizada (v/v). Se utilizó un Genesys 10S VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) para realizar espectroscopia UV-Vis y verificar la longitud de onda de resonancia de plasmón superficial característica (400-450 nm) de las AgNPs (Mulfinger *et al.*, 2007). Se colocaron alícuotas (40 μ L) de AgNPs dispersas en metanol (1:5) sobre 400 rejillas de cobre recubiertas de carbono, se secaron en un desecador a 25 °C durante 24 h y, a continuación, se observaron en un JEM-ARM200F-TEM a 120 kV. Para determinar la dirección cristalográfica de las facetas de las AgNPs mediante transformada rápida de Fourier (FFT), se observaron las distancias interatómicas en un JEM-ARM200F-TEM a 200 kV (HRTEM) y se analizaron con el software Garantia Microscopy Suite Digital Micrograph Software.

Cultivo de parásitos

Los tripomastigotes de las cepas de *T. cruzi* Sylvio X10/4 (Tcl) y Esmeraldo (TclI) se cultivaron en monocapas de células Vero, que se mantuvieron en medio DMEM suplementado con un 2% de suero bovino fetal [FBS] y un 1 % de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU) en condiciones controladas (37 °C, 5 % de CO₂ y humedad saturada) (Aparicio-Burgos *et al.*, 2015). Cuando los tripomastigotes empezaron a salir de las células, se recogieron los parásitos libres y se prepararon para el ensayo de toxicidad de AgNP.

Los tripomastigotes se colocaron en tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 704 \times g durante 7 min. Los sobrenadantes se desecharon y los pellets se volvieron a suspender en 1 mL de medio DMEM fresco. El número de parásitos se estimó con un hemocitómetro y se ajustó a 1×10^6 por pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos para el ensayo de toxicidad.

Ensayo de toxicidad de AgNPs para *T. cruzi in vitro*

Los tripomastigotes (1×10^6 por pocillo) se colocaron en placas de 96 pocillos (Sarstedt, EE.UU.) en medio suplementado con DMEM y se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad saturada, con diferentes dosis de AgNP (1, 5, 10 o 12 μ g/100 μ L). El ensayo se realizó por triplicado con tripomastigotes no tratados (- Ctrl) o tratados con NFMX (400 μ g/100 μ L, Lampit[®], Bayer) como controles negativo y positivo. El NFMX se preparó según lo descrito por Rolón *et al.*, 2006. Brevemente, una tableta de la presentación comercial de NFMX (120 mg) se molió en un mortero estéril y se resuspendió en 1 mL de



dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de DMSO en los medios de cultivo nunca superó el 0,3 % (v/v).

Las placas se incubaron durante 24 horas en las mismas condiciones controladas. Tras el tratamiento farmacológico, se estimó la viabilidad del parásito y de las células mediante MTS (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio, sal interna) de CellTiter 96 kit[®] Aqueous One Solution (Promega, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, por colorimetría a 490 nm de longitud de onda. Para este ensayo, los valores de densidad óptica (DO) se correlacionaron positivamente con la viabilidad celular. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) para cada biotipo de *T. cruzi* se calculó a partir de la curva dosis-respuesta (Attarde *et al.*, 2020; Barile & Hopkinson, 1993)..

Ensayos citotóxicos *in vitro* en una línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT)

Las células HaCaT (una línea celular inmortal de queratinocitos humanos no cancerosos) (2×10⁴/pocillo) se cultivaron en una placa de 96 pocillos (Sarstedt, EE.UU.) en DMEM suplementado (2 % FBS, penicilina 10.000 unidades/mL y estreptomycin 10.000 µg/mL) y AgNPs a 1, 3, 5, 10 o 12 µg/µL. Para cada experimento, las células de al menos tres pocillos se dejaron sin tratar (control). La placa se incubó durante 48 h en condiciones controladas (37 °C, 5 % de CO₂ y humedad saturada). Tras el tratamiento, se estimó la viabilidad celular mediante MTS (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetiltioxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio, sal interna) de CellTiter 96 kit[®] Aqueous One Solution (Promega, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad metabólica de las células tratadas con MTS se estimó por colorimetría a una longitud de onda de 490 nm.

Análisis estadísticos

Se utilizó ANOVA para analizar los resultados del ensayo de viabilidad *in vitro*. Las diferencias medias de todos los ensayos se evaluaron mediante la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EE.UU.).

RESULTADOS

Caracterización de AgNPs

El espectro UV-Vis del coloide de plata acuoso (Figura 1) mostró un fuerte pico a 396 nm, una banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) típica de las AgNPs. El pico de absorción estrecho y simétrico indica una distribución homogénea del tamaño de las



AgNPs. Las micrografías de las muestras de AgNP muestran nanopartículas semiesféricas acompañadas de algunas estructuras alargadas de tamaño 52 nm (Figura 2a y 2b). La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) mostró que ~80% de las partículas eran decaedros (Figura 2c) con facetas {111} (Figura 2d).

Viabilidad celular para el ensayo MTS

Los porcentajes de viabilidad de tripomastigotes para ambas cepas de *T. cruzi* mostraron una respuesta dependiente de la dosis; esta respuesta fue más evidente para la cepa Sylvio X10/4, que mostró una reducción del 50 % en la viabilidad del parásito a la dosis de 1 µg de AgNPs y una reducción del 95 % en la viabilidad a la dosis experimental más alta de 12 µg después de 24 horas de tratamiento. Sin embargo, la cepa Esmeraldo mostró una reducción del 83 % en la viabilidad a la dosis más alta (12 µg), mostrando diferencias estadísticas entre la cepa Esmeraldo y la cepa Sylvio X10/4. El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias entre el control negativo y todos los demás tratamientos, incluidas las diferentes dosis de AgNPs y el control positivo (NFMX) (Figura 3).

Estimación IC₅₀

Las AgNPs no mostraron toxicidad diferente entre las IC₅₀ de las cepas estudiadas de *T. cruzi*. Las IC₅₀ para tripomastigotes de las cepas Sylvio X10/4 y Esmeraldo fueron de 4,05 y 6,16 µg/mL, respectivamente (Figura 4).

Células HaCaT tratadas con AgNPs

La viabilidad de las células HaCaT se evaluó 48 h después del tratamiento (Figura 5). La toxicidad de las AgNP en las células HaCaT se evaluó mediante MTS a diferentes concentraciones: 1, 3, 5, 10 o 12 µg/100 µL, que dieron como resultado un IC₅₀ de 10 µg/mL (P<0,05), lo que indica que las AgNPs eran aproximadamente 2 veces menos tóxicas para las células HaCaT que los tripomastigotes. Los resultados mostraron que las AgNPs no eran citotóxicas a la dosis efectiva (valores IC₅₀ = 4,05 y 6,16 µg/mL) contra las cepas TcI y TcII de *T. cruzi*.

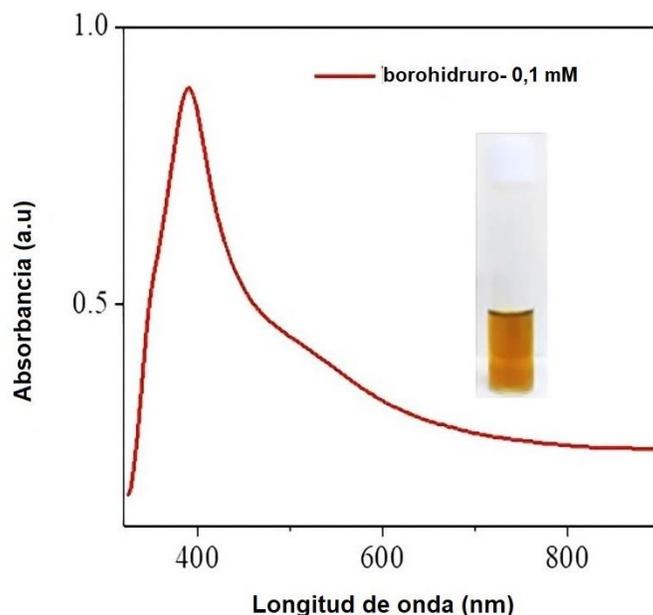


Figura 1. Caracterización de las AgNPs mediante espectroscopia UV-Vis. Espectros de absorbancia de las AgNPs ($\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}$). La figura insertada muestra la fotografía del coloide de nanopartículas de plata.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad transmitida por vectores y causada por *T. cruzi*, un parásito hemoflagelado que suele provocar cardiopatías debilitantes y mortales. BNZ y NFMX son los únicos fármacos disponibles aprobados para el tratamiento médico (Chaves *et al.*, 2017; Toledo *et al.*, 2004). Sin embargo, estos fármacos inducen duros efectos secundarios que impiden a los pacientes concluir el tratamiento. En muchos casos, *T. cruzi* es resistente a estos fármacos, por lo que son incapaces de eliminar el parásito de los tejidos infectados (Colantino *et al.*, 2016; Toledo *et al.*, 2004). Por lo tanto, los programas de salud pública requieren el desarrollo de fármacos terapéuticos más eficaces y menos tóxicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen efectos antimicrobianos no solo contra hongos (Soliman *et al.*, 2018; Mousavi *et al.*, 2015), bacterias Gram-positivas (Adibhesami *et al.*, 2017) y Gram-negativas (Pal *et al.*, 2007), pero también contra protozoos como Apicomplexa (*Toxoplasma gondii*) (Adeyemi *et al.*, 2017) y Trypanosomatida (*Leishmania tropica* y *Leishmania infantum*) (Baiocco *et al.*, 2011). Aquí informamos de los efectos tripanolíticos *in vitro* de las AgNPs contra dos cepas diferentes de *T. cruzi*.



Para este estudio, produjimos AgNPs semiesféricas y decaédricas con un diámetro medio de 52 nm (Figuras 1 y 2), y las utilizamos a 5 dosis diferentes (1, 3, 5, 10 o 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para probar la toxicidad en células HaCaT y la actividad tripanolítica en tripomastigotes producidos en co-cultivo con monocapas de células Vero. Encontramos que las nanopartículas de plata reducen significativamente la viabilidad celular de una manera dependiente de la dosis en células HaCaT. Esta observación está de acuerdo con otros estudios ([Chen *et al.*, 2019](#); [Perde-Schrepler *et al.*, 2019](#)). Es importante destacar que las AgNPs no son citotóxicas a dosis eficaces contra las cepas de *T. cruzi*, y la toxicidad de las AgNPs sobre los tripomastigotes se evaluó indirectamente mediante un ensayo de proliferación MTS, que mostró un efecto negativo de las AgNPs sobre la viabilidad de los tripomastigotes. La figura 3 muestra que las nanopartículas redujeron significativamente la viabilidad celular en comparación con el control negativo, y que las AgNPs tuvieron un poder tripanolítico similar al NFMX a diferentes dosis. Aunque no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de *T. cruzi* con diferentes dosis de AgNPs, se observó una tendencia dependiente de la dosis en la viabilidad. Estos datos sugieren que las dosis más altas de AgNPs pueden tener efectos adicionales sobre la viabilidad de los tripomastigotes de *T. cruzi*. Curiosamente, una dosis relativamente baja (12 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) de AgNPs mató hasta el 96,3 % (con un $\text{IC}_{50} = 4,05 - 6,16 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) de tripomastigotes *in vitro*, mientras que NFMX (400 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) mató sólo el 70 % (Figuras 3 y 4). Esto también sugiere que las AgNPs podrían ser un agente tripanolítico *in vitro* más eficiente que el NFMX, como se observó en el presente estudio, pero también en comparación con las nanopartículas de BNZ (con un $\text{IC}_{50} = 36 \mu\text{g}/\text{mL}$) ([Scalise *et al.*, 2016](#)).

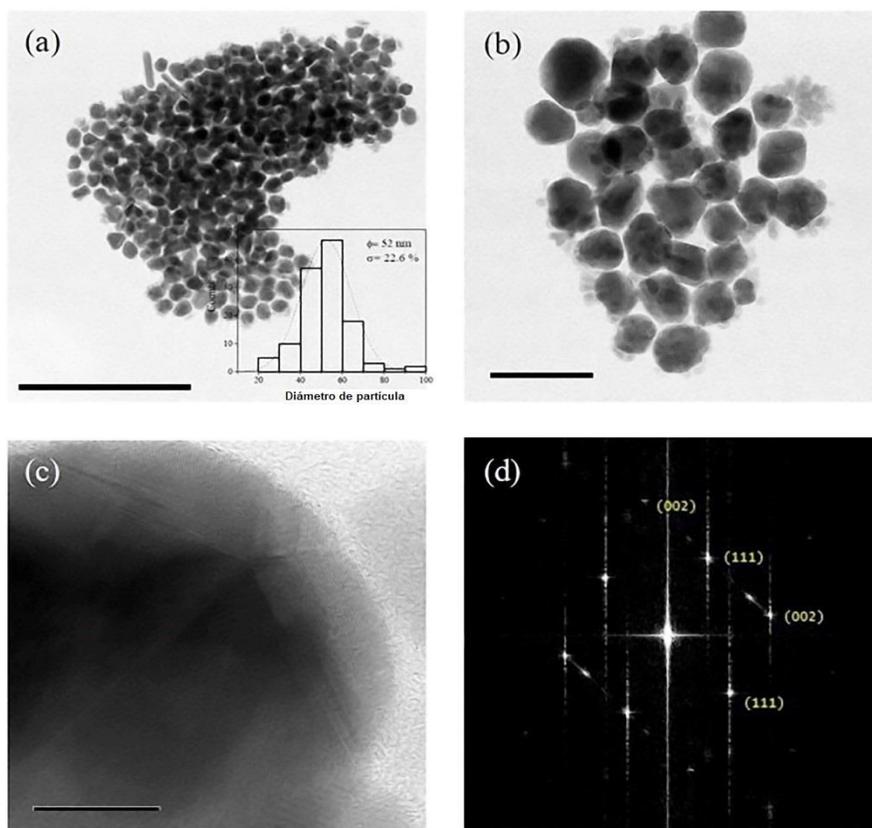


Figura 2. Las micrografías muestran las nanopartículas de plata producidas cuando se utilizó borohidruro como agente reductor a una concentración de 0,1 mM. (a) Imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de nanopartículas de plata con un diámetro medio de 52 nm; (b) las partículas son en su mayoría semiesféricas, y también se observan algunas estructuras alargadas; (c) la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) mostró partículas decaédricas y (d) la transformada rápida de Fourier (FFT) mostró facetas {111} y {002}.

T. cruzi ya ha desarrollado cierta resistencia a BNZ y NFMX, los únicos fármacos aprobados clínicamente contra la enfermedad de Chagas (Mejia *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2000). Diferentes biotipos de *T. cruzi* tienen resistencia diferencial a BNZ. Las cepas TcI de *T. cruzi* son más resistentes a BNZ, mientras que las cepas TcII son más sensibles a este fármaco (Toledo *et al.*, 2004; Mejia *et al.*, 2012). Aquí, no encontramos diferencias en la sensibilidad a las AgNPs entre las dos cepas de *T. cruzi* analizadas (Sylvio X10/4 y Esmeraldo) pertenecientes a diferentes biotipos (TcI y TcII, respectivamente). Aunque son necesarios más estudios, nuestros datos relativos al amplio espectro de actividad antiparasitaria de las AgNPs sugieren que las nanopartículas podrían ser una opción interesante para resolver el problema de la resistencia del parásito a otros fármacos, ya sea utilizadas como fármaco alternativo o en combinación con los actualmente en uso.

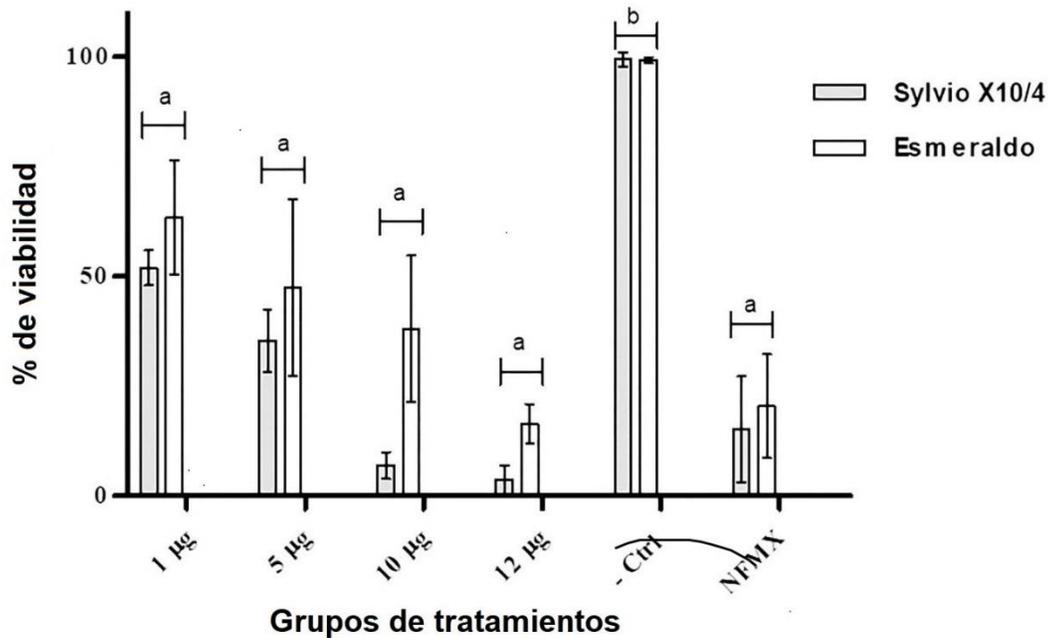


Figura 3. Supervivencia de *T. cruzi* tras el tratamiento con cualquiera de las tres dosis diferentes de AgNPs (1, 5, 10, 12 µg/100 µl), Nifurtimox (NFMX, 400 µg/100 µl) o sin tratamiento (-Ctrl, utilizado como control negativo para el ensayo de viabilidad MTS). Las muestras se evaluaron tras 24 horas de tratamiento. Cada barra representa el valor medio de absorbancia ± DE. Las diferencias ($P < 0,05$) entre grupos, según la prueba de Tukey, se indican con caracteres encima de las barras de tratamiento

Otros estudios deberían abordar los efectos de las AgNP como fármacos alternativos contra *T. cruzi*, especialmente para comprender si estas nanopartículas pueden ejercer un efecto perjudicial sobre los amastigotes, la fase de desarrollo intracelular del parásito en los mamíferos. Se ha informado de que los amastigotes de *Leishmania tropica* son más sensibles a las AgNP que los promastigotes a una dosis de 10 µg/0,1 mL (Allahverdiyev *et al.*, 2011). Si esa hipótesis se mantiene para *T. cruzi*, el uso de AgNPs *in vivo* para uso terapéutico contra la enfermedad de Chagas se convertiría en un interesante tema de estudio.

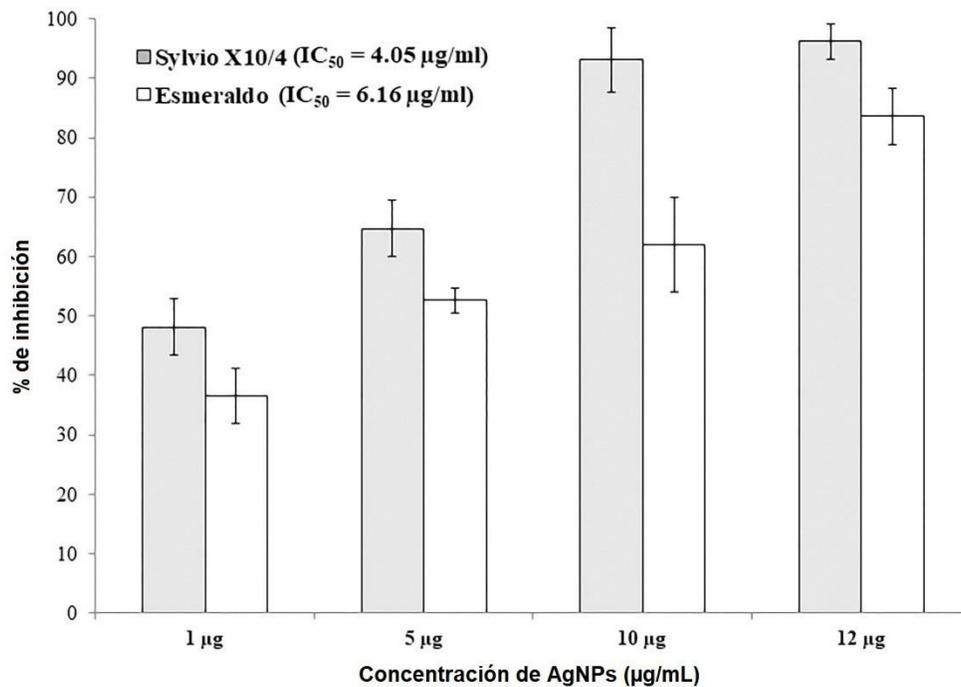


Figura 4. Inhibición de *T. cruzi* tras 24 horas de tratamiento con AgNPs Inhibición de *T. cruzi* tras 24 horas de tratamiento con AgNPs (1, 5, 10, 12 µg/100 µl). Cada barra representa el valor medio de absorbancia ± desviación estándar (n=6). Dentro del mismo punto temporal, las diferencias estadísticas (P < 0,05) entre grupos se muestran con caracteres diferentes encima de las barras según la prueba de Tukey

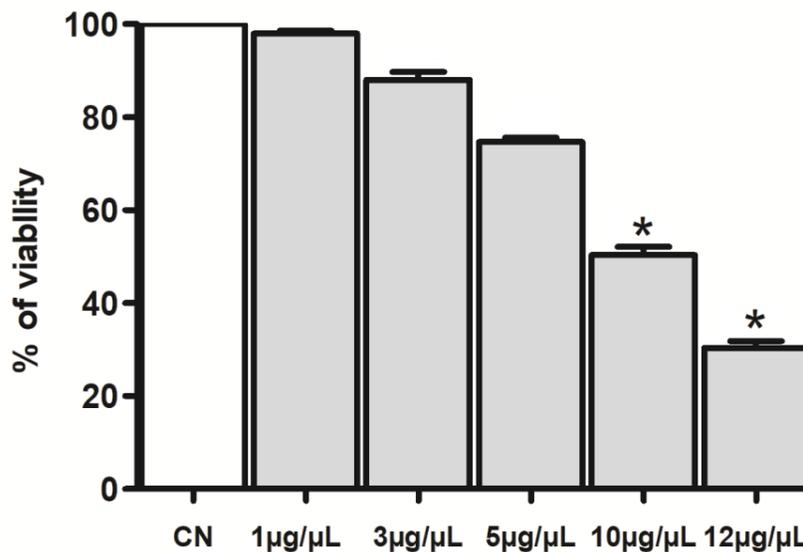


Figura 5. Viabilidad de las células HaCaT La viabilidad de las células HaCaT se examinó mediante el ensayo MTS. Las células HaCaT se estimularon con diversas dosis de AgNPs (1, 3, 5, 10, 12 µg/100 µl) durante 24 horas. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control (CN) (P < 0,05)



Las AgNPs poseen propiedades físicas y electrónicas únicas, que las convierten en excelentes candidatas para aplicaciones médicas. El mecanismo antimicrobiano de las AgNPs parece estar relacionado con la formación de radicales libres que dañan la membrana de los microorganismos (Kim *et al.*, 2007). Estas propiedades dependen del tamaño, la forma y el recubrimiento de las nanopartículas (Dubey *et al.*, 2015). En el presente estudio, sintetizamos AgNPs con un diámetro medio de 52 nm; la mayoría de ellas eran semiesféricas (decaédricas), tenían facetas {111} y {110}, y presentaban una actividad tripanolítica aceptable. Sin embargo, creemos que la actividad tripanolítica de las AgNPs podría mejorarse, si la forma y el tamaño de las nanopartículas se ajustaran a triángulos con un tamaño de 1-10 nm. Este tipo de nanopartículas muestra una mayor actividad antibacteriana que las AgNPs más grandes con forma semiesférica, debido a la mayor densidad en las facetas {111}. Esto permite a las nanopartículas triangulares permeabilizar libremente la membrana plasmática e inducir así más daños a los microorganismos. Además, las AgNPs triangulares truncadas requieren dosis más bajas (1-10 µg/0,1 µL) para ejercer propiedades bactericidas que las AgNPs esféricas y nanorodales de mayor tamaño (12,5 y 50-100 µg/0,1 µL, respectivamente) (Ge *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2015; Morones *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Una dosis de 12 µg/100 µL de AgNPs con un diámetro medio de 52 nm resultó citotóxica para los tripomastigotes de los biotipos TcI y TcII de *T. cruzi in vitro*. Futuros estudios ensayarán AgNPs de forma triangular con facetas {111} para mejorar los efectos antiprotozoarios de las AgNPs sobre diferentes biotipos de *T. cruzi*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos. Este trabajo fue apoyado por las siguientes subvenciones: UAEH-PTC-714, DSA/103.5/15/10450; UAEH-PTC-673, DSA/103.5/15/7001 y Proyecto para la integración de redes temáticas de colaboración académica 2015 "La nanotecnología como herramienta para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas" del cuerpo académico UAEM-CA-2015 de la Secretaría de Educación Pública, México.



LITERATURA CITADA

ADEYEMI OS, Murata Y, Sugi T, Kato K. 2017. Inorganic nanoparticles kill *Toxoplasma gondii* via changes in redox status and mitochondrial membrane potential. *International Journal of Nanomedicine*. 12: 1647–1661. ISSN: 1176-9114.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S122178>

ADIBHESAMI M, Ahmadi M, Farshid AA, Sarrafzadeh-Rezaei F, Dalir-Naghadeh B. 2017. Effects of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* contaminated open wounds healing in mice: An experimental study. *Veterinary Research Forum*. 8(1): 23-28. ISSN: 2008-8140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5413307/>

ALLAHVERDIYEV AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, Rafailovich M. 2011. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International Journal of Nanomedicine*. 6:2705. ISSN: 1176-9114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S23883>

APARICIO-BURGOS JE, Zepeda-Escobar, JA, de Oca-Jimenez, RM, Estrada-Franco, JG, Barbabosa-Pliego, A, Ochoa-García, L, Alexandre-Aguilar R, Rivas N, Peñuelas-Rivas, G, Val-Arreola M, Shivali Gupta, Salazar-García F, Garg NJ, Vázquez-Chagoyán JC. 2015. Immune protection against *Trypanosoma cruzi* induced by TcVac4 in a canine model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9(4): e0003625. ISSN: 1935-2735. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003625>

ATTARDE SS, Pandit, SV. 2020. Anticancer potential of nanogold conjugated toxin GNP-NN-32 from *Naja naja* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 26. ISSN: 1678-9199. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0047>

BAIOCCO P, Ilari, A, Ceci, P, Orsini, S, Gramiccia, M, Muccio TD, Colotti G. 2011. Inhibitory effect of silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2(3): 230-233. ISSN: 1948-5875. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ml1002629>

BARILE FA, Arjun, S, Hopkinson, D. 1993. *In vitro* cytotoxicity testing: biological and statistical significance. *Toxicology In Vitro*. 7(2):111-116. ISSN: 0887-2333. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(93\)90120-T](https://doi.org/10.1016/0887-2333(93)90120-T)

BRITO TK, Viana, RLS, Moreno, CJG, da Silva Barbosa, J, de Sousa, JFL, de Medeiros, MJC, Rocha, HAO. 2020. Synthesis of silver nanoparticle employing corn cob xylan as a reducing agent with anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *International Journal of Nanomedicine*. 15: 965-979. ISSN: 1176-9114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S216386>



CHAVES GC, Arrieche MAS, Rode J, Mechali D, Reis, PO, Stobbaerts, A, Girón AE, Nora, RI. 2017. Estimating demand for anti-Chagas drugs: a contribution for access in Latin America/Estimacion de la demanda de medicamentos antichagasicos: una contribucion para el acceso en America Latina/Estimativa da demanda de medicamentos antichagasicos: uma contribuicao para o acesso na America Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 41(8):1-8. ISSN: 1680 5348. <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2017.v41/e45/es>

CHEN L, Wu, M, Jiang, S, Zhang, Y, Li, R, Yongbo L, Lin L, Gang W, Ying L, Liming X, Liming X. 2019. Skin toxicity assessment of silver nanoparticles in a 3D epidermal model compared to 2D keratinocytes. *International Journal of Nanomedicine*. 14:9707-9719. ISSN: 1176-9114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S225451>

COLANTONIO LD, Prado N, Segura EL, Sosa ES. 2016. Electrocardiographic abnormalities and treatment with benznidazole among children with chronic infection by *Trypanosoma cruzi*: a retrospective cohort study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10(5): e0004651. ISSN: 1935-2735. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004651>

DANKOVICH TA, Gray DG. 2011. Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. *Environmental Science & Technology*. 45(5): 1992-1998. ISSN: 1520-5851. <https://doi.org/10.1021/es103302t>

DUBAS ST, Kumlangdudsana P, Potiyaraj P. 2006. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 289(1-3): 105-109. ISSN: 0927-7757. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.04.012>

DUBEY P, Matai, I, Kumar, SU, Sachdev, A, Bhushan, B, Gopinath P. 2015. Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials. *Advances in Colloid and Interface Science*. 221: 4-21. ISSN: 0001-8686. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.007>

EL-SAYED NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger GS, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309(5733): 409-415. ISSN: 00368075. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>

GE L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MMQ. 2014. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*. 9: 2399-2407. ISSN: 1176-9114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S55015>



- IBÁÑEZ-CERVANTES G, León-García G, Castro-Escarpulli G, Mancilla-Ramírez J, Victoria-Acosta G, Cureño-Díaz MA, Sosa-Hernández O, Bello-López JM. 2018. Evolution of incidence and geographical distribution of Chagas disease in Mexico during a decade (2007–2016). *Epidemiology & Infection*. 147:1-7. ISSN: 1469-4409. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002984>
- JAMES TN, Rossi MA, Yamamoto S. 2005. Postmortem studies of the intertruncal plexus and cardiac conduction system from patients with Chagas disease who died suddenly. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 47(4): 258-275. ISSN: 0033-0620. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2005.01.003>
- KIM JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 3(1): 95-101. ISSN: 1549-9634. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- KOKURA S, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshikawa, T. 2010. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6(4): 570-574. ISSN: 1549-9634. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.12.002>
- LEE KS, El-Sayed MA. 2006. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *Journal of Physical Chemistry B*. 110(39): 19220-19225. ISSN: 1520-5207. <https://doi.org/10.1021/jp062536y>
- MAO BH, Tsai JC, Chen CW, Yan SJ, Wang YJ. 2016. Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology*. 10(8): 1021-1040. ISSN: 1743-5404. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1189614>
- MEJIA AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, Kelly JM. 2012. Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *The Journal of Infectious Diseases*. 206(2): 220-228. ISSN: 1537-6613. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis331>
- MOLINA J, Martins-Filho, O, Brener, Z, Romanha, AJ, Loebenberg, D, Urbina, JA. 2000. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(1): 150-155. ISSN: 1098-6596. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.150-155.2000>
- MORONES JR, Elechiguerra, JL, Camacho, A, Holt, K, Kouri, JB, Ramírez, JT, Yacaman, JM. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16(10): 2346. ISSN: 09574484. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>



MOUSAVI SAA, Salari, S, Hadizadeh, S. 2015. Evaluation of antifungal effect of silver nanoparticles against *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporium gypseum*. *Iran Journal of Biotechnology*. 13(4): 38-42. ISSN: 1728-3043. <https://doi.org/10.15171/ijb.1302>

MULFINGER L, Solomon, SD, Bahadory, M, Jeyarajasingam, AV, Rutkowsky, SA, Boritz, C. 2007. Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education*. 84(2): 322. ISSN: 00219584. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>

PAL S, Tak, YK, Song, JM. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(6):1712-1720. ISSN: 1098-5336. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

PERDE-SCHREPLER M, Florea A, Brie I, Virag P, Fischer-Fodor E, Vâlcan A, Gurzău E, Lisencu C, Maniu A. 2019. Size-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in cochlear cells *in vitro*. *Journal of Nanomaterials*. e6090259. ISSN: 1687-4129. <https://doi.org/10.1155/2019/6090259>

ROLÓN M, Vega C, Escario JA, Gómez BA. 2006. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*. 99(2): 103-107. ISSN: 1432-1955. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>

SCALISE ML, Arrúa EC, Rial MS, Esteva MI, Salomon CJ, Fichera LE. 2016. Promising efficacy of benzimidazole nanoparticles in acute *Trypanosoma cruzi* murine model: in-vitro and in-vivo studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 95(2): 388-393. ISSN: 0002-9637. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0889>

SOLIMAN H, Elsayed A, Dyaa A. 2018. Antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesised by *Rhodotorula* sp. strain ATL72. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(3): 228-233. ISSN: 2314-808X. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.05.005>

SUN Y, Xia Y. 2002. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*. 298(5601): 2176-2179. ISSN: 00368075. <https://doi.org/10.1126/science.1077229>

TOLEDO MJO, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GLL, Alves CF, Martins HR, Cruz RE, Tafuri WL, Lana M. 2004. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53(6):1045-1053. ISSN: 03057453. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh224>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>