



Magíster en Ciencias  
Mención Radicales Libres  
en Biomedicina

# EL PAPEL DE LA INTERACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES Y NANOPARTÍCULAS EN EL SISTEMA INMUNE INNATO

## Revisión Narrativa

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias, mención Radicales

Libres en Biomedicina

**Javier Ignacio Cortés Alarcón**

Directora de tesis

**Ph.D. Paola Murgas Alcaíno**

Co-director de tesis

**Ph.D. Manuel Ahumada Escandón**

**2020**

Valparaíso – Chile

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO .....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	6
RESUMEN.....	11
ABSTRACT .....	13
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	15
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA .....	20
CAPÍTULO III: DESARROLLO.....	24
3.1. Nanopartículas .....	24
3.1.1. Métodos de síntesis de NPs .....	25
3.1.2. Propiedades físico-químicas de las NPs y su clasificación.....	28
3.1.3. Nanopartículas metálicas.....	31
3.2. Sistema Inmune Innato.....	35
3.2.1. Componentes celulares del Sistema Inmune Innato .....	36
3.2.2. Neutrófilos .....	39
3.2.3 Macrófagos.....	43
3.2.4 Células Dendríticas.....	51
3.3 Radicales Libres y Especies Reactivas del Oxígeno .....	52
3.4 Sistema de Defensa Antioxidante Enzimático .....	60
3.5 Estrés Oxidativo: mecanismo de toxicidad en sistemas biológicos por acción de NPMs .....	62
3.6 Mecanismos de interacción de las células del sistema inmune innato con las NPMs.....	66
3.7 Estrés Oxidativo: mecanismo de toxicidad en macrófagos por acción de NPMs	72
CAPÍTULO IV: CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES .....	82
CAPÍTULO V: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

## **AGRADECIMIENTOS**

En este presente quisiera agradecer en primera instancia a mi universidad, por haberme acogido y permitido formarme en ella, gracias a todos quienes participaron de este largo y satisfactorio proceso, ya sea de manera directa o indirecta, gracias a cada uno de ustedes ya que cada pequeño aporte se ve reflejado en lo que hoy representa mi segundo paso por esta universidad. Quiero agradecer a mis padres, familiares y personas importantes de mi vida, que me han brindado el mayor apoyo y motivación durante estos años, pues no ha sido un camino fácil.

Agradecimientos especiales a mis docentes y formadores de la UV:

A la profesora Marilyn Paz por ser siempre atenta conmigo y una excelente coordinadora de magister. Al profesor Carlos Jara por su paciencia y enseñanza. A los profesores Juan Villena y Mario Párraga, siempre cordiales y llenos de conocimiento. A Camila Escobar que siempre me ayudó con el cultivo de mis células sin importar la situación que le plantease. A Claudio Córdova, del laboratorio en Hontaneda, quién desde el primer minuto mostró una voluntad y ganas de ayudarme con mi proyecto de tesis como si nos hubiéramos conocido de toda la vida.

Ahora mis agradecimientos se trasladan a la capital. Agradecer a los chicos del CNAP de la Universidad Mayor por su apoyo. Me refiero a Esteban, Fernando, Juanito y Gabriel, con quiénes he forjado buenas amistades en muy poco tiempo.

Mención especial a María Concepción, que aún no he tenido el agrado de conocer en persona, pero que al igual que Claudio, estuvo siempre disponible para ayudarme en la elaboración de las imágenes de este estudio.

Ya casi finalizando, pero no por ello menos importantes, agradecer a mis dos tutores de proyecto de tesis. Me refiero a la Dra. Paola Murgas y al Dr. Manuel Ahumada, quiénes me han guiado durante este último tiempo. Dos personas valiosísimas. Personas con las cuales he aprendido muchísimo y de las que doy gracias a la vida por habérmelas puesto en frente. Personas con las cuales he tenido el agrado de trabajar a su lado. Espero que el contacto no se pierda.

Finalmente, agradecer a los proyectos de financiamiento que hicieron posible esta investigación: Proyecto FONDECYT 11190258 de la Dra. Paola Murgas y Proyecto FONDECYT 11180616 del Dr. Manuel Ahumada.

A todas y todos ustedes, y disculpándome si es que he olvidado a alguien, les extiendo mis más sinceros agradecimientos.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de estudios seleccionados por año .....	21
Figura 2. Número de estudios clasificados por Índice SCImago Journal Rank.....	22
Figura 3. Número de estudios clasificados por Factor de Impacto. ....	22
Figura 4. Integración a nanoescala de nanopartículas y biomoléculas.....	24
Figura 5. Síntesis de nanofabricación de “arriba hacia abajo” y de “abajo hacia arriba” ...	26
Figura 6. Representación esquemática de tipos de nanopartículas .....	31
Figura 7. Diferentes aplicaciones de las nanopartículas de oro en diagnóstico y terapia en clínica. ....	34
Figura 8. Componentes celulares del sistema inmunológico en mamíferos .....	39
Figura 9. Reclutamiento de células inmunes innatas y generación de EROs en sitios inflamatorios .....	42
Figura 10. Proceso de fagocitosis mediado por macrófagos.....	49
Figura 11. Mecanismos de generación de EROs por macrófagos .....	50
Figura 12. Presentación de antígenos por células dendríticas a linfocitos T .....	52
Figura 13. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO). ....	53
Figura 14. Componentes del sistema NADPH oxidasa en estados de reposo y activación celular .....	56
Figura 15. Rutas de acción de ERO sobre las biomoléculas celulares.....	57
Figura 16. Principales enzimas antioxidantes y sus sustratos.....	61
Figura 17. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.....	63
Figura 18. Mecanismos bactericidas de las AgNP .....	65
Figura 19. Formación de la “corona” proteica en la superficie de las nanopartículas .....	68
Figura 20. Receptores de superficie de macrófagos: posibles responsables del reconocimiento de las nanopartículas.....	69
Figura 21. Modelo de los mecanismos endocíticos y de transporte intracelular .....	71
Figura 22. Mecanismo de toxicidad dependiente de estrés oxidativo inducido por nanopartículas metálicas sobre fagocitos .....	80

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

4-HNE: 4-hidroxinonenal

8-oxo-dG: 8-Oxo-2'-desoxiguanosina

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ag: plata

AgNP: nanopartícula de plata

ATP: adenosin tri fosfato

Au: oro

AuNP: nanopartícula de oro

Bax: proteína 4 similar a bcl-2

Bcl-2: linfoma de células B-2

CAT: catalasa

CD: célula dendrítica

CPA: células presentadoras de antígeno

Cu: cobre

CuNP: nanopartícula de cobre

CuInSe<sub>2</sub>: Selenurio de indio-cobre

CVD: depósito químico en fase vapor

DAMP: patrones moleculares asociados a daño

EO: estrés oxidativo

ERO: especie reactiva de oxígeno

ERN: especie reactiva de nitrógeno

Fe: hierro

Fe<sup>2+</sup>: ión ferroso

fMLP: péptido formil metionina-leucina-fenilalanina

GPX: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

HOCl: ácido hipocloroso

Ig: inmunoglobulina

IGF-1: factor de crecimiento semejante a insulina 1

IL: interleucina

INF- $\gamma$ : interferón gamma

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

LDLox: lipoproteína de baja densidad oxidada

LPS: lipopolisacárido

MDA: malondialdehido

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

mm: milímetro

Mn: manganeso

MPO: mieloperoxidasa

$\mu$ m: micrómetro

NET: trampa extracelular de neutrófilos

NF- $\kappa$ B: factor nuclear kappa B

nm: nanómetro

NO $\cdot$ : óxido nítrico

NOX: NADPH oxidasa



NP: nanopartícula

NPM: nanopartícula metálica

O<sub>2</sub>: oxígeno molecular

O<sub>2</sub><sup>·-</sup>: anión superóxido

·OH: radical hidroxilo

ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PEG: polietilenglicol

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PS: fosfatidilserina

RL: radical libre

ROO.: radical peroxilo

Si: silicio

SMF: sistema mononuclear fagocítico

SOD: superóxido dismutasa

SR: receptor scavenger

TCR: receptor de linfocitos T

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta

Th1: linfocito T helper

TiO<sub>2</sub>: dióxido de titanio

TLR: receptores de tipo toll

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

ZnO: óxido de zinc

## RESUMEN

El uso de nanomateriales, en particular las nanopartículas metálicas (NPMs), ha ido en aumento durante la última década gracias a sus propiedades únicas para el uso en medicina y tecnología aplicada. Sin embargo, los cambios en las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las NPMs, producto de la interacción con sistemas biológicos tales como la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), pueden producir toxicidades asociadas a NPMs, las cuales han sido reportadas cada vez con mayor frecuencia. El estrés oxidativo (EO) puede ser inducido por las respuestas celulares, particularmente, la activación de las células inmunitarias innatas como son células fagocíticas, en especial los macrófagos, también son responsables del daño mediado por ERO, dado que es uno de los mecanismos que utilizan para eliminar elementos ajenos y potencialmente dañinos al organismo. Mientras que también puede promoverse por las NPMs, debiéndose a factores acelulares como el tamaño, la superficie de las partículas y la presencia de metales.

Dado que en literatura son escasos los estudios que relacionan a estos tres elementos (EROs, NPMs y sistema inmune innato), en esta revisión narrativa se analizó la interacción entre NPMs y las células inmunes innatas desde un punto de vista del EO, lo que implica a su vez los efectos que genera esta interacción en términos de disfunción mitocondrial, afectación de la función fagocítica,

lesión a biomoléculas e incluso la apoptosis o la muerte de la población celular, buscando aportar información sobre los efectos que provocan en el organismo la utilización de NPMs.

Se establece que estos sistemas analizados individualmente causan cierto grado de afección, sin embargo, es cuando actúan sinérgicamente que se observa un desbalance oxidativo capaz de generar alteraciones de tipo clínicas, contribuyendo a generar fisiopatologías indeseables tales como genotoxicidad e inflamación, carcinogénesis, afecciones respiratorias, cardíacas, óseas, etc; además del desarrollo temprano de envejecimiento y de enfermedades relacionadas con la edad. Con esto se espera que esta investigación sirva de punto de inflexión para el desarrollo de nuevos estudios, y así generar conocimiento y soluciones que minimicen el impacto negativo relacionado con el empleo de estos nanomateriales en biomedicina.

Palabras clave: especies reactivas de oxígeno, radicales libres, sistema immune, macrófagos, nanopartículas metálicas

## ABSTRACT

Nanomaterials, particularly metal nanoparticles (MNP), have been on the rise over the last decade thanks to their unique properties for applications in medicine and other technologies. However, changes in the structural and physicochemical properties of MNPs resulting from their interaction with biological systems, such as the generation of reactive oxygen species (ROS), can produce toxicities associated with MNPs, which have been reported frequently over the last years. The oxidative stress (OS) induced by MNPs can be induced by cellular responses, particularly the activation of innate immune cells such as phagocytic cells (especially macrophages) are also responsible for the damage mediated by ROS since it is one of the mechanisms they use to eliminate foreign and potentially harmful elements to the organism. As well, MNPs can promote OS due to acellular factors such as size, the surface of the particles, and the presence of metals.

As the literature related to these three combined elements (ROS, MNP, and the innate immune system) is scarce, in this narrative review, the interaction between MNPs and innate immune cells was analyzed from an OS point of view. In turn, this implies the effects generated by this interaction in terms of mitochondrial dysfunction, phagocytic function impairment, injury to biomolecules, and even apoptosis or death of the cell population.

It is established that these systems, individually analyzed, can promote a partial degree of affliction. However, when they act synergistically, it is possible to observe an oxidative unbalance capable of generating clinical type alterations, contributing to generating undesirable's physiopathology, such as genotoxicity and inflammation, carcinogenesis, respiratory, cardiac, and bone affections, among others. Moreover, it can promote premature aging and diseases related to aging. Therefore, this work is an inflection point to develop new research studies that can prompt new knowledge and solutions that minimize any possible negative impact of nanomaterials' employment in biomedicine.

Keywords: reactive oxygen species, free radicals, immune system, macrophages, metallic nanoparticles

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Durante siglos, los seres humanos han buscado curas para poner fin a enfermedades y lesiones. Es así como en la búsqueda de nuevas tecnologías que permitieran dar solución a este tipo de problemáticas, surge a finales de la década de los 60 una nueva área de estudio para el sector de la ciencia, la nanotecnología. Pero no será hasta 20 años más tarde, cuando esta disciplina se comenzará a entender y a utilizar de una manera científica (Boisseau & Loubaton, 2011). Dadas las ventajas que supone trabajar a escalas nanométricas, la nanotecnología presume un avance enorme para los científicos y sus investigaciones. Gracias a ella, son capaces de crear materiales, aparatos y sistemas con características únicas. En el campo de la medicina es donde ha tenido su mayor auge (Bayda et al., 2020). Las herramientas que ha proporcionado la nanotecnología están produciendo grandes avances en el sector, por lo que muchos investigadores creen que el dominio de esta disciplina puede ser el primer gran paso de la humanidad para poder dar respuesta a enfermedades que parecen no tener cura (Freitas, R., 1999).

La nanotecnología, definida como la manipulación de la materia a escala atómica y molecular, en una dimensión igual o menor a los 100 nanómetros (nm) para crear materiales con propiedades únicas, es un campo de

investigación en rápida expansión que promete revolucionar en el área medicinal, la administración de fármacos, la terapia génica, y el diagnóstico, monitoreo y control de sistemas biológicos (Rizvi & Saleh, 2018).

A raíz de esto, el uso de la nanotecnología ha ido creciendo durante la última década. Gracias a esta herramienta, la detección de diversas enfermedades como los trastornos cardiovasculares, Alzheimer, diabetes o cáncer se ha vuelto menos complejas, de manera de brindar un tratamiento más oportuno (Patra et al., 2018). La nanotecnología en medicina, también llamada nanomedicina, tiene relación con la aplicación de nanopartículas (NP). Particular interés se ha observado en el uso de nanomateriales basados en metales, también conocidos como nanopartículas metálicas (NPMs). Las NPMs representan una clase emergente de nanomateriales con propiedades únicas como su pequeño tamaño y gran área superficial. Su tamaño nanométrico les permite permear estructuras e interactuar fácilmente con las biomoléculas en la superficie y en el interior celular. Las NPMs pueden interaccionar con receptores, ácidos nucleicos, factores de transcripción y proteínas, y pueden usarse para comprender las complejas redes de señalización, los procesos de transporte que regulan el comportamiento celular y los cambios que sufren durante los procesos de enfermedad. Estas cualidades y otras, resultan ventajosas para su uso en áreas de la salud y la biomedicina (Bhardwaj & Kaushik, 2017; Dobrovolskaia et al., 2016).



Si bien el desarrollo de nuevas tecnologías ha traído consigo una mejora en la eficacia de los tratamientos, también pueden producir efectos secundarios graves para la salud, donde los beneficios no siempre superan el riesgo (McMillan et al., 2011; Rizvi & Saleh, 2018). Uno de los principales aspectos que deben cumplir las NP es ser inmunológicamente neutras una vez administradas en el organismo. Esto debido a que las células inmunitarias reconocen de forma muy eficaz patógenos y partículas extrañas al organismo, debido a su potencial dañino, generando diversas respuestas inmunitarias (fagocitosis, producción de radicales libres [RL] como especies reactivas de oxígeno [EROs] y nitrógeno [ERN], activación del complemento, producción de citoquinas, anticuerpos, etc) para llevar a cabo su destrucción. Las NP son elementos extraños al organismo y, por tanto, pueden ser reconocidas por las células del sistema inmunitario de forma semejante a como lo hacen con agentes patógenos (virus, bacterias, hongos) (Gordon, 2016; Zolnik et al., 2010).

El sistema inmune comprende un conjunto de elementos y procesos biológicos que mantienen la homeostasis, frente a agresiones externas e internas. Como se mencionó, ésta degradación está mediada, en parte, por RLs, moléculas altamente reactivas y necesarias para desempeñar funciones de defensa en el organismo (Lebre et al., 2016; Mottas et al., 2017).

Existen distintas clases de RLs dentro de los seres vivos. Las más estudiadas a nivel celular corresponden a las EROs. El término ERO hace referencia a un grupo de moléculas que contienen oxígeno con diferente reactividad química. También se han identificado las ERN y de cloro. La sobreproducción de estas especies es dañina y se conoce como estrés oxidativo (EO), un proceso de deterioro molecular y celular mediante daño oxidativo que altera las funciones celulares y que puede tener severas consecuencias para la salud. Por ejemplo, la génesis de trastornos fisiológicos y la etiopatogenia de enfermedades crónico degenerativas como hipertensión arterial, aterosclerosis, cáncer, entre otras (Nosaka & Nosaka, 2017).

Existen diversos procesos capaces de generar EROs en sistemas biológicos, incluyendo la posibilidad de producción por factores exógenos. Esto último es relevante debido a que estudios de la última década han señalado el uso de NPMs como agentes pro-oxidantes, a partir de la exacerbación en la producción de EROs y posterior generación de EO, poniendo en peligro la salud de los individuos (Ahumada et al., 2018; Dayem et al., 2017; Yin et al., 2010; W. Zhang et al., 2013).

Dado el amplio uso que se le está dando a las NPMs para aplicaciones del tipo biomédico, y su eventual interacción con sistemas biológicos, donde el sistema inmune resulta ser el primero en reconocerlas, cabe preguntarse cuál es el tipo de interacción que éstos tienen, y particularmente cómo se influenciarán uno

sobre el otro (Figueiredo Borgognoni et al., 2018). De particular interés en esta investigación narrativa es cómo esta interacción puede producir desbalances oxidativos, y si esto puede promover una exacerbación del EO en los sistemas biológicos.

Además, al ser la nanotecnología un área relativamente nueva de la ciencia, la comprensión de cómo el sistema inmune reconoce e interactúa con las NPs, sumado al rol clave que jugarían los RL en el potencial daño a las células inmunitarias y otras, resulta crucial para determinar la seguridad de éstas frente a los posibles efectos secundarios para la salud humana y ambiental (Boraschi et al., 2017).

En base a lo anterior, esta revisión se centrará en caracterizar la interacción entre NPMs, células del sistema inmune y EROs, considerando que en la actualidad aún queda mucho por investigar, pues a partir del presente siglo comienzan a surgir los primeros estudios en literatura sobre esta tecnología, por lo tanto, queda mucho por descubrir todavía. La comprensión de la interacción de los nanomateriales con el sistema inmune desde el punto de vista radicalario es fundamental para el diseño de nanomateriales no solo capaces de modular la respuesta inmune, sino también de ejercer más eficazmente su potencial terapéutico (Boraschi et al., 2017).

## **CAPÍTULO II: METODOLOGÍA**

Para la elaboración del presente trabajo, que corresponde a una revisión narrativa, se realizó la siguiente búsqueda:

### **2.1. Palabras clave para la búsqueda bibliográfica**

Se seleccionaron las siguientes palabras claves en idioma inglés: *reactive oxygen species, free radicals, immune system, macrophages, metallic nanoparticles.*

### **2.2. Tipos de artículos seleccionados**

Estudios primarios, experimentales o cuasiexperimentales, transversales, longitudinales, de cohorte, casos y controles, ensayos clínicos controlados aleatorizados. También se incluyeron reviews, revisiones sistemáticas y libros.

### **2.3. Modelos abordados en los trabajos seleccionados**

Investigaciones realizadas en modelos *in vitro* e *in vivo*.

### **2.4. Trabajos indexados**

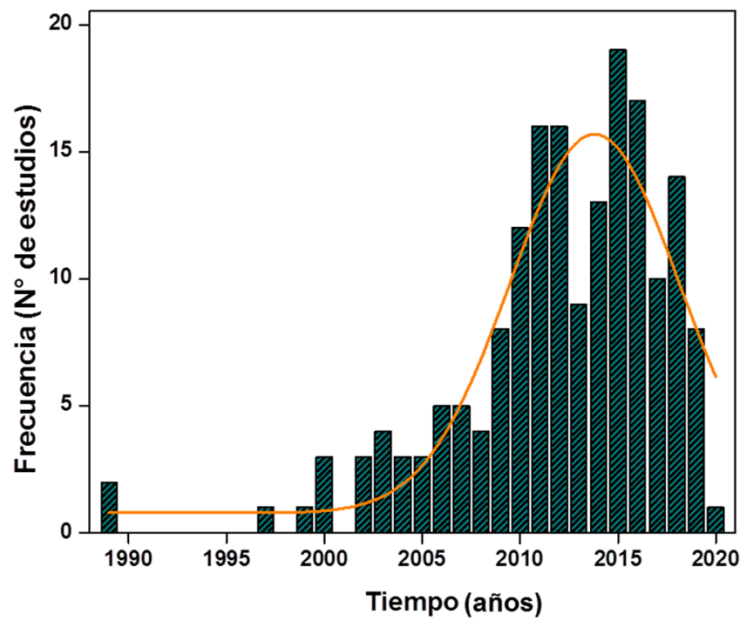
Artículos científicos indexados en base de datos certificadas internacionalmente: Web of Science, PubMed, Scopus.

## 2.5. Idioma de los artículos

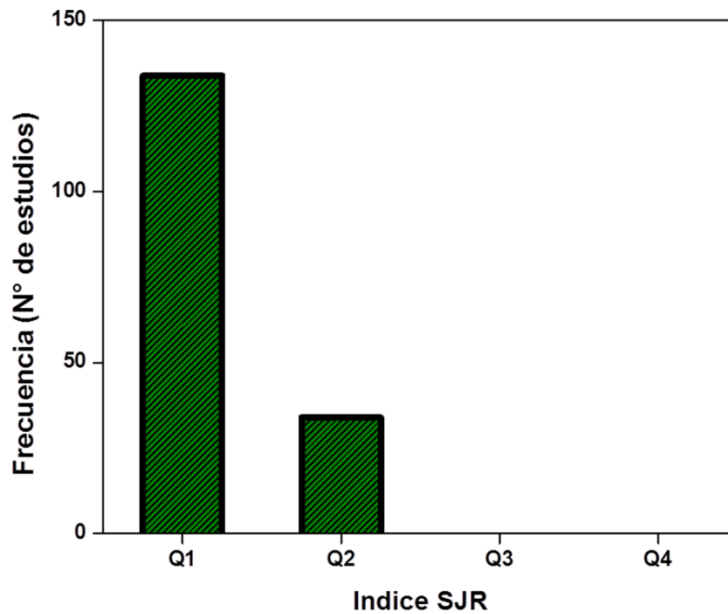
Investigaciones publicadas en inglés y español.

## 2.6. Criterios metodológicos de búsqueda

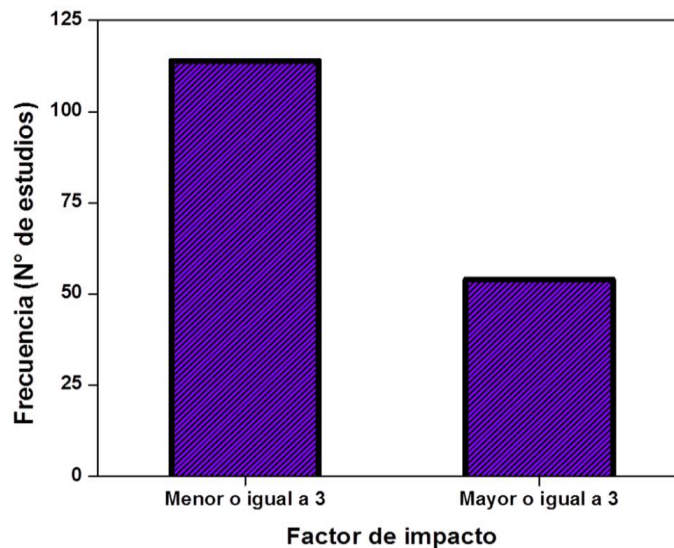
Investigaciones en revistas científicas con revisión de pares, con un Factor de Impacto  $\geq$  a 3 o con un Q1-Q2 en SJR, y de los últimos 10 años.



**Figura 1. Número de estudios seleccionados por año.** La mayor cantidad de estudios seleccionados corresponde al periodo de tiempo comprendido entre los años 2010 – 2020, donde el año 2015 se registró la mayor cantidad.



**Figura 2. Número de estudios clasificados por Índice SCImago Journal Rank (SJR).** Los estudios seleccionados pertenecen a los cuartiles Q1 y Q2, donde se registra una mayor cantidad de estudios Q1 en Índice de SJR.



**Figura 3. Número de estudios clasificados por Factor de Impacto.** De los estudios seleccionados, una mayor cantidad presenta un Factor de Impacto menor o igual a 3, mientras que una menor cantidad de los estudios seleccionados presenta un Factor de Impacto mayor o igual a 3.

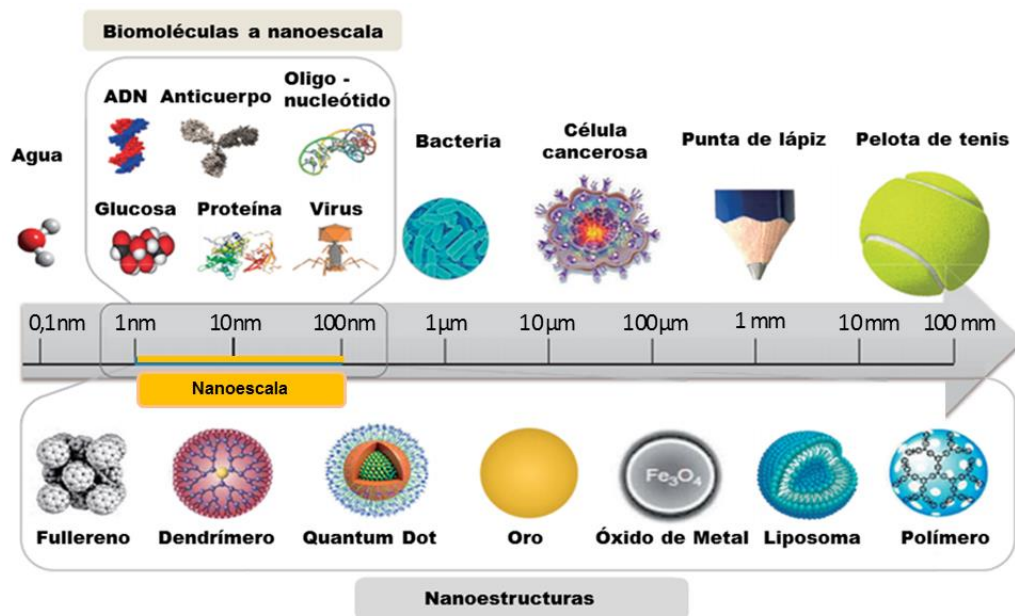
## **2.7. Identificación de estudios**

Se realizó una búsqueda en las bases de datos PubMed, Science Direct, Wiley Online Library, Web of Science, Google Scholar.

## CAPÍTULO III: DESARROLLO

### 3.1. Nanopartículas

La nanotecnología corresponde a la manipulación "controlada" de la materia y diseño de la producción de instrumentos, estructuras y materiales por el ser humano en el rango de 1 a 100 nanómetros (nm), en al menos una de sus dimensiones (Ver Figura 4) (Powers et al., 2007; Saallah & Lenggoro, 2018).

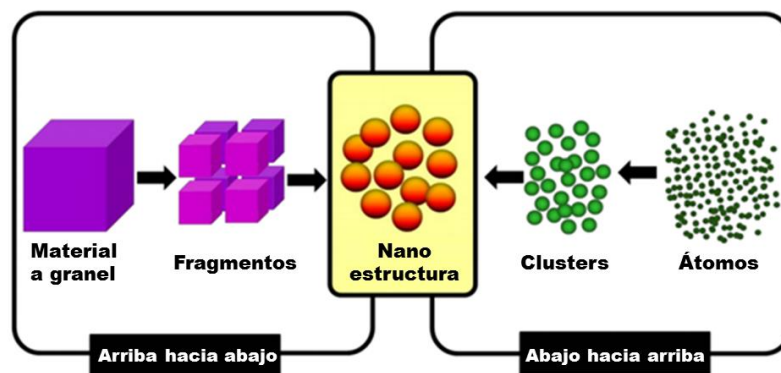


**Figura 4. Integración a nanoescala de nanopartículas y biomoléculas.** Las biomoléculas presentan dimensiones a nanoescala comparables a las dimensiones de las nanopartículas. nm, nanómetro; µm, micrómetro; mm, milímetro (Modificada de Saallah & Lenggoro, 2018).



### 3.1.1. Métodos de síntesis de NPs

Los métodos de preparación de estos materiales son variados. Sin embargo, existen dos vías principales para su síntesis, una llamada “de arriba hacia abajo” (*top-down*) y la segunda llamada “de abajo hacia arriba” (*bottom-up*) (Ver Figura 5) (A. Biswas et al., 2012). El camino “de arriba hacia abajo” produce NPs a partir de material a granel y lo reduce a un estado nanoparticulado; generalmente esto se logra utilizando láseres de alta energía, energía mecánica o energía térmica (Iqbal et al., 2012). Caminos sintéticos de “abajo hacia arriba”, en cambio, requieren el uso de átomos para preparar las NPs (Needham et al., 2016). Esto puede ocurrir a partir de fases gaseosas, líquidas y/o sólidas, así como de fuentes biológicas (Luechinger et al., 2010). En otras palabras, mientras que en un caso es necesario "desarticular el material", en el otro ensambla todos los componentes (Narayanan & Sakthivel, 2010).



**Figura 5. Síntesis de nanofabricación de “arriba hacia abajo” y de “abajo hacia arriba”.** Los métodos de síntesis de materiales nanoestructurados involucran dos estrategias diferentes comúnmente denominadas enfoques “de arriba hacia abajo” y “abajo hacia arriba”. El enfoque “de arriba hacia abajo” se basa en las sucesivas fragmentaciones o el procesamiento de materiales a escala macro a objetos de tamaño nanométrico más pequeños, mientras que el enfoque “de abajo hacia arriba” crea materiales a nanoescala a partir del ensamblaje de átomos y moléculas (Modificada de Rawat, 2015).

Dentro de los métodos más representativos que utilizan la aproximación “de arriba hacia abajo”, se encuentran:

a) La evaporación térmica, que consiste en el calentamiento hasta lograr la evaporación del material que se pretende depositar. Se lleva a cabo en una cámara de vacío en la que se condensa el vapor sobre una lámina fría requiriendo en todo momento un control preciso de las condiciones de crecimiento para no producir una modificación de la morfología de la capa depositada (Biswas et al., 2012).

b) El depósito químico en fase vapor (CVD, por sus siglas en inglés) que consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), sobre o cerca de la superficie de un sólido, para dar lugar a la formación de un material en forma de monocapa o de película de NPs (Elliott et al., 2013).

c) La preparación de clústeres gaseosos, utiliza un láser pulsado de alta potencia para producir vapores atómicos metálicos, los que son acarreados en

un gas inerte y posteriormente son depositados en un óxido monocristalino u otro sustrato, bajo condiciones de ultra-alto vacío (Arole & Munde, 2014).

Los métodos de síntesis de NPs más representativos de “abajo hacia arriba” son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Uno de los métodos más explorados es la reducción fotoquímica (Thiruvengadathan et al., 2013). En este método la síntesis de nanopartículas metálicas (NPM) es realizada por reducción de los metales en estado iónico, por acción de agentes reductores activados por luz, siendo estos generalmente RLs. De esta manera, el sistema químico por medio de las altas energías aplicadas, se asocia con la generación de reductores fuertes, altamente activos, como radicales y especies excitadas, las cuales interaccionan, por ejemplo, con un ión de plata, reduciéndolo a su estado metálico (Q. Chen et al., 2015).

Como puede constatarse, los métodos que utilizan la aproximación “de arriba hacia abajo”, requieren de instrumentación compleja y complicada, lo cual los hace costosos y que, por lo tanto, se prefieran los métodos que utilizan la aproximación “de abajo hacia arriba” (Biswas et al., 2012).

En ese sentido, las técnicas “de abajo hacia arriba” son más versátiles en cuanto a la modificación de los parámetros que definen las propiedades de los nanomateriales ya que sintetiza las NPs, ensamblando átomos y moléculas utilizando procedimientos químicos, hasta conseguir un conglomerado de moléculas de tamaño nanométrico. El método “de abajo-hacia arriba” permite

controlar el tamaño de las NPs, su uniformidad y su forma, reduciendo la cantidad de impurezas. Sin embargo, su producción a gran escala es compleja por la dificultad de controlar los fenómenos de transporte de materia y energía involucrados en los procesos de síntesis de NPs (Murphy et al., 2005).

### **3.1.2. Propiedades físico-químicas de las NPs y su clasificación**

Las NPs se caracterizan respecto a su contraparte a granel, por tener propiedades físico-químicas particulares, entre ellas ópticas, eléctricas, mecánicas, su relación superficie/volumen, y muchas más (Khan et al., 2019).

Las propiedades ópticas y eléctricas de las NPs de algunos metales, como el oro y la plata, se producen por la interacción entre los electrones de la superficie de la NP y la onda electromagnética incidente (luz natural, láser), generándose un efecto cuántico como consecuencia del cambio de la estructura electrónica inducida por el tamaño y la forma de la NP conocido como plasmón de resonancia superficial (Eustis & El-Sayed, 2006). Un acoplamiento del plasmón en la superficie de las NPs con un fotón incidente mejora una gama de fenómenos ópticos útiles, tales como la dispersión de radiación resonante, dispersión Raman, y modulación de procesos de luminiscencia. Debido a estas propiedades ópticas únicas, las nanoestructuras plasmónicas de diferentes tamaños y formas, han ganado una creciente popularidad en áreas como el

diagnóstico del cáncer, terapia fototérmica, obtención de imágenes de células vivas, detección de patógenos, biomoléculas e iones metálicos (Madden et al., 2015). A su vez, el color que adquiere una NP dependerá en ese caso, de la longitud de onda absorbida, cuya energía hace que el plasmón de la superficie de la NP vibre con la misma longitud de onda que la onda absorbida (Eustis & El-Sayed, 2006).

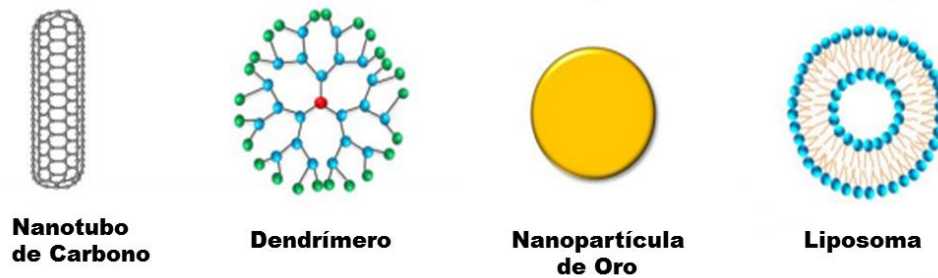
Las propiedades mecánicas de las NP cambian con el tamaño; a escala nanométrica se modifica la estructura atómica de los nanocristales, haciéndose más resistentes y adquiriendo propiedades mecánicas superiores a las de los materiales a granel. A escala nanométrica un material, incrementa su dureza y su resistencia, siguiendo, generalmente, un crecimiento inversamente proporcional a su diámetro (Khan et al., 2019).

Una propiedad importante de algunas NP es su mayor capacidad de deformación a la tracción, antes de la rotura. Las NPs tienen la capacidad de soportar tensiones externas muy elevadas, sin que se produzca la dislocación de la estructura del nanocristal y sin que se manifiesten fisuras o fracturas (Guo et al., 2014).

Una de las principales diferencias que caracterizan la generación de NPs, es el incremento de la relación entre superficie y volumen a medida que el tamaño de la NP se reduce (Khan et al., 2019). El incremento del área superficial de las NPs origina una redistribución de los átomos, aumentando la fracción de

aquellos que se encuentran en su superficie. En las NPs sólidas de unos pocos nm de diámetro, el número de átomos que ocupan la superficie exterior es mayor que el número de átomos en el volumen encerrado (Yokoyama et al., 2018). Una NP de tamaño 1 nm tiene más del 90% de sus átomos situados en su superficie. Los átomos situados en la superficie de las nanopartículas son inestables, tienen un mayor nivel energético y las fuerzas con que son atraídos por los átomos situados en el interior de la masa son muy débiles (Phan & Haes, 2019). Esta superioridad de superficie favorece el incremento de la energía interfacial, la reactividad de la NP, la eficiencia en la absorción y la capacidad de hacerla funcional de forma eficiente con entidades moleculares de interés (Sperling & Parak, 2010).

Las NPs se pueden clasificar en función de su composición, donde se destacan las que están hechas a base de elementos metálicos como las nanopartículas de plata (AgNPs) y las nanopartículas de oro (AuNPs). Es en este tipo de NPs sobre las que se centra principalmente esta revisión. Sin embargo, resulta importante destacar que también existen las NPs basadas en carbono (fullerenos, nanotubos y nanofibras), dendrímeros, liposomas, entre otras (Ver Figura 6) (Hossen et al., 2018)



**Figura 6. Representación esquemática de tipos de nanopartículas.** Existen NPs basadas en carbono (nanotubos), dendrímeros, elementos metálicos (AuNPs), liposomas, etcétera (Modificada de Hossen et al., 2018)

### **3.1.3. Nanopartículas metálicas**

Las NPMs presentan una gran variedad de usos. Concretamente, tienen aplicaciones en diversas áreas, descritas a continuación:

#### *a) Electrónica*

En el área electrónica se requieren sistemas de almacenamiento de energía con eficiencia energética y una larga vida útil a bajo costo. Este tipo de aplicación se centra principalmente en la mejora de las baterías y celdas de combustible. Se han obtenido electrodos de baterías con NPMs que operan a altas densidades de corriente con un ciclo de vida mucho más largo (Welch & Compton, 2006).

### *b) Catálisis*

Un catalizador es un material que aumenta la cinética de una reacción química, sin ser consumido en el proceso. Una clase importante de catalizadores la componen las AuNPs, AgNPs, nanopartículas de cobre (CuNP) y óxidos de hierro (Fierascu et al., 2019). Esta propiedad catalítica surge de sus estados electrónicos únicos y estructuras de superficie, esenciales para la conversión electroquímica de energía y en los dispositivos de almacenamiento, incluyendo las celdas de combustible y baterías (Khan et al., 2019)

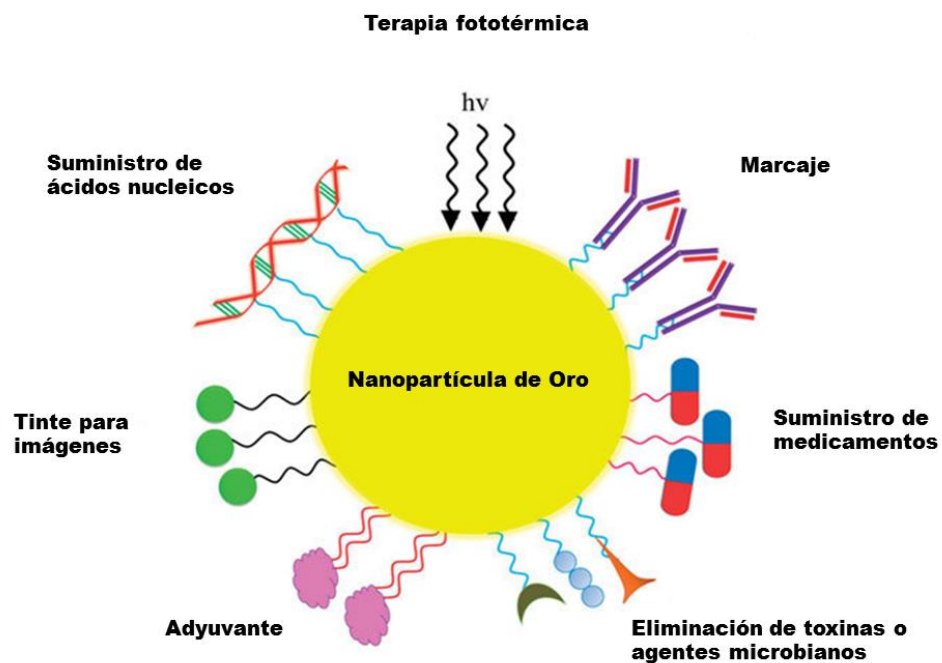
### *c) Celdas solares*

En años recientes ha ganado atención la investigación acerca del uso de NPs de materiales semiconductores para la fabricación de celdas solares (Y. Zhang et al., 2012). En ese sentido, los nanomateriales plasmónicos pueden ofrecer vías prometedoras para abordar las limitaciones intrínsecas del rendimiento de las celdas solares orgánicas convencionales. En concreto, la utilización de materiales plasmónicos han sido ampliamente explotados para la promoción eficaz de la absorción de fotones en las capas activas orgánicas (J. M. Lee & Kim, 2016). En general se han usado diferentes tipos de nanoestructuras para la fabricación de prototipos de celdas solares, de entre los cuales se puede destacar el uso de nanoestructuras de silicio (Si), selenurio de indio-cobre ( $\text{CuInSe}_2$ ), óxido de zinc (ZnO), entre otras (Yang Tang, 2017).



#### d) Medicina

Las NPMs tienen una gran cantidad y variedad de usos en el área medicinal. Entre ellos ofrece la posibilidad de generar aplicaciones en el desarrollo de nanotransportadores de fármacos dirigidos a sitios específicos del cuerpo, que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer u otras enfermedades; biosensores moleculares con la capacidad de detectar alguna sustancia de interés como, por ejemplo, un biomarcador de alguna enfermedad, nanobots programados para reconocer y destruir células tumorales o bien reparar algún tipo de tejido, NPs con propiedades bactericidas y desinfectantes para combatir virus (Orlowski et al., 2014), bacterias (McLaughlin et al., 2016) y hongos (C. Li et al., 2013), etcétera (Ver Figura 7) (Bagheri et al., 2018).



**Figura 7. Diferentes aplicaciones de las nanopartículas de oro en diagnóstico y terapia en clínica.** Las nanopartículas metálicas se utilizan en una variedad de contextos tales como: fototerapia térmica, direccionamiento, administración de fármacos, formación de imágenes, administración de ácidos nucleicos, eliminación de toxinas y agentes microbianos y como adyuvante (Modificada de Bagheri et al., 2018)

Las NPMs que concentran mayor interés en el uso sobre sistemas biológicos e investigación biomédica corresponden a las nanopartículas de plata (AgNP), cobre (CuNP), oro (AuNP) y óxidos metálicos como el ZnO, entre otras (Ocampo et al., 2014). Esta última área de aplicación de las NPMs es de particular interés para el propósito que persigue esta revisión narrativa. Se ha observado en la literatura que el uso de NPMs en sistemas biológicos puede resultar ser una "espada de doble filo", proporcionando ventajas positivas para su utilidad, en términos biológicos, y en contraparte, impactos negativos en la salud tras la exposición (Liao et al., 2019). La toxicidad asociada al uso de algunas NPMs (AuNP, AgNP, CuNP, entre otras) aumenta con la disminución del tamaño, ya que pueden penetrar con mayor facilidad hacia el interior de las membranas celulares, facilitando su diseminación, y con ello provocar lesiones a nivel biomolecular (Ingle et al., 2014; Liao et al., 2019).

Por otro lado, también se discute si es que las NPMs pueden ser identificadas como agentes exógenos por parte de la población de células del sistema inmune, interfiriendo así con el propósito inicial con las que fueron diseñadas y utilizadas, ya que, esta población celular está estrechamente ligada con el reconocimiento, internalización y degradación de elementos ajenos con

potencial dañino para el huésped mediante la liberación de especies radicalarias y otras moléculas degradativas (Pallardy et al., 2017). Estos puntos serán abordados en mayor profundidad en la sección 3.5.

### **3.2. Sistema Inmune Innato**

El sistema inmune innato corresponde a las células y a los mecanismos que proporcionan defensa inmediata no específica, frente al ataque de elementos ajenos al organismo (Charles A. Janeway & Medzhitov, 2003). Esto significa que las células de la respuesta inmune innata reconocen y responden a elementos exógenos con potencial dañino de forma genérica, y que a diferencia de la respuesta inmunitaria adaptativa, no otorga memoria a largo plazo al huésped después de la primera exposición a estos agentes externos (Charles A. Janeway & Medzhitov, 2003). La invasión de un huésped por agentes patógenos desencadena una batería de respuestas inmunes, las que ocurren por las interacciones entre diversos factores de virulencia (transmitidos o expresados por los patógenos) y los mecanismos de vigilancia de las células inmunes del huésped (Kumar et al., 2011). Esta interacción será mencionada más adelante.

El sistema inmune adaptativo por otro lado, está organizado en torno a dos clases de linfocitos especializados, las células T y B, que muestran un

repertorio diverso de receptores de reconocimiento específicos de antígeno (moléculas expresadas en los patógenos y agentes dañinos), que les permiten la identificación y eliminación específica de patógenos, así como la producción de inmunoglobulinas (Ig), o anticuerpos que aseguran la respuesta de memoria inmunológica o de larga duración, contra nuevas reinfecciones (Dunkelberger & Song, 2010; Gasteiger & Rudensky, 2014).

La participación del sistema inmune adaptativo no será abordado en esta revisión. Para obtener mayor información al respecto, se sugiere el trabajo publicado por Schenten & Medzhitov (2011) donde este tema es desarrollado en mayor detalle.

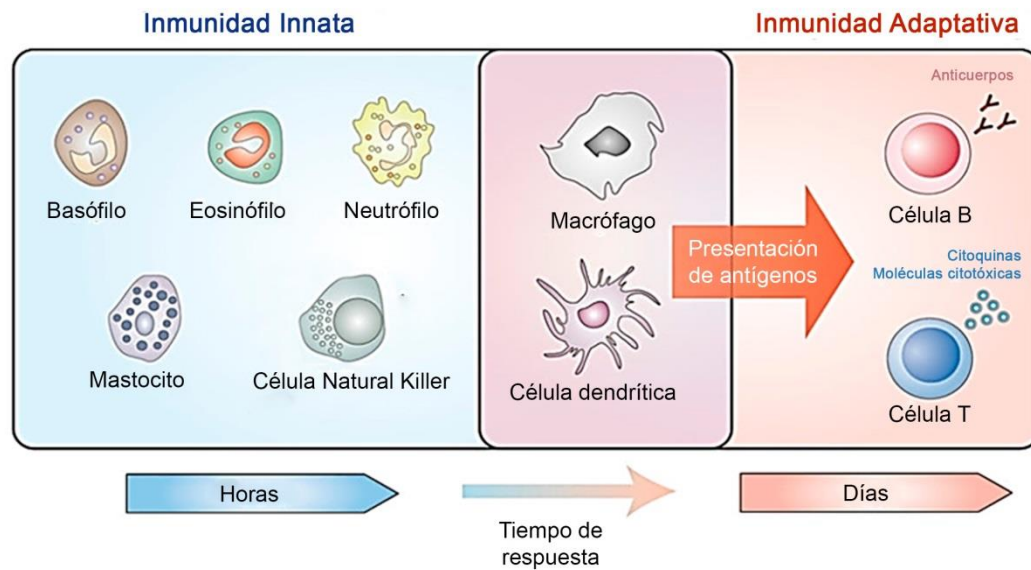
### **3.2.1. Componentes celulares del Sistema Inmune Innato**

Las células inmunitarias se producen en los huesos largos, específicamente en su núcleo blando esponjoso llamado médula ósea roja. Aquí, las células inmunes emergen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes, capaces de producir un número ilimitado de cualquier clase de célula inmunitaria (Mahla, 2015). Cada tipo celular emerge desde un precursor comprometido con un linaje específico. Así los glóbulos rojos y las plaquetas, los neutrófilos, los linfocitos B y los macrófagos, se producen en la médula ósea

para luego salir a circulación sanguínea y linfática (Delves & Roitt, 2000; Zlotoff & Bhandoola, 2011).

Cuando un elemento ajeno invade el organismo, se reconoce sus estructuras conservadas y sus moléculas expresadas en su superficie o liberadas por los patógenos microbianos, los cuales son reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Vance et al., 2009). Este reconocimiento lo ejercen las células inmunes innatas, principalmente los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas (Gordon, 2002). Estas células expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que detectan a estos PAMPs, los que corresponden a componentes de la pared celular en bacterias y hongos, tales como polisacáridos, glicolípidos, lipoproteínas; así como también, nucleótidos y ácidos nucleicos bacterianos y virales (Iwasaki & Medzhitov, 2015). El reconocimiento de estos patrones, induce la activación de cascadas de señalización intracelulares en las células del sistema inmune innato, generando la activación de genes que al ser transcritos participan en la respuesta frente al patógeno y de esta manera eliminarlo (Mogensen, 2009). Posteriormente, una vez que el patógeno o agente extraño ha sido destruido y eliminado, estas mismas células participan en la reparación del daño tisular colateral ocurrido producto de la infección, para asegurar así la funcionalidad del tejido y la mantención de la salud y la vida (Lech & Anders, 2013).

La detección de los PAMPs por PRRs y su correspondiente cascada de señalización, conduce a la inducción de respuestas del tipo inflamatorias por parte de las células innatas. Estas respuestas son mediadas por citoquinas y otras moléculas, que son proteínas pequeñas de tipo solubles, que al unirse a su receptor expresado en otras células son las encargadas de la comunicación entre las células inmunitarias. Dentro de estas moléculas solubles también se cuentan a las quimioquinas, que corresponden a una subpoblación de citoquinas que actúan como quimioatrayentes, permitiendo la movilización de las células inmunitarias hacia el sitio de requerimiento o hacia el sitio de infección, facilitando así la erradicación del patógeno (Takeuchi & Akira, 2010). Además, la detección de patógenos por los PRRs expresados en células presentadoras de antígeno, particularmente los macrófagos y las células dendríticas (CD), conducen a la activación de la respuesta inmune adaptativa (compuesta por linfocitos T y B, como ya se mencionó) a través de la presentación de moléculas provenientes de los patógenos (antígenos), mediante sus complejos mayores de histocompatibilidad (MHC). Estos antígenos expuestos en los MHC de las células presentadoras son reconocidos por las células T, permitiendo así la activación y comunicación de los sistemas inmune innato y adaptativo (Ver Figura 8) (Janeway, 1989).



**Figura 8. Componentes celulares del sistema inmunológico en mamíferos.** El sistema inmunológico consta de la inmunidad innata y adaptativa. Los basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, células asesinas naturales (*Natural Killer*), macrófagos y células dendríticas, las que median la inmunidad innata. Los macrófagos y las células dendríticas son fundamentales en la inducción de la inmunidad adaptativa al presentar los antígenos a los linfocitos T y B. El sistema inmune adaptativo, incluye inmunidad humoral mediada por células B e inmunidad celular mediada por células T, ambas dirigidas hacia los antígenos específicos (Modificada de Yamauchi & Moroishi, 2019).

A continuación se detallarán las funciones inmunes de las principales células que conforman al sistema inmune innato.

### 3.2.2. Neutrófilos

La sangre humana está compuesta por leucocitos o glóbulos blancos que corresponden a un 1% del total de células, son llamados así por su carencia de color en un frotis, si se les compara con los eritrocitos o glóbulos rojos (Nathan, 2006).

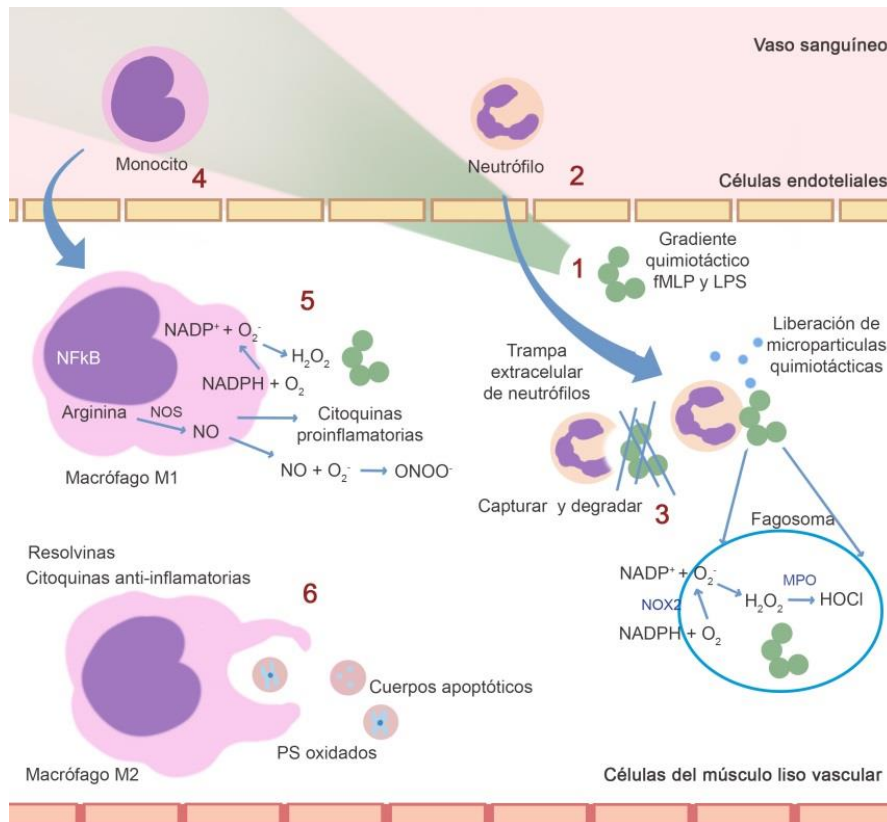
Dentro de los glóbulos blancos existen diversos tipos, y uno de ellos son los granulocitos. Se denominan así, ya que, presentan gran cantidad de gránulos en el citoplasma. Los distintos tipos de granulocitos son: los eosinófilos, los basófilos y los neutrófilos (Amulic et al., 2012).

Los neutrófilos son las células más abundantes y comprenden la primera línea de la inmunidad innata frente a infecciones agudas (Castle, 2000). Migran al sitio de infección o inflamación en cosa de minutos, para contener y eliminar las partículas infecciosas a través, de la captación fagocítica y posterior degradación intracelular del agente infeccioso (Nordenfelt & Tapper, 2011). Además de esto, también proporcionan señales de alerta a otras células inmunes innatas mediante la liberación de moléculas solubles como citoquinas y quimioquinas que facilitan su reclutamiento (Nathan, 2006).

Para cumplir su función los neutrófilos están dotados de un conjunto de vesículas intracelulares o gránulos citotóxicos, enriquecidos con diferentes moléculas antimicrobianas como péptidos catiónicos, proteasas, lactoferrina y mieloperoxidasa (MPO), entre otros (Faurischou & Borregaard, 2003). Los neutrófilos, también pueden destruir a microorganismos mediante la formación de trampas extracelulares de neutrófilos o NET (por su sigla en inglés) (Ver Figura 9) (Urban et al., 2006). Las NETs se forman como consecuencia de la liberación del ADN, contenido en el núcleo y en las mitocondrias de los neutrófilos, hacia el espacio extracelular (Amini et al., 2018). Este ADN liberado,



corresponde a cromatina descondensada, la que sumada a algunas proteínas granulares como proteasas de serina, permiten contener y retener a las bacterias y virus, y evitar de este modo su invasión y replicación (Amulic et al., 2012). Los NETs juegan un papel importante en la contención de la infección y en el reclutamiento de otros miembros del sistema inmune para potenciar la inflamación (Wartha et al., 2007). El mecanismo de acción y activación de los NETs, está dado principalmente por la generación de EROs (Ver Figura 9) (Björnsdóttir et al., 2015). La síntesis de estas especies está mediada por la enzima NADPH oxidasa (NOX), descrita en mayor detalle en la sección 3.3. Las EROs sintetizadas por esta enzima atacan a los agentes patógenos alterando sus macromoléculas para llevar a cabo su degradación e impedir su proliferación (Ver Figura 9) (Fuchs et al., 2007).



**Figura 9. Reclutamiento de células inmunes innatas y generación de EROs en sitios inflamatorios.** (1) Los productos bacterianos como el péptido formil-metionina-leucina-fenilalanina (fMLP) y lipopolisacárido (LPS) forman un gradiente químico (en color verde) que es detectado inicialmente por los neutrófilos que circulan en el torrente sanguíneo. (2) Los neutrófilos son reclutados por el gradiente de quimioatrayentes donde reconocen y engloban a las bacterias en un fagosoma debido a los patrones moleculares presentes en la superficie bacteriana. Dentro del fagosoma, NOX2 produce altas concentraciones de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que se dismuta en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). (3) En presencia de la enzima neutrofílica, mieloperoxidasa (MPO), se forma el ácido hipocloroso (HOCl) que desencadena la NETosis, es decir, la liberación de trampas extracelulares de ácido nucleico que inmovilizan las bacterias extracelulares para su muerte por EROs. Los neutrófilos activados también liberan partículas que forman un gradiente quimiotáctico para el reclutamiento de macrófagos. (4) Los monocitos que migran se diferencian en macrófagos en el tejido. (5) Bajo la influencia de LPS y la citoquina interferón gamma ( $IFN-\gamma$ ), los monocitos se diferencian en macrófagos M1 que producen  $O_2^{\cdot-}$ , óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ),  $H_2O_2$  y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) para apoyar la eliminación de bacterias y un mayor reclutamiento de otras células inmunes. (6) Posteriormente en una respuesta inflamatoria de resolución del daño, los macrófagos M2, las células más importantes de este proceso, producen mediadores lipídicos resolutivos, que promueven la remodelación y reparación del

tejido dañado a través de la secreción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). PS = Fosfatidilserina (Modificada de Griffiths et al., 2017).

### **3.2.3 Macrófagos**

Los macrófagos son células que se originan en la médula ósea como monoblastos y luego, se diferencian en promonocitos y monocitos, conformando al sistema mononuclear fagocítico (SMF). Los monocitos emigran desde la médula ósea para circular en la sangre o linfa y luego se localizan al interior de diferentes tejidos donde se comprometen con dicho tejido para residir ahí, desde ese momento se denominan macrófagos. Además, los macrófagos pueden dirigirse a los órganos linfáticos, como el bazo y al igual que en sus órganos de origen, presentar antígenos a los linfocitos (Das et al., 2015). Los macrófagos son las células que llegan en segundo lugar al sitio del daño o infección en cosa de minutos y horas, quimioatraídos por los neutrófilos (Prame Kumar et al., 2018)

Para que los macrófagos logren su activación deben pasar desde un estado de reposo a un estado activado. Para esto varias señales son necesarias y reconocidas por estas células como la citoquina Interferón gamma (INF- $\gamma$ ) la cual, se une a su receptor expresado en la membrana plasmática del macrófago, lo que induce una cascada de señalización celular, que se suma a una segunda señal, dada por el reconocimiento de un PAMP como el

lipopolisacárido (LPS), molécula presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. De esta manera el macrófago adquiere un fenotipo o una característica que genera una función específica (Martinez & Gordon, 2014). La interacción con INF- $\gamma$  y/o LPS induce a los macrófagos a adquirir el fenotipo tipo 1 (M1), considerados proinflamatorios y secretores del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Interleucina 12 (IL-12), moléculas que promueven la generación de linfocitos T helper 1 (Th1), la síntesis y secreción de EROs y especies reactivas derivadas de nitrógeno (ERN). Ambas, EROs y ERNs, permiten la destrucción de células tumorales, patógenos y elementos ajenos potencialmente dañinos para el organismo (Martinez & Gordon, 2014). Esto será descrito en mayor profundidad en la sección 3.3.

La activación de los macrófagos no siempre genera un fenotipo proinflamatorio o de tipo M1, también pueden adquirir un fenotipo antiinflamatorio o M2. La unión de la Interleucina 4 (IL-4) o Interleucina 13 (IL-13) con su respectivo receptor expresado en la membrana de los macrófagos, induce un fenotipo M2. Los macrófagos M2 secretan interleucinas antiinflamatorias como la Interleucina 10 (IL-10), al Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ) y al Factor de Crecimiento semejante a Insulina 1 (IGF-1), los que promueven la reparación, regeneración de tejidos y el desarrollo de la angiogénesis. Es importante considerar que estas células son sumamente plásticas y pueden cambiar desde un fenotipo al otro, por ejemplo, la fagocitosis de células apoptóticas generada

por macrófagos de tipo M1, los transforma hacia macrófagos de tipo M2 (Martinez & Gordon, 2014).

### Receptores de reconocimiento de patrón expresados por los macrófagos

Para el reconocimiento de elementos extraños por parte de los macrófagos, se han identificado 4 PRRs, los que están ligados a vías intracelulares de transducción de señales que activan respuestas celulares, como la producción de moléculas que promueven la inflamación y destrucción de microbios (Gustafson et al., 2015) los que son descritos a continuación:

#### Receptores *Scavenger*

Los receptores *Scavenger* (SRs), incluyen sus 3 variedades SR-A I, SR-A II y *MARCO* (Taylor et al., 2005). Los SRs corresponden a proteínas integrales de membrana que unen e internalizan diferentes tipos de ligando polianiónicos con una alta afinidad. Estos ligandos incluyen, entre otros, a lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox), glóbulos rojos y membranas celulares oxidadas e incluso bacterias patógenas. Las células de Kupffer, macrófagos localizados y residentes del hígado, son particularmente ricas en la expresión de receptores *Scavenger* los cuales, internalizan las lipoproteínas haciéndolas susceptibles a la degradación endosomal.o intracelular (H. Suzuki et al., 1997).

## Receptores TLRs

Los receptores de tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) son expresados ampliamente por células que conforman la inmunidad innata (Takeda et al., 2003). Los seres humanos expresan diez TLRs funcionales (TLR1 a TLR10), mientras que se han identificado doce TLRs (TLR1 a TLR9 y TLR11 a TLR13) en ratones (Lee et al., 2012). Los TLRs son glucoproteínas integrales transmembrana expresadas en la membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11), así como en membranas de vesículas intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) como endosomas y lisosomas (Lee et al., 2012). Se encargan del reconocimiento de PAMPs y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Takeda et al., 2003). Estos receptores se unen a los PAMPs, y DAMPs a través de sus dominios que contienen repeticiones ricas en leucina (RRL). De esta manera las células desencadenan la activación de respuestas inmunitarias frente a los patógenos (Bell et al., 2003). Los DAMPs son moléculas reconocidas como “señales de peligro” que, en conjunto con las alarminas, son proteínas intracelulares propias liberadas por células necróticas, apoptóticas o de células que han sido destruidas (Bianchi, 2007). Ejemplos de productos bacterianos que se unen a los TLRs son el LPS y el ácido lipoteicoico, constituyentes de las paredes celulares de las bacterias gram negativas y de las bacterias gram positivas, respectivamente, y la flagelina, el componente proteínico de los flagelos de las bacterias móviles (Olive, 2012).

### Receptores tipo Fc

Los receptores Fc se expresan en células del sistema inmunológico, incluyendo los granulocitos (neutrófilos y eosinófilos), los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) y los linfocitos del sistema inmunológico adaptativo (como las células B). Los receptores Fc le permiten a todas estas células reconocer a los anticuerpos que se encuentran unidos a la superficie de microorganismos y en las células infectadas. Este reconocimiento permite a las células del sistema inmunológico, reconocer y eliminar a los agentes patógenos o a células infectadas (Pincetic et al., 2014). La activación de la fagocitosis es la función más común que se atribuye a los receptores Fc, la cual será definida en profundidad más adelante. Los neutrófilos y los macrófagos M1 comienzan a fagocitar y destruir a los agentes patógenos recubiertos de los anticuerpos o Ig a través de este proceso (Swanson & Hoppe, 2004).

### Receptor de Manosa

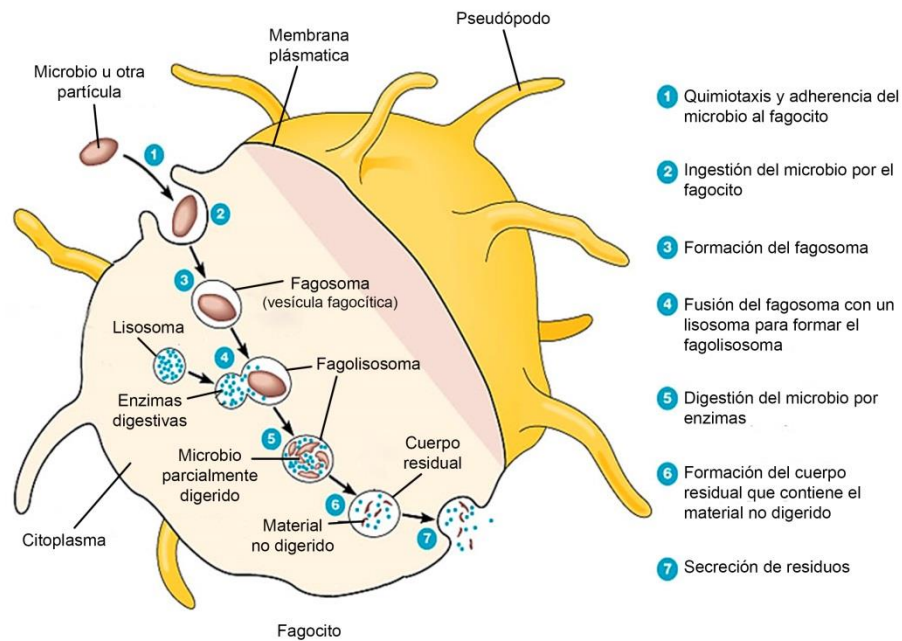
El receptor de manosa es una proteína transmembrana, perteneciente a la familia de lectinas de tipo C, principalmente presente en la superficie de los macrófagos y células dendríticas inmaduras, participando en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Allavena et al., 2004). A su vez, el receptor de manosa se une a restos de carbohidratos presentes en la superficie de patógenos, como bacterias, hongos, parásitos y virus, por lo que también se considera un PRR (Mogensen, 2009). El receptor de manosa se recicla

continuamente entre la membrana plasmática y los compartimentos endosomales de una manera dependiente de clatrin, que corresponden a proteínas citosólicas que forman el recubrimiento de las microcavidades de membranas celulares (Howard & Isacke, 2002).

### Fagocitosis de los macrófagos

Para llevar a cabo el proceso de reconocimiento y posterior degradación de patógenos, primero el macrófago emite prolongaciones dependientes de la membrana plasmática o pseudópodos y lamelipodios, que envuelven a la partícula extraña, introduciéndola en su citoplasma para dar paso a la formación de una vesícula fagocítica o fagosoma, la que se fusiona posteriormente con vesículas que contienen proteasas y a pH ácido o bajo, denominados lisosomas, formando de esta manera a los fagolisosomas (Ver Figura 10) (Gordon, 2016).

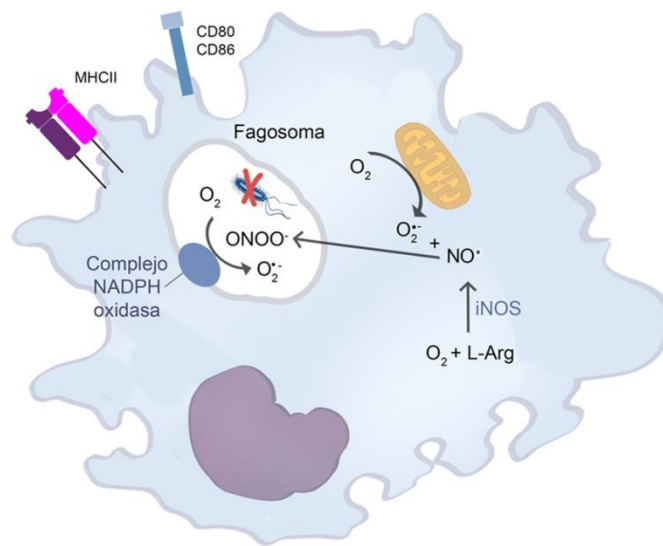




**Figura 10. Proceso de fagocitosis mediado por macrófagos.** Tras el reconocimiento de microorganismos o partículas exógenas por parte del macrófago, estos son incorporados en una vesícula fagocítica, la que se fusiona con un lisosoma. El fagolisosoma resultante contiene enzimas y radicales libres (RLs) que generan su degradación. Finalmente, los productos de esta digestión se eliminan al exterior de la célula o estos restos son presentados a linfocitos T para iniciar la respuesta inmune adquirida (Modificada de Sharma, R., 2012).

Dentro del fagolisosoma se producen los mecanismos necesarios para la destrucción del microorganismo o partícula exógena fagocitada (Gagnon et al., 2002). Estos mecanismos contemplan la generación de EROs a través del complejo enzimático NOX (Ver Figura 11), el que es descrito en extenso en la sección 3.3. (Schumann, 2016). Las EROs por sí solas son capaces de degradar colágeno, de inactivar enzimas, de oxidar lípidos, de lesionar el ADN, de atacar membranas y de lisar bacterias o células (Wang et al., 2017). Esto

último es importante dado que dentro de las células fagocíticas, las EROs alteran la integridad de la membrana fagosomal y difunden a través de las membranas lipídicas escapando primero hacia el citoplasma y de ahí al exterior de las células, siendo responsables de generar daños colaterales en las células vecinas y tejidos adyacentes (Erard et al., 2018). Afortunadamente el efecto tóxico de las EROs, es neutralizado por la acción de mecanismos antioxidantes enzimáticos, por ejemplo, la presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) a nivel tisular y celular (Indo et al., 2015). Estos mecanismos de lesión y protección frente a las EROs serán descritos en mayor detalle en las secciones 3.4 y 3.5, respectivamente.



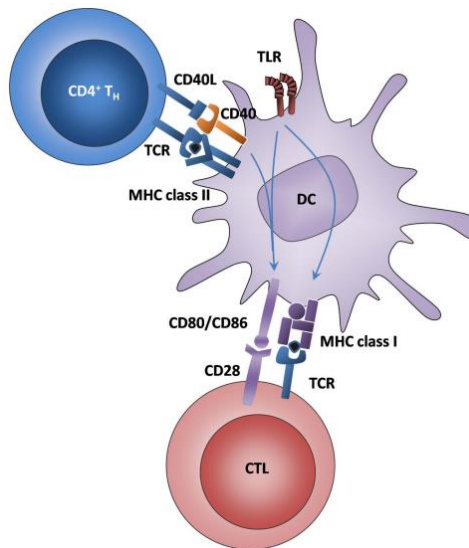
**Figura 11. Mecanismos de generación de EROs por macrófagos.** La figura ilustra la producción de radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) por la cadena transportadora de electrones a nivel mitocondrial y por el complejo NADPH oxidasa. También se genera el radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) al utilizar el aminoácido arginina como precursor. Los radicales  $O_2^{\cdot -}$  y  $NO^{\cdot}$ , juntos, producen peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) involucrado en la actividad microbicida.

Las moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) son moléculas involucradas en la presentación antigénica y son considerados marcadores de la activación de macrófagos (Modificada de Koo & Garg, 2019).

Finalmente, una vez digerido el agente extraño, queda una vesícula que contiene desechos (o el mismo antígeno, ya que, no siempre puede ser desintegrado). Esta vesícula se fusiona de nuevo con la membrana celular y es posteriormente exocitada como desechos o los antígenos no desintegrados son presentados en los MHC a células como son los linfocitos T involucrados en la respuesta inmune adaptativa (Lim et al., 2017).

#### **3.2.4 Células Dendríticas**

Las células dendríticas (CD), como ya se ha mencionado previamente, forman parte de la inmunidad innata, ya que, son capaces de fagocitar patógenos, y también participar en la función inmune adaptativa, debido a que su función principal es actuar como las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales de nuestro sistema inmune (Akira et al., 2006). Esto implica que viajan a los nódulos linfáticos, bazo y amígdalas a realizar la presentación antigénica donde activan a los linfocitos T citotóxicos CD8 + y las células T CD4 + o T ayudadores, las cuales son parte de la respuesta inmune del tipo adaptativo (Ver Figura 12) (Leopold Wager et al., 2016)



**Figura 12. Presentación de antígenos por células dendríticas a linfocitos T.** Las células dendríticas interactúan con las células T CD4 a través de un antígeno que se presenta en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) que es reconocido por el receptor de linfocitos T (TCR) y mediante interacciones con las moléculas coestimuladoras CD40 y CD40L. Las señales río abajo de CD40 y de los TLRs conducen al aumento de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC- I) y las moléculas coestimuladoras CD80/ 86, permitiendo que las células dendríticas interactúen con los infocitos T CD8 citotóxicos (CTL) (Thaiss et al., 2011)

### **3.3 Radicales Libres y Especies Reactivas del Oxígeno**

En la sección anterior, se mencionó que las células inmunes y los RLs están estrechamente relacionados. A continuación, se describen en detalle los RLs, qué son y qué rol desempeñan en los sistemas biológicos.

Los RL corresponden a moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándoles una configuración

espacial que genera una alta inestabilidad (Redza-dutordoir & Averill-bates, 2016).

Los RL, a nivel biológico, se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno (Mailloux & Harper, 2011). El oxígeno molecular ( $O_2$ ), que se halla de manera habitual en su forma más estable, resulta ser poco reactivo. Sin embargo, producto de reacciones químicas, acciones enzimáticas o por efectos medio ambientales, es capaz de producir una serie de RL que tienen la capacidad de producir daños oxidativos. A ellos se les conoce como EROs, denominadas de esa forma dado que son el subproducto del metabolismo normal del oxígeno (Nosaka & Nosaka, 2017).

Dentro de la familia de las EROs se identifican moléculas con diferentes grados de reactividad tales como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Ver Figura 13) (Mailloux, 2015).



**Figura 13. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO).** La definición de "radical libre" se refiere a "cualquier especie química que contenga uno o más electrones no apareados". Teniendo en cuenta que el  $O_2$  en el estado fundamental tiene dos electrones desapareados en su orbital más externo, se puede clasificar como una especie de radical libre. La reducción univalente de la molécula de  $O_2$  conduce a la génesis de EROs, intermediarios altamente reactivos como por ejemplo: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Modificada de Mailloux, 2015).

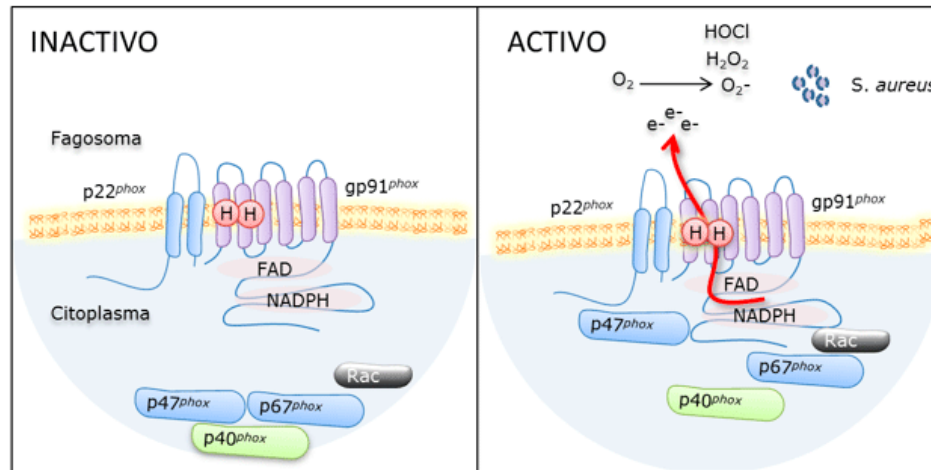
Este tipo de moléculas se producen por diferentes mecanismos tanto a nivel intracelular como extracelular. Los radicales  $O_2^{\cdot-}$ , son producidos en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones a nivel mitocondrial, mediante una transferencia de electrones al oxígeno molecular. El  $O_2^{\cdot-}$  es la principal ERO producida y da origen a las demás EROs de importancia biológica:  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  y  $^1O_2$ . (Mailloux & Harper, 2011)

En condiciones normales, hasta el 2% de los electrones son desviados de la cadena transportadora de electrones y forman  $O_2^{\cdot-}$  (Meo et al., 2016).

Por su configuración electrónica estos RLs presentan una vida media corta, normalmente en el orden de los milisegundos. Sin embargo, en diversos estudios, se ha demostrado que la reactividad de estas moléculas se correlaciona inversamente con su vida media y capacidad de difusión en el medio celular. El radical hidroxilo, por ejemplo, presenta una vida media muy corta ( $10^{-9}$  s), sin embargo, reacciona indiscriminadamente, con constantes de velocidad extremadamente altas, con casi todos los tipos de moléculas que se encuentran en las células vivas (Hrycay & Bandiera, 2015).

Como se adelantó en las secciones 3.2.2 y 3.2.3, una gran fuente de RL es endógena y está constituida por el metabolismo de las células del sistema inmune tales como los neutrófilos y macrófagos (Chen et al., 2016). Esta producción de EROs está dada particularmente por enzimas de la familia de las NADPH oxidasas (NOX), las cuales intervienen en el estallido respiratorio,

proceso que se caracteriza por un aumento violento en la demanda de oxígeno y en el consumo de energía a nivel celular utilizado para producir compuestos con capacidad microbicida, tales como las EROs (N. Suzuki et al., 2011). La NOX es un complejo enzimático unido a la membrana que transfiere electrones del NADPH al oxígeno. Cuenta con una estructura heterodimérica que comprende una subunidad catalítica y tiene cinco isoformas conocidas (NOX1-5). Estas isoformas difieren en su distribución tisular y en la cinética de formación de las EROs (Lay et al., 2014). Su activación se caracteriza por un aumento en el consumo de oxígeno molecular y tiene como objetivo, la liberación del radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) dentro de una vesícula fagocítica o hacia el medio extracelular, utilizando como agente reductor el fosfato de nicotinamida-adenina dinucleótido (NADPH) (N. Suzuki et al., 2011). En condiciones normales, las EROs son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas y no producen daño a las biomoléculas, siempre y cuando, los mecanismos antioxidantes funcionen adecuadamente (Ver Figura 14) (Koo & Garg, 2019).



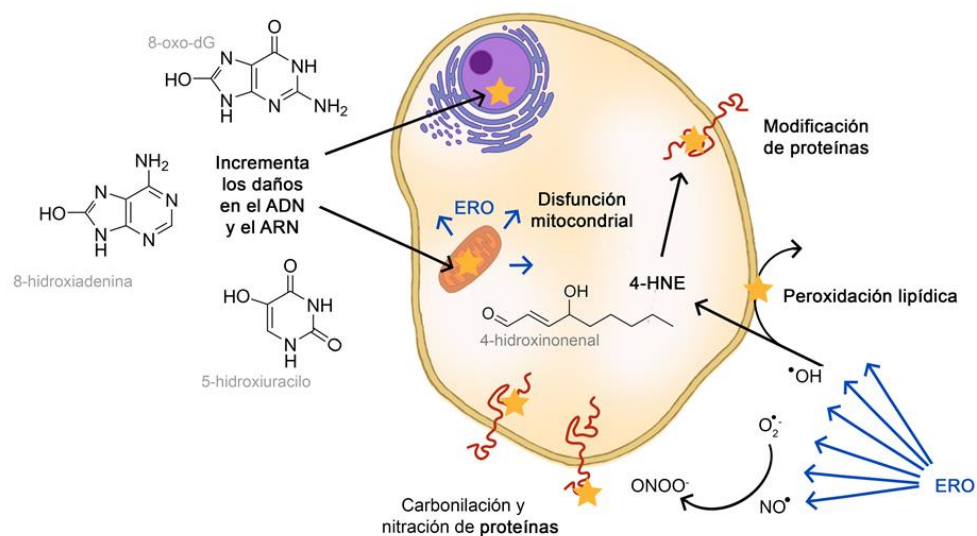
**Figura 14. Componentes del sistema NADPH oxidasa en estados de reposo y activación celular.** En reposo las proteínas citosólicas (p40phox, p47phox y p67phox) y Rac se encuentran separadas de las proteínas de membrana gp91phox y p22phox. Cuando un microorganismo (como el *S. aureus*) es fagocitado se induce un estado activado del sistema NADPH oxidasa caracterizado por el desplazamiento de las proteínas citosólicas hacia la membrana. Lo anterior induce la transferencia de electrones desde el NADPH hacia el FAD y los grupos hemo (H) y la posterior salida de estos electrones al fagolisosoma. Allí estos electrones inducen la generación de anión superóxido y otras EROs a partir del oxígeno molecular. Todo lo anterior favorece la destrucción del microorganismo que se encuentra en el fagolisosoma (Akong-Moore et al., 2012).

Las EROs son moduladores cruciales de las funciones celulares. A bajas concentraciones se ha observado que participan en la señalización celular, la inducción de la respuesta mitogénica, la defensa contra agentes infecciosos, entre otros (Buonocore & Tataranno, 2010). Las EROs, especialmente el  $H_2O_2$ , sirven como moléculas mensajeras por medio de la modificación oxidativa de proteínas de señalización (Widlansky & Gutterman, 2011). Entonces, un balance entre la producción de las EROs y su remoción permite una función celular normal (Halliwell, 2012a). El incremento desmedido de la producción de



ERO en los tejidos biológicos se conoce como estrés oxidativo (EO). Este estrés, se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio entre sustancias o factores prooxidantes y mecanismos antioxidantes (Sies et al., 2017).

Todo esto da lugar a reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, provocando daño sobre diferentes biomoléculas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos presentes en las células, dañando sus estructuras e inactivando sus funciones (Ver Figura 15) (Pisoschi & Pop, 2015)



**Figura 15. Rutas de acción de ERO sobre las biomoléculas celulares.** Estrés oxidativo asociado con niveles elevados de productos de oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos ocasionados por la acción de ERO. 4-HNE, 4-hidroxiacetonal; 8-oxo-dG, 8-oxo-2'-desoxiguanosina;  $O_2^{\cdot-}$ , anión superóxido;  $\cdot OH$ , radical hidroxilo;  $NO^{\cdot}$ , óxido nítrico;  $ONOO^-$ , peroxinitrito; ERO, especie reactiva de oxígeno. Las estrellas naranjas indican daño oxidativo (Modificada de Cheignon et al., 2018).

i. *Lípidos*: Los lípidos de membrana, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados, son más susceptibles a la oxidación por radicales libres. La peroxidación lipídica ocasiona una pérdida de la fluidez de la membrana. La peroxidación lipídica es iniciada, cuando un RL toma un hidrógeno de un grupo CH<sub>2</sub> en un ácido graso y origina un radical lipídico. Este radical puede reaccionar con el oxígeno molecular formando un radical peroxilo lipídico (ROO.). Este último radical sufre rearrreglos originando endoperóxidos, que llevan, finalmente, a la formación de malondialdehído (MDA) y 4 hidroxil-nonenal (4-HNE), los productos finales tóxicos de la peroxidación lipídica que causan daño al ADN y a las proteínas (Lay et al., 2014; Pisoschi & Pop, 2015).

ii. *Proteínas*: Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación. Dentro de las principales modificaciones que sufren ante la oxidación se cuentan la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a la proteólisis. Aunque se ha demostrado que individualmente algunos aminoácidos son más susceptibles a oxidarse que otros (prolina, lisina y arginina), una proteína, dependiendo de su conformación tridimensional, puede exponer o no esos aminoácidos a la oxidación (Nyström, 2005).

La interacción con EROs ocasiona carbonilaciones generando modificaciones extensas en cadenas laterales de las proteínas, entre ellas, se encuentra la aparición de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), oxidación de residuos de histidina a oxo-histidina y otros productos de degradación de fenilalanina a orto- y meta-tirosina, la conversión de metionina a metioninsulfóxido o la degradación oxidativa de triptófano a quinureninas. (Nyström, 2005; Thanan et al., 2015).

El daño oxidativo de las proteínas es irreversible e irreparable. Las proteínas dañadas pueden activar a los proteosomas para inducir la degradación de las proteínas oxidadas. De esta manera dichas modificaciones alteran la actividad de la proteína en cuestión (Pisoschi & Pop, 2015).

iii. *Ácido desoxirribonucleico (ADN)*: El ADN está sujeto al ataque por parte de radicales hidroxilo lo que genera una gran cantidad de productos modificados en la base o en el azúcar: 8- hidrox adenina y 8-hidroxiguanina, entre otros (Halliwell, 2012a). El daño oxidativo al ADN ocasiona mutaciones génicas, inestabilidad microsatelital y afecta la unión de los factores de transcripción, ocasionando un fenómeno de carcinogénesis producto de la pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico o por modificaciones oxidativas (Halliwell, 2012a; Pisoschi & Pop, 2015).

Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; contribuyendo a la fisiopatología primaria o la etiopatogenia de una gran

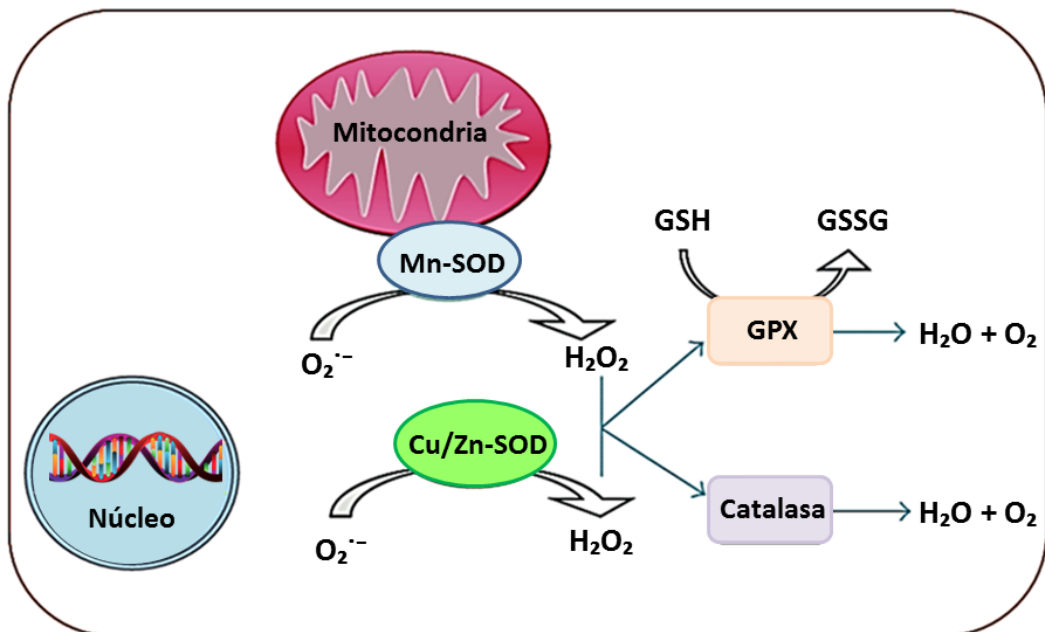
cantidad de afecciones (gástricas, respiratorias, cardíacas, óseas, etcétera) además del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad (Cáncer, Diabetes tipo II, Demencias, Alzheimer, enfermedad de Parkinson, entre otras) (Rani et al., 2016).

### **3.4 Sistema de Defensa Antioxidante Enzimático**

Debido a la necesidad de mantener a las EROs dentro de niveles compatibles con la función celular normal, los organismos han desarrollado mecanismos antioxidantes endógenos constituidos por enzimas que actúan inhibiendo la activación o neutralizando la acción de las EROs ya formadas, retrasando o previniendo significativamente la oxidación de casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos y ADN (Nimse & Pal, 2015).

Entre las enzimas antioxidantes se encuentran la Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutación Peroxidasa (GPX) (Ver Figura 16) (Indo et al., 2015). La enzima SOD es la encargada de transformar el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD y Zn-SOD que contienen cobre y zinc en su sitio activo, respectivamente, se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial; Mn-SOD que contiene manganeso y se

localiza en la matriz mitocondrial (Indo et al., 2015). Las CAT, son enzimas que se localizan en el peroxisoma, mitocondrias y citosol. Están encargadas de catalizar la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno usando el hierro como cofactor (Heck et al., 2010). La GPX, es una gran familia de enzimas cuya función es la reducción de peróxido de hidrógeno en agua. Esta usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH) y se localiza principalmente en el citosol y lisosomas (en neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune) (Ribas et al., 2014). El glutatión oxidado (GSSG) debe ser regenerado para poder continuar funcionando y lo hace a través de la enzima glutatión reductasa (Ribas et al., 2014)



**Figura 16. Principales enzimas antioxidantes y sus sustratos.** Las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Modificada de Moret-Tatay et al., 2016)

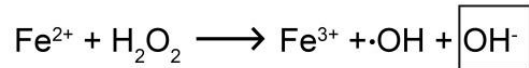
### **3.5 Estrés Oxidativo: mecanismo de toxicidad en sistemas biológicos por acción de NPMs**

Una vez descritas las características de las EROs (sección 3.3), es interesante conocer qué rol desempeñan dentro de los sistemas biológicos producto de la aplicación de NPMs y, sobre todo, las consecuencias de aquello.

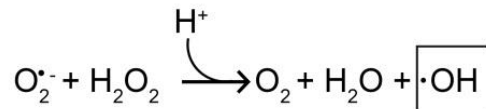
En relación a esto último, se ha reportado en literatura que el uso de nanomateriales del tipo metálico, como tratamiento en el área de la biomedicina, pueden provocar toxicidad e interferir en el metabolismo de los seres vivos a través de la generación de EROs (Yulin Tang et al., 2016).

Una fuente de generación de EROs también puede provenir desde el exterior, ya sea, como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias (cloroformo, paracetamol, etanol, etcétera), o bien, de manera directa por la presencia de metales de transición (hierro, cobre, plata, silicio, entre otros) (Flora et al., 2008). En presencia de metales de transición reducidos, como el ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es parcialmente reducido generando el radical  $\cdot\text{OH}$ , uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza. Ésta reacción se conoce como reacción de Fenton (Ver Figura 17) (Halliwell, 2012b). En los sistemas vivos la reacción que genera radicales  $\cdot\text{OH}$  además de la reacción de Fenton, es conocida como la reacción de Haber Weiss (Ver Figura 17), en la cual en presencia de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  se generan más radicales  $\cdot\text{OH}$  (Kehrer, 2000).

### Reacción de Fenton



### Reacción de Haber-Weiss



**Figura 17. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.** Cuando el peróxido de hidrógeno reacciona con un metal de transición, mediante la reacción de Fenton, se forma el radical hidroxilo. El hidroxilo puede reaccionar con el ADN, los lípidos o las proteínas presentes en la célula y generar daño en su estructura y función. La reacción de Haber-Weiss genera radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno y anión superóxido. (Modificada de Macedo-Márquez, 2012).

Este radical reacciona tan rápido con las biomoléculas que ningún antioxidante a concentraciones fisiológicas es capaz de competir con las biomoléculas por el  $\cdot\text{OH}$  generado. En vista de lo anterior, la mejor estrategia para minimizar el daño causado por el  $\cdot\text{OH}$  es remover el  $\text{H}_2\text{O}_2$  o secuestrar los metales de transición necesarios para la producción de  $\cdot\text{OH}$  por la reacción de Fenton (Halliwell, 2012b). En ambas estrategias, participan las células a través de proteínas como la transferrina, ceruloplasmina y albúmina, cuyo papel es quelar o secuestrar extracelularmente iones metálicos, evitando la producción del radical  $\cdot\text{OH}$  altamente tóxico (S. K. Biswas, 2016)

Los metales de transición tienen varias valencias y los cambios de valencia los hacen aceptar o donar electrones individuales. Esta característica hace a los iones metálicos muy buenos promotores de las reacciones con RL (Halliwell, 1989).

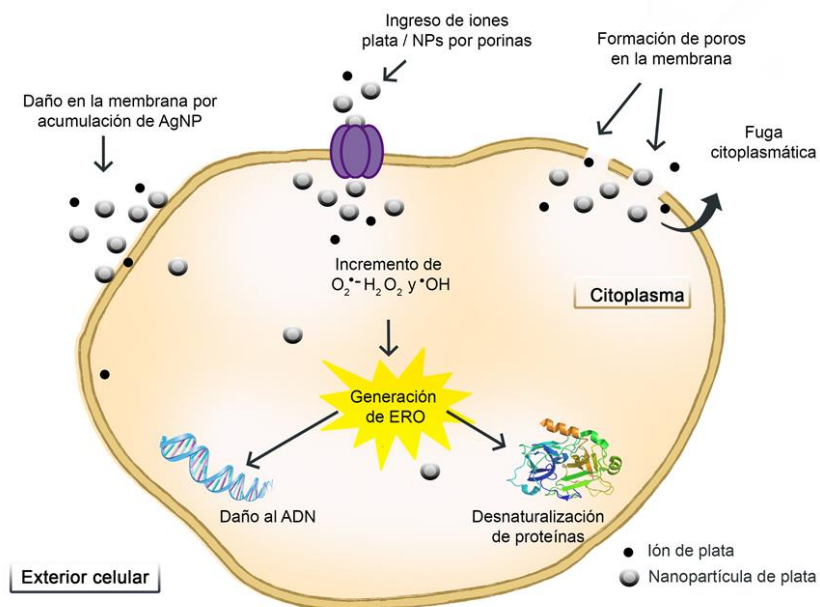
Los metales pueden oxidarse en disoluciones acuosas aireadas para dar paso a la generación de iones metálicos (Behra et al., 2013). En base a esto, existe un debate sobre si las NPMs y/o los iones que se liberan al medio son los encargados de ejercer un efecto citotóxico sobre los elementos celulares (Barros et al., 2018).

Los mecanismos de toxicidad generados por NPMs no están del todo claros, pese a ello, se ha propuesto que el efecto tóxico de las NPMs se asocia con un contacto directo de las NPMs con las membranas celulares, seguido de su ingreso al citoplasma celular (Gahlawat et al., 2016).

Una de las NPMs más estudiadas en cuanto a la generación de EROs y, de la cual se dispone mayor información, son las AgNP. Esto está muy ligado a su función antimicrobiana, propiedad que también comparten NPMs como AuNP, CuNP, ZnO, entre otras. Aunque existe una gran controversia sobre su mecanismo de acción, éste permite comprender de buena manera como es que se generan las EROs en sistemas biológicos por acción de NPMs. El mecanismo de acción bactericida podría resumirse en tres principales eventos; el primero, se explicaría por la liberación gradual de iones metálicos (iones de



plata para este caso) que inhiben la producción de adenosin trifosfato (ATP) y la replicación del ADN, factores fundamentales para la supervivencia celular; el segundo mecanismo, podría atribuirse a la capacidad de las NPMs para generar un daño directo a la membrana celular y sus biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN). Finalmente, y tercero, por la generación de EROs, en especial  $\cdot\text{OH}$ , ocasionando EO y con ello, la muerte celular (Ver Figura 18) (Le Ouay & Stellacci, 2015; Salem et al., 2015; S. K. Biswas, 2016)



**Figura 18. Mecanismos bactericidas de las AgNP.** Representación esquemática de los efectos bactericidas debidos al daño de la membrana inducido por las AgNP y la liberación de iones de plata de las NPMs, o la combinación de estos dos efectos. Estos efectos se pueden resumir en una unión inicial de AgNP o iones Ag + a la pared celular bacteriana, su posterior penetración dentro de la célula, seguida de generación de EROs, daño del ADN y desnaturalización de proteínas (Modificada de Liao et al., 2019).

### **3.6 Mecanismos de interacción de las células del sistema inmune innato con las NPMs**

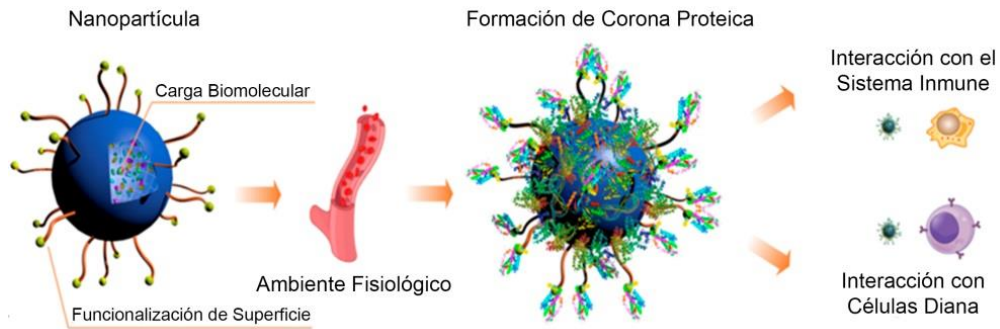
El sistema inmunológico es el responsable de la defensa del organismo frente a organismos patógenos y agentes extraños, como son las NPMs. Las NPMs pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico, interactuar con éste y modular su función induciendo un efecto inmunosupresor o inmunoestimulador (Dobrovolskaia, 2015). La diversidad química y estructural de las NPMs, sumada a la capacidad de llegar a diferentes células y tejidos, es ventajosa para su uso. Sin embargo, esas mismas características y propiedades hacen que las NPMs al ingresar al organismo, sean reconocidas (Dobrovolskaia et al., 2016). El reconocimiento de las NPMs dependerá de factores tales como la dosis, la vía de administración, el tamaño, la composición y las propiedades de la superficie de las NPMs (Reichel et al., 2019). Las células inmunes pueden estar expuestas a NPMs de tres formas principales: 1) administración oral o parenteral de formulaciones farmacéuticas basadas en NPMs, 2) inhalación de NPMs por contaminación o exposición ocupacional, o 3) generación de NPMs por el organismo debido a la degradación de implantes metálicos (Walkey et al., 2012).

Como se ha dicho en la sección 3.2.1., existen tres tipos de células inmunes innatas principales. Sin embargo, la información mayormente descrita asociada

al reconocimiento de las NPMs por parte del sistema inmune se centra en los macrófagos.

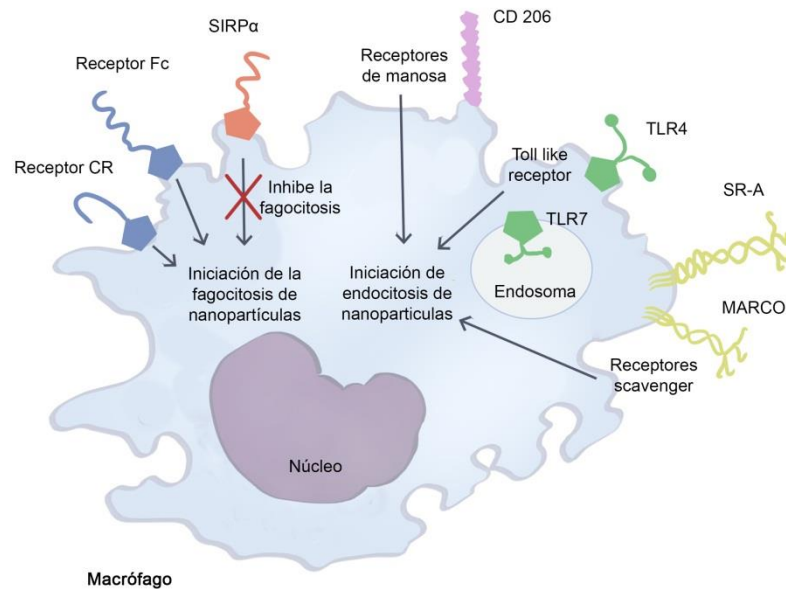
En los sistemas vivos no se encuentran nanomateriales con su diseño original, sino que ocurre la adsorción de proteínas o recubrimiento proteico en la superficie del biomaterial (denominado "corona" en la literatura de nanomateriales, y también "opsonización" en la literatura de administración de medicamentos) al entrar en contacto con la sangre o el tejido (Ver Figura 19) (Aggarwal et al., 2009). Proteínas sanguíneas, como la albúmina, las apolipoproteínas, las Ig y de la coagulación, entre otras, pueden unirse inespecíficamente a la superficie de los nanomateriales y provocar su opsonización favoreciendo la fagocitosis o endocitosis de las NPMs por parte de los macrófagos (Díaz et al., 2008). Esto puede dar lugar a una reducción en la vida media de las NPMs en el sistema circulatorio y alterar su estabilidad, induciendo su precipitación y agregación. La adsorción de las proteínas a la superficie de las nanopartículas depende de las características de la cubierta, de la composición y del método de síntesis de la NP en cuestión. Se sabe que alterando la carga de la superficie, como por ejemplo añadiendo diferentes grupos funcionales, pueden modificarse las propiedades hidrófilas de las NPMs y su vida media, a la vez que disminuye la interacción con proteínas o receptores que estimulan la fagocitosis (Dobrovolskaia & McNeil, 2007). Por ejemplo, las NP con su superficie recubierta de polietilenglicol (PEG) unen

menos proteínas que las que no poseen esta modificación en su superficie, y en algunos casos también disminuyen su toxicidad (Díaz et al., 2008).



**Figura 19. Formación de la “corona” proteica en la superficie de las nanopartículas.** Cuando las NPs se administran in vivo, quedan cubiertas por una corona de proteínas que activa la respuesta inmune e influye en la administración dirigida de la nanomedicina (Modificada de Digiacomio et al., 2020).

Debido a que los materiales extraños, patógenos y tejidos dañados presentan patrones reconocidos por los receptores de la superficie de los fagocitos, las NPs también podrían presentar patrones moleculares análogos debido a la adsorción de proteínas, o asociados específicamente a las propiedades fisicoquímicas de las materias primas (Gustafson et al., 2015). Taylor et al. (2005) ha identificado que los cuatro receptores de superficie de macrófagos, descritos en la sección 3.2.3., estarían involucrados en el reconocimiento de los nanomateriales (Ver Figura 20).



**Figura 20. Receptores de superficie de macrófagos: posibles responsables del reconocimiento de las nanopartículas.** Cada receptor que reconoce NPs inducirá un mecanismo de internalización específico, que se describe en el diagrama. Los efectos inflamatorios posteriores, desencadenados por la participación del receptor, pueden inducirse a través de estas vías de internalización (Modificada de Gustafson et al., 2015)

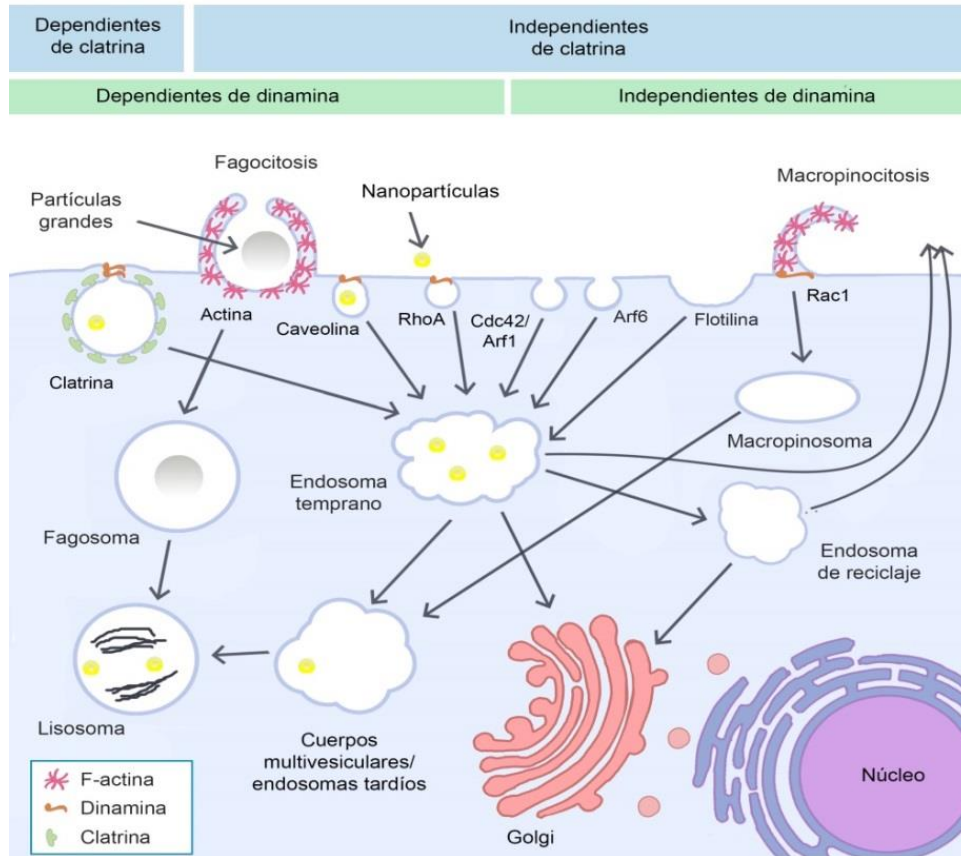
Estos mecanismos de internalización celular se clasifican generalmente como fagocitosis o pinocitosis según los receptores, los mecanismos de membrana y la disposición intracelular (Aderem & Underhill, 1999).

La fagocitosis se utiliza para la absorción y degradación de partículas de gran tamaño que superan los 500 nm (Doherty & McMahon, 2009). Las tasas de fagocitosis varían ampliamente y cambian según el tipo de célula, el estado de activación, las condiciones de cultivo o las condiciones biológicas en las que se

encuentren las NPs (por ejemplo, la exposición a endotoxinas o proteínas) (Kumari et al., 2010).

La pinocitosis es activa en todas las células de los mamíferos y también es responsable de la absorción de NPs. Este mecanismo de captación se puede clasificar en internalización extracelular de gran volumen (por ejemplo, macropinocitosis) y una internalización de menor volumen por ejemplo, a base de clatrina, capaces de una internalización de especies de 20 a 500 nm en tamaño (Doherty & McMahon, 2009; Kumari et al., 2010). Receptores *Scavenger*, TLRs y de manosa participan en estos mecanismos de reconocimiento e inducción de este proceso, que involucran la formación de invaginaciones de clatrina en la membrana celular que envuelven y arrastran el cargamento al interior de la célula (McMahon & Boucrot, 2011). Una vez que envuelven el cargamento, estas invaginaciones de membrana, a través de la escisión por dinamina, forman vesículas endocelulares, que se envían a endosomas tempranos, se acidifican y se transforman en vesículas endosómicas tardías, que luego son direccionadas a otros destinos intracelulares, incluidos los compartimentos lisosomales (Figura 21) (Canton & Giuseppe, 2012; Doherty & McMahon, 2009).

Mecanismos de endocitosis



**Figura 21. Modelo de los mecanismos endocíticos y de transporte intracelular.** Las nanopartículas (puntos amarillos) y otras sustancias captadas por endocitosis están encerradas dentro de los endosomas tempranos, fagosomas o macropinosomas. Estas vesículas con partículas maduran luego por la vía degradativa y se convierten en cuerpos multivesiculares/ endosomas tardíos que se fusionan con lisosomas. Alternativamente, las NPs se pueden transportar de regreso a la superficie celular directamente desde los endosomas tempranos o a través de los endosomas de reciclaje. El pH desciende gradualmente desde la superficie celular hacia los lisosomas donde el pH es de 4,0 a 5,5. Los lisosomas contienen proteasas y otras enzimas que degradan la mayoría de las sustancias biológicas (Modificada de Iversen et al., 2011).

### **3.7 Estrés Oxidativo: mecanismo de toxicidad en macrófagos por acción de NPMs**

Se ha informado que las respuestas de EROs mediadas por NPMs orquestan una serie de eventos patológicos como genotoxicidad, inflamación, fibrosis y carcinogénesis (Li et al., 2010). Hasta la fecha, el mecanismo celular exacto subyacente a la generación de EROs por el uso o aplicación de las NPMs, no se ha dilucidado completamente. A continuación, se detallará algunos de los mecanismos posibles encontrados y considerados en esta revisión.

#### **Toxicidad mediada por acción de metales de transición**

La mayoría de las NPs de base metálica provocan toxicidad mediada por RLs a través de reacciones de tipo Fenton (Dayem et al., 2017). Se ha demostrado que NPMs como el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), óxido de zinc (ZnO), AgNP, entre otras; actúan principalmente depositándose en las superficies celulares o dentro de los orgánulos celulares, induciendo cascadas de señalización de EO (Gustafson et al., 2015).

Las CuNP también siguen la misma línea. Su mecanismo de acción antimicrobiano es provocado por la liberación de iones de cobre  $\text{Cu}^{2+}$  que irán a dañar las membranas celulares de macrófagos, alterando su función y conduciéndolas a la muerte (Ren et al., 2009; Sohrabnezhad et al., 2014).



A su vez, estudios con AuNPs también han descrito un aumento en la producción intracelular de EROs en poblaciones de macrófagos humanos luego de haber sido internalizadas (Fatima et al., 2015).

### Activación del sistema inmune e inflamación mediado por las NPMs

El sistema inmune innato juega un papel fundamental en el tránsito de las NPMs a través del organismo. Ante la presencia de un antígeno o elemento extraño, como es el caso de las NPMs, el macrófago cuenta con mecanismos de reconocimiento, internalización y degradación que ya han sido señalados en los puntos anteriores (ver sección 3.2.3 y 3.6).

Por ejemplo, se ha demostrado que algunas NPMs activan células inflamatorias fagocíticas como macrófagos y neutrófilos, lo que resulta directamente en un aumento de la producción de EROs y EO (Manke et al., 2013) El EO inducido desencadena vías de señalización celular que dan como resultado una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias y fibróticas (Li et al., 2010).

Se ha informado que uno de los principales mecanismos de citotoxicidad de las NPMs son influir en las concentraciones de calcio intracelular, activar factores de transcripción y modular la producción de citoquinas pro inflamatorias a través de la generación de RL (Manke et al., 2013).

También se ha demostrado que, en particular, las AuNP pueden iniciar una respuesta inflamatoria mediante la activación de macrófagos tanto *in vitro* como

*in vivo* (Fallarini et al, 2013). Un estudio que comparó las AuNP con las AgNP, en macrófagos, demostró que la exposición a corto plazo a AgNP indujo la señalización que activó al Factor Nuclear kappa B (NF-kB) (considerado el factor transcripcional maestro de la respuesta inflamatoria) y la producción de EROs, lo que condujo a aumentos en los niveles de citoquinas pro inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 (Gustafson et al., 2015; Nishanth et al., 2011).

Yazdi y cols. (2010) observaron algo similar luego de la aplicación de NPMs de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) (20 nm y 80 nm), desencadenando la producción de EROs. Estos demostraron ser los responsables de la activación del inflammasoma, complejos multiproteicos que conducen a la activación de la caspasa-1, mediante la síntesis y secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos. La proteína adaptadora MyD88 que forma parte de la vía de señalización de los TLRs y, encargada de la translocación río abajo del factor NF-kB al núcleo, también participa de este proceso. La vía de señalización activada por la unión de IL-1 $\beta$  a su receptor también comprende la activación de la proteasa caspasa-1, encargada de mediar tanto los procesos de inflamación como los de apoptosis, lo que se transforma en conjunto en un círculo vicioso de proinflamación constante (Yazdi et al., 2010).

#### Disfunción mitocondrial generada por las NPMs

La apoptosis es considerada como uno de los mecanismos principales de muerte celular causada por el EO inducido por NPMs. Entre las diferentes vías

apoptóticas, la vía apoptótica mitocondrial intrínseca juega un papel importante en la muerte celular inducida por NPMs, ya que, las mitocondrias son uno de sus principales organelos diana (Ma & Yang, 2016). Primero las NPMs dañan los fosfolípidos de membrana mitocondrial, provocando su despolarización. Luego las NPMs ingresan a las mitocondrias y sobre estimulan la producción de EROs a través de la disfunción en la cadena transportadora de electrones (Manke et al., 2013). La liberación de iones metálicos sería la responsable de la interacción con los grupos -SH de las enzimas y proteínas celulares, interfiriendo con la cadena respiratoria, afectando la producción de ATP mitocondrial, alterando la permeabilidad de las membranas, generando cambios en la forma, estructura y función de este organelo clave en el metabolismo y supervivencia de la célula (Hsueh et al., 2015). Otra consecuencia es la alteración del ADN cromosómico, lo que afecta la capacidad de replicación y la síntesis de proteínas esenciales para el correcto funcionamiento de la célula. Varias NPMs, incluidos Zn, Cu, Ag, Fe, provocan la muerte celular mediada por EROs a través de la disfunción mitocondrial, exhibiendo altos niveles de caspasa-3 y caspasa-9, así como altas proporciones de proteína 4 similar a bcl-2 (Bax)/ linfoma de células B-2 (Bcl-2). (Chernousova & Epple, 2013; Dayem et al., 2017; Liao et al., 2019).

### Desestabilización del fagosoma y lisosoma generada por las NPMs

Existiría un efecto sinérgico en la interacción entre fagocitos y NPMs. Por un lado, la activación del fagosoma, potenciando la inducción de estrés celular, fomenta un aumento en la liberación de EROs y la producción de citoquinas (IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ), y por el otro, el contacto directo de NPMs con amplias áreas de superficie de las membranas celulares del fagocito, provocan daños y pérdida de la integridad de esta misma, ocasionando la fuga del contenido celular, afectando la sobrevivencia de la célula (Barros et al., 2018; Bondarenko et al., 2013).

Como se mencionó en la sección 3.6, una vez que las NPMs son reconocidas y endocitadas por las células fagocíticas, éstas terminan principalmente dentro de los endosomas, vesículas endocíticas que luego se fusionan con los lisosomas, orgánulos que presentan un pH bajo debido a que en su membrana poseen una bomba protónica ATPasa que transporta hidrogeniones (protones [H<sup>+</sup>]) desde el citosol hacia su interior (Xia et al., 2008). Esto último le permite facilitar la función de sus proteasas y enzimas hidrolíticas, las cuales están encargadas de ayudar a la degradación de sustancias biológicas (Mindell, 2012).

Un estudio informó de la captación de AuNP (16 nm) modificadas por péptidos cargados positivamente, por parte de los endosomas (Iversen et al., 2011). Una vez unido con el lisosoma, dentro de estas vesículas, se observó que las NPMs pueden absorber protones en respuesta a la acidificación de los endosomas

actuando como unas "esponjas de protones" (Iversen et al., 2011). Esto puede ser utilizado por las NPMs para romper las membranas de estas vesículas, y con ello, la liberación de proteasas y enzimas hacia el citosol, ocasionando serios daños al interior de la célula, provocando citotoxicidad e induciendo cascadas de señalización de muerte celular (Sharifi et al., 2012).

#### Daño en macromoléculas mediado por las MNPs

Como se dijo en las secciones 3.3 y 3.5, los RL son potencialmente dañinos para las macromoléculas celulares que incluyen lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El ADN es uno de los principales objetivos del EO y representa el primer paso involucrado en la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento celular (Shi et al., 2004). Los efectos genotóxicos pueden producirse por interacción directa de las NPMs con material genético o por daño secundario de las EROs inducidas por las NPMs. Las NPMs inducen aberraciones cromosómicas, roturas de cadenas de ADN, daño oxidativo del ADN y mutaciones (Xie et al., 2011). Se sabe que el  $\cdot\text{OH}$  reacciona con todos los componentes del ADN provocando la rotura de una sola hebra del ADN mediante la formación del aducto de ADN 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG). 8-OHdG es un biomarcador de lesiones de ADN mediadas por  $\cdot\text{OH}$  (Valavanidis et al., 2009). Un estudio que comparó NPMs que incluía Cu, Fe, Ti y Ag informó genotoxicidad mediada por EROs caracterizada por la formación de micronúcleos y daño en el ADN *in vivo* (Song et al., 2011).

Junto con el daño cromosómico, los RLs también interactúan con lípidos y proteínas, abundantemente presentes en las biomembranas, para producir productos de peroxidación lipídica asociados con mutagénesis. Los ácidos grasos poliinsaturados están sujetos a oxidación dando lugar a hidroperóxidos lipídicos como paso inicial en la generación de EROs (Ayala et al., 2014). Los metales prooxidantes como el Cu y el Fe reaccionan con estos hidroperóxidos lipídicos para inducir los productos finales que dañan el ADN, el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) que actúan como mediadores inflamatorios y factores de riesgo de carcinogénesis (Napierska et al., 2012; Shukla et al., 2011; Turski & Thiele, 2009). Los RLs inducidos por NPMs u iones metálicos pueden activar oncogenes como Ras. Cantidades excesivas de NPMs se han asociado con cánceres de piel, vejiga, hígado, pulmón y vías respiratorias (Manke et al., 2013).

#### Efectos tóxicos provocados por el tamaño y área de superficie de las NPMs

En particular, se ha observado que la toxicidad de NPMs (por ejemplo las de oro, plata y cobre) resultan ser mayor mientras más pequeños sean los tamaños (Ivask et al., 2014). Un estudio comprobó que mientras más pequeñas eran las AgNP (5 nm), mayor es la cantidad de iones  $Ag^+$  que se pueden liberar, a diferencia de las AgNP de mayores tamaños (11 nm) (Woo et al., 2008).

Algunos reportes también demuestran que el área superficial de las NPMs influye en la producción de EROs. Por ejemplo, en un estudio se observó que a

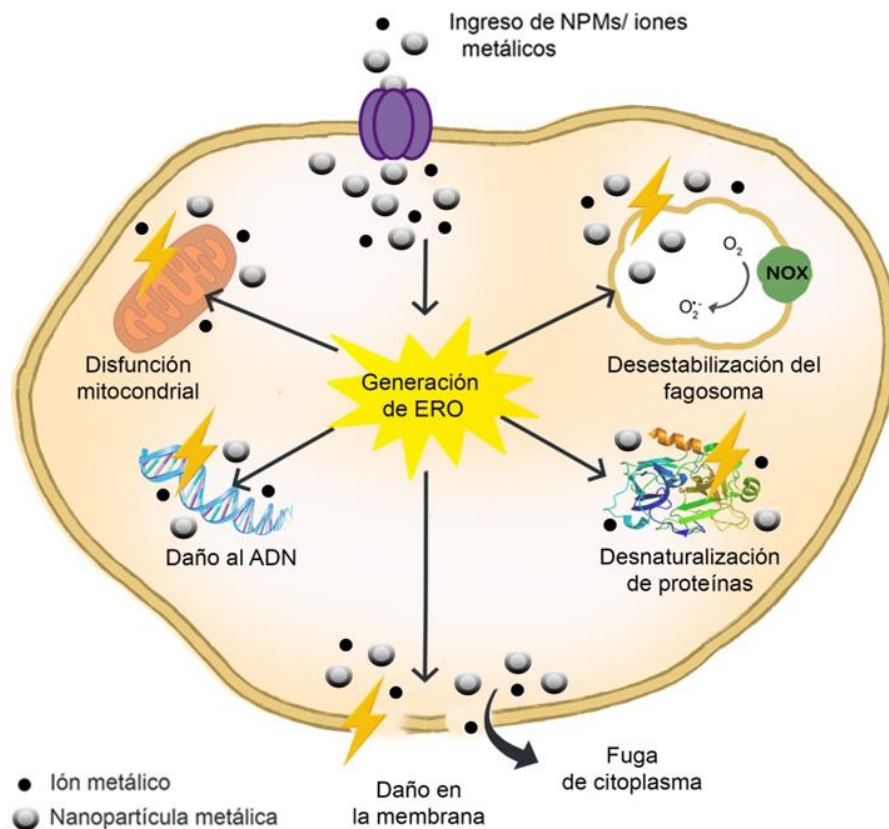
pesar de utilizarse la misma concentración de AgNPs, las de un tamaño de 15 nm produjeron mayores niveles de EROs que las de 50 nm, en macrófagos (Cho et al., 2009).

### Síntesis de los efectos nocivos causados por las NPMs

En síntesis, células de nuestro sistema inmune, en particular los macrófagos reconocen las NPMs como agentes extraños, y por ello desencadenan una serie de respuestas radicalarias e inflamatorias para eliminarlas. Pero a su vez, la inflamación puede potenciar la producción de EROs. El mecanismo de acción que comparten las NPMs es la interacción que ejercen sobre las membranas externas de las células diana desorganizándolas, alterando su permeabilidad y la respiración celular, provocándoles la muerte (Hajipour et al., 2012). El EO relacionado con la exposición a NPMs implica la disfunción de la respiración mitocondrial, la apoptosis mitocondrial, la activación del sistema NADPH oxidasa, el ataque oxidativo a macromoléculas y el agotamiento de las enzimas antioxidantes; todos los cuales están asociados con lesiones tisulares (Eftekhari et al., 2018). La respuesta de EROs impulsada por NPMs contribuye a la activación de las vías de señalización celular, las expresiones de citoquinas y quimioquinas inflamatorias y la activación de factores de transcripción específicos como NF-kB (Manke et al., 2013). La activación de estos mecanismos celulares está estrechamente relacionada con la transcripción de genes implicados en la inflamación, genotoxicidad y con el desarrollo de cáncer.

Por tanto, las consecuencias patológicas observadas durante la exposición a NPMs podrían atribuirse a la generación de EROs (Dayem et al., 2017).

La Figura 22 resume y propone los efectos oxidativos inducidos por las NPMs y la toxicidad resultante al interactuar con las células fagocíticas como macrófagos. Estos efectos son considerados clave en esta revisión y deben ser considerados al momento de usar y/o aplicar las NPMs.



**Figura 22. Mecanismo de toxicidad dependiente de estrés oxidativo inducido por nanopartículas metálicas sobre fagocitos.** Las NPMs ingresan al interior de las células a través de fagocitosis, proteínas integrales de membrana o también mediante endocitosis. Una vez dentro, ocurre una liberación de iones metálicos, los principales factores responsables de la generación de EROs, vía reacción de Fenton. Tras la exposición a NPMs, el exceso de producción de EROs conduce a daño oxidativo de la



membrana mitocondrial y cadena transportadora de electrones, produciendo su disfunción y proceso de apoptosis. Los fagosomas al interactuar con estos elementos exógenos (NPMs), generan cantidades masivas de EROs a través del complejo enzimático NOX, mientras que las EROs inducidas por las NPMs, a su vez, desestabilizan las membranas del fagosoma, liberando su contenido hacia el citoplasma. La generación de EROs también es capaz de inducir daño oxidativo del ADN, roturas de cadenas, demostrando así las características mutagénicas y cancerígenas asociadas a las NPMs; la desnaturalización de proteínas y la peroxidación lipídica a nivel de membrana celular, promoviendo su ruptura, y en consecuencia, la fuga del citoplasma hacia el espacio extracelular (Manke et al., 2013).

## **CAPÍTULO IV: CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES**

Comprender las implicancias biológicas y celulares del uso de NPMs, desde el punto de vista radicalario, y sus consecuencias oxidativas sobre las células del sistema inmune, resulta ser de suma importancia para aportar a la mejora del diseño, fabricación, y promoción de estrategias y procedimientos, que permitan mitigar o eludir estos mecanismos de toxicidad, no solo mejorando los estándares de seguridad de éstas herramientas para la salud humana (antes de su comercialización), sino que, también para poder ejercer más eficazmente su potencial terapéutico (Boraschi et al., 2017)

Los principales efectos deletéreos inducidos por la utilización de NPMs son atribuibles a sus propiedades fisicoquímicas, las que incluyen el tamaño de la partícula, el área de superficie, la composición química y la presencia de metales de transición. A pesar de que se comprende bien la toxicidad de muchos materiales a granel, no se sabe a qué concentración o tamaño pueden comenzar a exhibir nuevas propiedades toxicológicas debido a las dimensiones nanoscópicas (Sharifi et al., 2012).

Sin embargo, es en la generación de EROs mediadas por la interacción de las células inmunitarias con las NPMs, actuando de forma sinérgica una sobre la otra, donde identificamos los principales mecanismos de daño que incluyen la activación de las células inmunitarias a través del complejo enzimático NOX, y

la acción e interferencia sobre la respiración celular que tiene lugar a nivel mitocondrial (Eftekhari et al., 2018).

La activación persistente de estas cascadas de señalización intracelulares, de tipo proinflamatorias, puede permitir el desarrollo de alteraciones de tipo clínicas. El desbalance redox producto del EO a través de NPMs ejerce resultados fisiopatológicos indeseables como genotoxicidad e inflamación, contribuyendo a la etiopatogenia de carcinogénesis, afecciones respiratorias, cardíacas, óseas, etc; además del desarrollo temprano de envejecimiento y de enfermedades relacionadas con la edad (Demencias, Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Diabetes tipo II, etc) (Rani et al., 2016).

Por todo lo anteriormente descrito, es fundamental incorporar estas respuestas biológicas adversas como herramienta de detección de los efectos tóxicos de las NPMs. Por ejemplo, la sobreexpresión de enzimas antioxidantes es indicativo de EO leve en las células, mientras que la apoptosis mitocondrial ocurre en condiciones de EO elevado (Manke et al., 2013).

Un estudio que pretenda medir los efectos oxidativos adversos asociados a la exposición a NPMs debe incluir, por un lado, una caracterización rigurosa de las NPMs a utilizar, y por otro lado, asignar marcadores de EO, como por ejemplo la presencia de moléculas / biomoléculas de daño oxidativo ( 4-HNE, MDA, carbonilos, 8-oxo.dG, etc); así como también, la evaluación de los niveles de actividad de la maquinaria antioxidante enzimática (SOD, CAT, GPX) como

criterios de valoración de toxicidad que permita predecir los potenciales riesgos asociados al uso de las diferentes NPMs (Manke et al., 2013).

Pese a todo lo descrito, hay que hacer énfasis en que los mecanismos asociados con la toxicidad y los peligros involucrados en el uso de NPMs, que dan como resultado la inducción de EROs, siguen sin esclarecerse del todo. Se requieren más estudios que investiguen los efectos de inmunotoxicidad de las NPMs o las reacciones inflamatorias para mejorar el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las NPs que puedan modular al sistema inmunológico (Dayem et al., 2017; Luo et al., 2015).

Para finalizar, aún queda mucho por investigar, explorar y descubrir sobre la caracterización de la interacción entre NPMs, células del sistema inmune y EROs, tomando en consideración que en la actualidad, si bien, por un lado el número de publicaciones basadas en el uso de NPMs aumenta significativamente a lo largo de los años; la gran mayoría de las publicaciones se centran en la síntesis y el desarrollo de nanomateriales novedosos, y menos del uno por ciento se han centrado en el impacto biológico de las NPMs (Sharifi et al., 2012).

Esta revisión narrativa podría incentivar a otras líneas de investigación para profundizar en los efectos adversos asociados al uso de las NPMs, considerando la relevancia que ello podría tener en el campo de la biomedicina.

## CAPÍTULO V: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17, 593–623.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 428–437.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>
- Ahumada, M., Bohne, C., & Alarcon, E. I. (2018). Protein capped nanosilver free radical oxidation : role of biomolecule capping on nanoparticle colloidal stability and protein oxidation †. *Chemical Communications*, 54, 4724–4727. <https://doi.org/10.1039/C7CC08629F>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Akong-Moore, K., Chow, O. A., von Köckritz-Blickwede, M., & Nizet, V. (2012). Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PLoS ONE*, 7(8), 1–7.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042984>

Allavena, P., Chieppa, M., Monti, P., & Piemonti, L. (2004). From Pattern Recognition Receptor to Regulator of Homeostasis : The Double-Faced Macrophage Mannose Receptor. *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Immunology*, 24(3), 179–192.

Amini, P., Stojkov, D., Felser, A., Jackson, C. B., Courage, C., Schaller, A., Gelman, L., Soriano, M. E., Nuoffer, J. M., Scorrano, L., Benarafa, C., Yousefi, S., & Simon, H. U. (2018). Neutrophil extracellular trap formation requires OPA1-dependent glycolytic ATP production. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05387-y>

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, 30, 459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>

Arole, V. M., & Munde, S. V. (2014). Fabrication of Nanomaterials Top-Down and Bottom-Up Approaches - An Overview. *JAAST:Material Science (Special Issue)*, 1(2), 2–89. <https://pdfs.semanticscholar.org/34f8/921434fb256c9c8cca886722b5c920a1e4d2.pdf>

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/360438>

Bagheri, S., Yasemi, M., Safaie-Qamsari, E., Rashidiani, J., Abkar, M., Hassani, M., Mirhosseini, S. A., & Kooshki, H. (2018). Using gold nanoparticles in diagnosis and treatment of melanoma cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup1), 462–471.

<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1430585>

Barros, C. H. N., Fulaz, S., Stanisic, D., & Tasic, L. (2018). Biogenic nanosilver against multidrug-resistant bacteria (MDRB). *Antibiotics*, 7(3), 1–24.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics7030069>

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 1–15.

<https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

Behra, R., Sigg, L., Clift, M. J. D., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2013). Bioavailability of silver nanoparticles and ions: From a chemical and biochemical perspective. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(87).

<https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0396>

Bell, J. K., Mullen, G. E. D., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like

receptors. *Trends in Immunology*, 24(10), 528–533.

[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00242-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00242-4)

Bhardwaj, V., & Kaushik, A. (2017). Biomedical applications of nanotechnology and nanomaterials. *Micromachines*, 8(10), 298.

<https://doi.org/10.3390/mi8100298>

Bianchi, M. E. (2007). DAMPs , PAMPs and alarmins : all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(January), 1–5.

<https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>

Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E., & Faupel, F. (2012). Advances in top – down and bottom – up surface nanofabrication : Techniques , applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 170(1–2), 2–27. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.11.001>

Biswas, S. K. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox ? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 17–19.

Björnsdóttir, H., Welin, A., Michaëlsson, E., Osla, V., Berg, S., Christenson, K., Sundqvist, M., Dahlgren, C., Karlsson, A., & Bylund, J. (2015). Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1024–1035. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398>



- Boisseau, P., & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*, 12(7), 620–636.  
<https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>
- Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., Kurvet, I., & Kahru, A. (2013). Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064060>
- Boraschi, D., Italiani, P., Palomba, R., Decuzzi, P., Duschi, A., Fadeel, B., & Moghimi, S. M. (2017). Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence. *Seminars in Immunology*, 34(August), 33–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.013>
- Buonocore, G., & Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity : chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15, 186–190. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2010.04.003>
- Canton, I., & Giuseppe, B. (2012). Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2545–2561. <https://doi.org/10.1039/c2cs15260f>
- Castle, S. C. (2000). Clinical Relevance of Age-Related Immune Dysfunction. *Clinical Infectious Diseases*, 31(2), 578–585.
- Charles A. Janeway, J. and, & Medzhitov, R. (2003). Innate Immune Recognition.  
[Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Immunol.20.083001.084359](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Immunol.20.083001.084359), 197–216.

- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, *14*, 450–464.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Chen, Q., Li, J., & Li, Y. (2015). A review of plasma-liquid interactions for nanomaterial synthesis. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *48*(42), 424005. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/48/42/424005>
- Chen, X., Song, M., Zhang, B., Zhang, Y., & Ros, M. (2016). Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment burst. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 11–16.
- Chernousova, S., & Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie - International Edition*, *52*(6), 1636–1653. <https://doi.org/10.1002/anie.201205923>
- Cho, W. S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H. Y., Han, B. S., Kim, S. H., Kim, H. O., Lim, Y. T., Chung, B. H., & Jeong, J. (2009). Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *236*(1), 16–24.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.023>
- Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C. K., & Roy, S. (2015). Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and

Regeneration. *American Journal of Pathology*, 185(10), 2596–2606.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.001>

Dayem, A. A., Hossain, M. K., Lee, S. Bin, Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y., & Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>

Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000). The Immune System. *The New England Journal of Medicine*, 343(1), 37–49.

<https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107>

Díaz, B., Sánchez-Espinel, C., Arruebo, M., Faro, J., De Miguel, E., Magadán, S., Yagüe, C., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R., Santamaría, J., & González-Fernández, Á. (2008). Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small*, 4(11), 2025–2034. <https://doi.org/10.1002/smll.200800199>

Digiacomio, L., Pozzi, D., Palchetti, S., Zingoni, A., & Caracciolo, G. (2020). Impact of the protein corona on nanomaterial immune response and targeting ability. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(4), 1–15. <https://doi.org/10.1002/wnan.1615>

Dobrovolskaia, M. A. (2015). Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: Challenges, considerations and strategy.

*Journal of Controlled Release*, 220, 571–583.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.056>

Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2(8), 469.

[https://doi.org/10.1142/9789814287005\\_0029](https://doi.org/10.1142/9789814287005_0029)

Dobrovolskaia, M. A., Shurin, M., & Shvedova, A. A. (2016). Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299, 78–89.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.022>

Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857–902.

<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>

Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34–50.

<https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>

Eftekhari, A., Dizaj, S. M., Chodari, L., Sunar, S., Hasanzadeh, A., Ahmadian, E., & Hasanzadeh, M. (2018). The promising future of nano-antioxidant therapy against environmental pollutants induced-toxicities. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103(February), 1018–1027.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.126>

- Elliott, J. A., Shibuta, Y., Amara, H., Bichara, C., & Neyts, E. C. (2013). Atomistic modelling of CVD synthesis of carbon nanotubes and graphene. *Nanoscale*, 5(15), 6662–6676. <https://doi.org/10.1039/c3nr01925j>
- Erard, M., Dupré-Crochet, S., & Nüße, O. (2018). Biosensors for spatiotemporal detection of reactive oxygen species in cells and tissues. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 314(5), R667–R683. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00140.2017>
- Eustis, S., & El-Sayed, M. A. (2006). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*, 35(3), 209–217. <https://doi.org/10.1039/b514191e>
- Fatima, F., Bajpai, P., Pathak, N., Singh, S., Priya, S., & Verma, S. R. (2015). Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. *BMC Microbiology*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0391-y>
- Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5(14), 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008>

- Fierascu, R. C., Ortan, A., Avramescu, S. M., & Fierascu, I. (2019). Phyto-nanocatalysts: Green synthesis, characterization, and applications. *Molecules*, 24(19), 1–35. <https://doi.org/10.3390/molecules24193418>
- Figueiredo Borgognoni, C., Kim, J. H., Zucolotto, V., Fuchs, H., & Riehemann, K. (2018). Human macrophage responses to metal-oxide nanoparticles: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup2), 694–703. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1468767>
- Flora, S. J. S., Mittal, M., & Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, October, 501–523.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J. M., & Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, 110(1), 119–131. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00797-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00797-3)
- Gahlawat, G., Shikha, S., Chaddha, B. S., Chaudhuri, S. R., Mayilraj, S., &

- Choudhury, A. R. (2016). Microbial glycolipoprotein-capped silver nanoparticles as emerging antibacterial agents against cholera. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0422-x>
- Gasteiger, G., & Rudensky, A. Y. (2014). Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 14(9), 631–639. <https://doi.org/10.1038/nri3726>
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927–930. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01201-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01201-1)
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 44(3), 463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>
- Griffiths, H. R., Gao, D., & Pararasa, C. (2017). Redox regulation in metabolic programming and inflammation. *Redox Biology*, 12(February), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.023>
- Guo, D., Xie, G., & Luo, J. (2014). Mechanical properties of nanoparticles: Basics and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(1). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/1/013001>
- Gustafson, H., Holt-casper, D., Grainger, D. W., & Ghandehari, H. (2015). Nanoparticle uptake : The phagocyte problem. *Nano Today*. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.006>

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>

Halliwell, B. (1989). Tell me about free radicals , doctor : a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82(December), 747–752.

Halliwell, B. (2012a). Free radicals and antioxidants : updating a personal view.

*Nutrition Reviews*, 70(5), 257–265. [https://doi.org/10.1111/j.1753-](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x)

[4887.2012.00476.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x)

Halliwell, B. (2012b). The antioxidant paradox : less paradoxical now ? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 637–644.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x>

Heck, D. E., Shakarjian, M., Kim, H. D., Laskin, J. D., & Vetrano, A. M. (2010).

Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1203, 120–125. [https://doi.org/10.1111/j.1749-](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x)

[6632.2010.05603.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x)

Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., &

Uddin, M. J. (2018). Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies : A review. In *Journal of Advanced*



*Research*. Cairo University. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.005>

Howard, M. J., & Isacke, C. M. (2002). The C-type Lectin Receptor Endo180 Displays Internalization and Recycling Properties Distinct from Other Members of the Mannose Receptor Family \*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32320–32331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203631200>

Hrycay, E. G., & Bandiera, S. M. (2015). Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 74). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.003>

Hsueh, Y. H., Lin, K. S., Ke, W. J., Hsieh, C. Te, Chiang, C. L., Tzou, D. Y., & Liu, S. T. (2015). The antimicrobial properties of silver nanoparticles in bacillus subtilis are mediated by released Ag<sup>+</sup> ions. *PLoS ONE*, 10(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144306>

Indo, H. P., Yen, H. C., Nakanishi, I., Matsumoto, K., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H., Gusev, O., Cornette, R., Okuda, T., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Suenaga, S., Oki, M., & Sato, T. (2015). A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 56(1), 1–7. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.14>

Ingle, A. P., Duran, N., & Rai, M. (2014). Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. *Applied Microbiology*

*and Biotechnology*, 98(3), 1001–1009. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5422-8>

Iqbal, P., Preece, J. A., & Mendes, P. M. (2012). Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *Supramolecular Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc195>

Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., & Kahru, A. (2014). Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>

Iversen, T. G., Skotland, T., & Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6(2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.02.003>

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>

Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54(1), 1–13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>

Kehrer, J. P. (2000). The Haber – Weiss reaction and mechanisms of toxicity.

*Toxicology*, 149, 43–50.

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Koo, S. jie, & Garg, N. J. (2019). Metabolic programming of macrophage functions and pathogens control. *Redox Biology*, 24(March), 101198.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101198>

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34.

<https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>

Kumari, S., Mg, S., & Mayor, S. (2010). Endocytosis unplugged: Multiple ways to enter the cell. *Cell Research*, 20(3), 256–275.

<https://doi.org/10.1038/cr.2010.19>

Lay, S. Le, Simard, G., Martinez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2014).

Oxidative Stress and Metabolic Pathologies : From an Adipocentric Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.

Le Ouay, B., & Stellacci, F. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today*, 10(3), 339–354.

<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>

- Lebre, F., Hearnden, C. H., & Lavelle, E. C. (2016). Modulation of Immune Responses by Particulate Materials. *Advanced Materials*, 28(27), 5525–5541. <https://doi.org/10.1002/adma.201505395>
- Lech, M., & Anders, H. J. (2013). Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(7), 989–997. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.001>
- Lee, C. C., Avalos, A. M., & Ploegh, H. L. (2012). Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 168–179. <https://doi.org/10.1038/nri3151>
- Lee, J. M., & Kim, S. O. (2016). Enhancing organic solar cells with plasmonic nanomaterials. *ChemNanoMat*, 2(1), 19–27. <https://doi.org/10.1002/cnma.201500134>
- Leopold Wager, C. M., Hole, C. R., Wozniak, K. L., & Wormley, F. L. (2016). Cryptococcus and phagocytes: Complex interactions that influence disease outcome. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00105>
- Li, C., Wang, X., Chen, F., Zhang, C., Zhi, X., Wang, K., & Cui, D. (2013). The antifungal activity of graphene oxide-silver nanocomposites. *Biomaterials*, 34(15), 3882–3890. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.001>

- Li, J. J. en, Muralikrishnan, S., Ng, C. T., Yung, L. Y. L., & Bay, B. H. (2010). Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental Biology and Medicine*, 235(9), 1025–1033. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010021>
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Lim, J. J., Grinstein, S., & Roth, Z. (2017). Diversity and versatility of phagocytosis: Roles in innate immunity, tissue remodeling, and homeostasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00191>
- Luechinger, N. A., Grass, R. N., Athanassiou, E. K., & Stark, W. J. (2010). Bottom-up fabrication of metal/metal nanocomposites from nanoparticles of immiscible metals. *Chemistry of Materials*, 22(1), 155–160. <https://doi.org/10.1021/cm902527n>
- Luo, Y. H., Chang, L. W., & Lin, P. (2015). Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Research International*, 2015(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2015/143720>
- Ma, D. D., & Yang, W. X. (2016). Engineered nanoparticles induce cell apoptosis: Potential for cancer therapy. *Oncotarget*, 7(26), 40882–40903.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8553>

Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97–103.

Madden, O., Naughton, M. D., Moane, S., & Murray, P. G. (2015). Mycofabrication of common plasmonic colloids, theoretical considerations, mechanism and potential applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 225, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.08.003>

Mahla, R. (2015). Adipose Stem Cells Applications in Regenerative Medicine. *International Journal of Cell Biology*, 3(4), 1–24.  
<https://doi.org/10.1155/2016/6940283>

Mailloux, R. J. (2015). Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biology*, 4, 381–398.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.02.001>

Mailloux, R. J., & Harper, M. (2011). Free Radical Biology & Medicine  
Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6), 1106–1115.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.022>

Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-

induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, 2013.  
<https://doi.org/10.1155/2013/942916>

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 13(March), 1–13.  
<https://doi.org/10.12703/P6-13>

McLaughlin, S., Ahumada, M., Franco, W., Mah, T. F., Seymour, R., Suuronen, E. J., & Alarcon, E. I. (2016). Sprayable peptide-modified silver nanoparticles as a barrier against bacterial colonization. *Nanoscale*, 8(46), 19200–19203. <https://doi.org/10.1039/c6nr07976h>

McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8), 517–533. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>

McMillan, J., Batrakova, E., & Gendelman, H. E. (2011). Cell delivery of therapeutic nanoparticles. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 104). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00014-0>

Meo, S. Di, Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Mindell, J. A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annual Review of*

*Physiology*, 74, 69–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142317>

Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>

Moret-Tatay, I., Iborra, M., Cerrillo, E., Tortosa, L., Nos, P., & Beltrán, B. (2016). Possible biomarkers in blood for Crohn's disease: Oxidative stress and microRNAs - Current evidences and further aspects to unravel. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2325162>

Mottas, I., Milosevic, A., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., & Bourquin, C. (2017). A rapid screening method to evaluate the impact of nanoparticles on macrophages. *Nanoscale*, 9(7), 2492–2504. <https://doi.org/10.1039/c6nr08194k>

Murphy, C. J., Sau, T. K., Gole, A. M., Orendorff, C. J., Gao, J., Gou, L., Hunyadi, S. E., & Li, T. (2005). Anisotropic Metal Nanoparticles : Synthesis , Assembly , and Optical Applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 13857–13870.

Napierska, D., Rabolli, V., Thomassen, L. C. J., Dinsdale, D., Princen, C., Gonzalez, L., Poels, K. L. C., Kirsch-Volders, M., Lison, D., Martens, J. A.,



- & Hoet, P. H. (2012). Oxidative stress induced by pure and iron-doped amorphous silica nanoparticles in subtoxic conditions. *Chemical Research in Toxicology*, 25(4), 828–837. <https://doi.org/10.1021/tx200361v>
- Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nri1785>
- Needham, D., Arslanagic, A., Glud, K., Hervella, P., Karimi, L., Høeilund-Carlsen, P. F., Kinoshita, K., Mollenhauer, J., Parra, E., Utoft, A., & Walke, P. (2016). Bottom up design of nanoparticles for anti-cancer diapeutics: “put the drug in the cancer’s food.” *Journal of Drug Targeting*, 24(9), 836–856. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1238092>
- Nimse, S., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
- Nishanth, R. P., Jyotsna, R. G., Schlager, J. J., Hussain, S. M., & Reddanna, P. (2011). Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NFκB signaling pathway.

*Nanotoxicology*, 5(4), 502–516.

<https://doi.org/10.3109/17435390.2010.541604>

Nordenfelt, P., & Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(2), 271–284.

<https://doi.org/10.1189/jlb.0810457>

Nosaka, Y., & Nosaka, A. Y. (2017). Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis. *Chemical Reviews*, 117(17), 11301–11336. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00161>

Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO Journal*, 24(7), 1311–1317.

<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600599>

Ocampo, P. S., Lázár, V., Papp, B., Arnoldini, M., Zur Wiesch, P. A., Busa-Fekete, R., Fekete, G., Pál, C., Ackermann, M., & Bonhoeffer, S. (2014). Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4573–4582.

<https://doi.org/10.1128/AAC.02463-14>

Olive, C. (2012). Pattern recognition receptors: Sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert Review of Vaccines*, 11(2), 237–

256. <https://doi.org/10.1586/erv.11.189>

Orlowski, P., Tomaszewska, E., Gniadek, M., Baska, P., Nowakowska, J.,

Sokolowska, J., Nowak, Z., Donten, M., Celichowski, G., Grobelny, J., & Krzyzowska, M. (2014). Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection. *PLoS ONE*, *9*(8), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104113>

Pallardy, M. J., Turbica, I., & Biola-Vidamment, A. (2017). Why the immune system should be concerned by nanomaterials? *Frontiers in Immunology*, *8*(MAY), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00544>

Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, *16*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

Phan, H. T., & Haes, A. J. (2019). What Does Nanoparticle Stability Mean? [Review-article]. *Journal of Physical Chemistry C*, *123*(27), 16495–16507. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00913>

Pincetic, A., Bournazos, S., Dilillo, D. J., Maamary, J., Wang, T. T., Dahan, R., Fiebiger, B. M., & Ravetch, J. V. (2014). Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, *15*(8), 707–716. <https://doi.org/10.1038/ni.2939>

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). European Journal of Medicinal Chemistry The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Powers, K. W., Palazuelos, M., Moudgil, B. M., & Roberts, S. M. (2007). Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology*, 1(1), 42–51.  
<https://doi.org/10.1080/17435390701314902>

Prame Kumar, K., Nicholls, A. J., & Wong, C. H. Y. (2018). Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 551–565. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2753-2>

Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., & Yadav, U. C. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 148, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>

Rawat, R. S. (2015). Dense Plasma Focus - From Alternative Fusion Source to Versatile High Energy Density Plasma Source for Plasma Nanotechnology. *Journal of Physics: Conference Series*, 591(1).  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/591/1/012021>

Redza-dutordoir, M., & Averill-bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis

signalling pathways by reactive oxygen species. *BBA - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

Reichel, D., Tripathi, M., & Perez, J. M. (2019). Biological effects of nanoparticles on macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Nanotheranostics*, 3(1), 66–88. <https://doi.org/10.7150/ntno.30052>

Ren, G., Hu, D., Cheng, E. W. C., Vargas-Reus, M. A., Reip, P., & Allaker, R. P. (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(6), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004>

Ribas, V., García-Ruiz, C., & Fernández-checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5(July), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00151>

Rizvi, S. A. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>

Saallah, S., & Lenggoro, I. W. (2018). Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder and Particle Journal*, 2018(35), 89–111. <https://doi.org/10.14356/kona.2018015>

Salem, W., Leitner, D. R., Zingl, F. G., Schratler, G., Prassl, R., Goessler, W.,

Reidl, J., & Schild, S. (2015). Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(1), 85–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.11.005>

Schenten, D., & Medzhitov, R. (2011). The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System. In *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 109). Elsevier inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00003-0>

Schumann, J. (2016). It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. *European Journal of Pharmacology*, 785, 18–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.057>

Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M. L., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2323–2343. <https://doi.org/10.1039/c1cs15188f>

Shi, H., Hudson, L. G., & Liu, K. J. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5), 582–593. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.012>

Shukla, R. K., Sharma, V., Pandey, A. K., Singh, S., Sultana, S., & Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 231–241.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.11.008>

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748.

Sohrabnezhad, S. H., Mehdipour Moghaddam, M. J., & Salavatiyan, T. (2014). Synthesis and characterization of CuO-montmorillonite nanocomposite by thermal decomposition method and antibacterial activity of nanocomposite. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 125, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.01.080>

Song, M. F., Li, Y. S., Kasai, H., & Kawai, K. (2011). Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50(3), 211–216. <https://doi.org/10.3164/jcbn.11-70>

Sperling, R. A., & Parak, W. J. (2010). Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal Inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1915), 1333–1383.  
<https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>

Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T.,

- Matsumoto, A., ... Kodama, T. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. In *Nature* (Vol. 386, Issue 6622, pp. 292–296). <https://doi.org/10.1038/386292a0>
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., & Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases : the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6), 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.014>
- Swanson, J. A., & Hoppe, A. D. (2004). The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(6), 1093–1103. <https://doi.org/10.1189/jlb.0804439>
- Takeda, K., Kaisho, T., & Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 335–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tang, Yang. (2017). Copper Indium Gallium Selenide Thin Film Solar Cells. *Nanostructured Solar Cells*. <https://doi.org/10.5772/65291>
- Tang, Yulin, He, R., Zhao, J., Nie, G., Xu, L., & Xing, B. (2016). Oxidative stress-induced toxicity of CuO nanoparticles and related toxicogenomic responses



in *Arabidopsis thaliana* \*. *Environmental Pollution*, 212, 605–614.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.019>

Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., & Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 23, 901–944.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816>

Thaiss, C. A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., & Kurts, C. (2011). Chemokines: A new dendritic cell signal for cell activation. *Frontiers in Immunology*, 2(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00031>

Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., & Ma, N. (2015). Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 193–217.

<https://doi.org/10.3390/ijms16010193>

Thiruvengadathan, R., Korampally, V., Ghosh, A., Chanda, N., Gangopadhyay, K., & Gangopadhyay, S. (2013). Nanomaterial processing using self-assembly-bottom-up chemical and biological approaches. *Reports on Progress in Physics*, 76(6). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/76/6/066501>

Turski, M. L., & Thiele, D. J. (2009). New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 717–721. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800055200>

- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4), 668–676. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 27(2), 120–139. <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>
- Vance, R. E., Isberg, R. R., & Portnoy, D. A. (2009). Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host and Microbe*, 6(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.007>
- Walkey, C. D., Olsen, J. B., Guo, H., Emili, A., & Chan, W. C. W. (2012). Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *Journal of the American Chemical Society*, 134(4), 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>
- Wang, T. Y., Libardo, M. D. J., Angeles-Boza, A. M., & Pellois, J. P. (2017). Membrane Oxidation in Cell Delivery and Cell Killing Applications. *ACS Chemical Biology*, 12(5), 1170–1182. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00237>

- Wartha, F., Beiter, K., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2007). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 10(1), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.12.005>
- Welch, C. M., & Compton, R. G. (2006). The use of nanoparticles in electroanalysis: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(3), 601–619. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0230-3>
- Widlansky, M. E., & Gutterman, D. D. (2011). Regulation of Endothelial Function by Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(6). <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3642>
- Woo, K. J., Hye, C. K., Ki, W. K., Shin, S., So, H. K., & Yong, H. P. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2171–2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>
- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2008). Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. *ACS Nano*, 2(1), 85–96.
- Xie, H., Mason, M. M., & Wise, J. P. (2011). Genotoxicity of metal nanoparticles. *Reviews on Environmental Health*, 26(4), 251–268. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2011.033>
- Yamauchi, T., & Moroishi, T. (2019). Hippo Pathway in Mammalian Adaptive

Immune System. *Cells*, 8(5), 398. <https://doi.org/10.3390/cells8050398>

Yazdi, A. S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S. K., Tardivel, A., Couillin, I., & Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19449–19454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008155107>

Yin, H., Casey, P. S., McCall, M. J., & Fenech, M. (2010). Effects of Surface Chemistry on Cytotoxicity, Genotoxicity, and the Generation of Reactive Oxygen Species Induced by ZnO Nanoparticles. *Langmuir*, 26(19), 15399–15408. <https://doi.org/10.1021/la101033n>

Yokoyama, T., Masuda, H., Suzuki, M., Ehara, K., Nogi, K., Fuji, M., Fukui, T., Suzuki, H., Tatami, J., Hayashi, K., & Toda, K. (2018). Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles. In *Nanoparticle Technology Handbook*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64110-6.00001-9>

Zhang, W., Li, Y., Niu, J., & Chen, Y. (2013). Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects. *Langmuir*, 29(15), 4647–4651. <https://doi.org/10.1021/la400500t>

Zhang, Y., Geng, H., Zhou, Z., Wu, J., Wang, Z., Zhang, Y., Li, Z., Zhang, L.,

Yang, Z., & Hwang, H. L. (2012). Development of inorganic solar cells by nanotechnology. *Nano-Micro Letters*, 4(2), 124–134.

<https://doi.org/10.1007/BF03353703>

Zlotoff, D. A., & Bhandoola, A. (2011). Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217(1), 122–138. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05881.x>

Zolnik, B. S., González-Fernández, Á., Sadrieh, N., & Dobrovolskaia, M. A. (2010). Minireview: Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*, 151(2), 458–465. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1082>