

Regeneración en *Girardia* sp. (DugesIIDae) por efecto de nanopartículas de cobre sintetizadas por ablación láser

Brian Enrique Cornejo Roque^{1*}, Juan Carlos Rodríguez Soto¹, Marisol Contreras Quiñones¹, Cinthya Aspajo Villalaz¹, Abhel Calderón Peña¹, Eduardo León Alcántara¹, Cristhian Escobedo Paredes¹, Claver Wilder Aldama Reyna², Jhenry Agreda Delgado², Miguel Valverde Alva²

¹ Laboratorio de Citometría, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II, Trujillo, Perú.

² Laboratorio de Óptica y Láseres, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II, Trujillo, Perú.

* Autor para correspondencia: jrodriguez@unitru.edu.pe

Información de financiamiento

Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y Banco Mundial, N° 013-2018-FONDECYT-BM-IADT-SE.

Declaración de disponibilidad de datos

Toda la data relevante a la investigación se muestra dentro del mismo manuscrito.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno.

Contribución de los autores

B.C.: Recolección de datos, análisis e interpretación de los mismos; J.R.: Concepción, análisis e interpretación de los resultados y aprobación de la versión final; M.C.: Recolección de datos, análisis e interpretación de los mismos; C.A.: Recolección y análisis de los datos; A.C.: Recolección y análisis de los datos; E.L.: Recolección y análisis de los datos; C.E.: Recolección y análisis de los datos; C.A.: Diseño del montaje experimental y síntesis de las nanopartículas de cobre; J.A.: Diseño del montaje experimental; M.V.: Caracterización de las nanopartículas de cobre. Todos los autores han leído el manuscrito final y aprobado la revisión.

Recibido: 10 de Enero de 2020.

Aceptado: 20 de Febrero de 2020.

Publicado (digital): 30 Marzo 2020.

Publicado (impreso): 30 Abril 2020.

Cita bibliográfica:

Cornejo, B.; J. Rodríguez; M. Contreras; C. Aspajo; A. Calderón; E. León; C. Escobedo; C. Aldama; J. Agreda & M. Valverde. 2020. Regeneración en *Girardia* sp. (DugesIIDae) por efecto de nanopartículas de cobre sintetizadas por ablación láser. *Arnaldoa* 27 (1): e138-e141. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27113>

Resumen: *Girardia* sp. (DugesIIDae) constituye un modelo biológico útil para evaluar el efecto positivo de diferentes sustancias en los procesos regenerativos, al poseer una alta capacidad de regeneración, motivo por el cual la presente investigación determinó el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sobre dicha capacidad evaluando el tiempo de formación del individuo completo tras diferentes cortes realizados en los ejemplares de *Girardia* sp. Se empleó la técnica de ablación láser pulsada en medio líquido para la obtención de las nanopartículas y su posterior caracterización involucró el uso de microscopio electrónico para la determinación de la dimensión y forma de las mismas. Se realizó un Diseño experimental en bloques completamente aleatorizado, donde los siete tipos de fragmentos producto de cortes transversal, doble transversal y longitudinal constituyeron los bloques y las tres concentraciones de nanopartículas de cobre (0,225ppm, 0,450ppm, 0,900ppm) además de un testigo (0ppm) hicieron el papel de tratamientos. Al realizar las evaluaciones se encontró que el tratamiento con la concentración más alta (T4: 0,900ppm) produjo una mayor reducción del tiempo de formación del individuo completo en cada uno de los diferentes tipos de fragmentos, siendo el fragmento superior (Bloque I) el que mostró mayor diferencia de horas frente al testigo (215.2 a 220.2 horas). Se concluyó que a mayor concentración de nanopartículas en las concentraciones evaluadas el proceso de regeneración se reduce.

Palabras clave: *Girardia* sp., regeneración, nanopartículas de cobre, ablación láser.

Abstract: *Regeneration in Girardia sp. by effect of copper nanoparticles synthesized by laser ablation.* *Girardia* sp. (DugesIIDae) constitutes a useful biological model to evaluate the positive effect of different substances in the regenerative processes, as it has a high regeneration capacity, which is why this research determined the effect of different concentrations of copper nanoparticles on this capacity, evaluating the time of formation of the complete individual after different cuts made in the *Girardia* sp. The technique of pulsed laser ablation in liquid medium was used to obtain the nanoparticles and its subsequent characterization involved the use of electronic microscope to determine their size and shape. An experimental design was carried out in completely randomized blocks, where the seven types of fragments product of transverse, double transverse and longitudinal cuts constituted the blocks and the three concentrations of copper nanoparticles (0.225ppm, 0.450ppm, 0.900ppm) in addition to a witness (0ppm) played the role of treatments. During the evaluations it was found that the treatment with the highest concentration (T4: 0.900ppm) produced a greater reduction in the time of formation of the complete individual in each of the different types of fragments, being the superior fragment (Block I) the one that showed greater difference of hours in front of the control (215.2 to 220.2 hours). It was concluded that the higher the concentration of nanoparticles in the evaluated concentrations the regeneration process is reduced.

Keywords: *Girardia* sp., regeneration, copper nanoparticles, laser ablation.

INTRODUCCIÓN

Las “planarias” pertenecen a la clase Turbellaria y se caracterizan por ser organismos de vida libre, ser acelomados triploblásticos y poseer simetría bilateral, probablemente los más primitivos con esta simetría. La reproducción de estos animales se ve facilitada gracias a su condición hermafrodita simultánea (Pechenik, 2016; Myers *et al.*, 2018), sin embargo, es su reproducción asexual por fragmentación lo que ha llamado la atención del mundo científico. *Girardia* sp. (Dugesidae) como el resto de planarias son reconocidas por su alta capacidad regenerativa debido a las células madre pluripotentes que posee y que se encuentran distribuidas en todo su organismo, por lo que son consideradas organismo modelo para el estudio de la regeneración (Bely, 2010).

La capacidad presente en estos organismos genera un interés por la búsqueda continua de nuevas metodologías para hacer frente a los millones de casos anuales de aparición de heridas de diferente origen, la cual se convierte en un desafío terapéutico constante (Asto, 2015). Las proteínas Wnt tienen un papel en el proceso regenerativo y homeostático, además de ser un regulador crítico de las células madre (Logan & Nuse, 2004). Durante la regeneración se forma una estructura especializada llamada blastema en el sitio de daño, la cual es producto de la proliferación de un conjunto de células troncales pluripotentes, llamados neoblastos. A partir del blastema, los tejidos afectados por la injuria comienzan a formarse (Iannacone & Tejada, 2007; Ramírez, 2018).

La nanociencia trae ahora consigo el empleo de diferentes nanomateriales y nanopartículas, que, gracias a sus propiedades, han podido ser empleados en diversos campos de la ciencia. La nanotecnología posee una gran gama de técnicas que permiten la manipulación de la materia a escala atómica y molecular. Su importancia radica en que los materiales a escala de aproximadamente entre 1 y 100 nanómetros, llamadas nanopartículas (NPs), presentan propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las que la misma materia presenta en escala mayor, característica por la cual atraen la atención de numerosos investigadores (Minakshi *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2014).

En los últimos años, las investigaciones se han encaminado hacia el control de la forma y el tamaño de nanopartículas metálicas debido a sus propiedades magnéticas, catalíticas, eléctricas y ópticas de nanoestructuras metálicas para obtener materiales con propiedades novedosas. La relación existente entre sus propiedades ya sean físicas o químicas y su tamaño es lo que permiten que sean aplicadas en diferentes áreas tales como la medicina, óptica, biología, entre otros (Khlebtsov & Dykman, 2010; Arana, 2018).

El cobre desempeña un papel vital ya que es considerado uno de los metales más importantes en las tecnologías modernas. Las nanopartículas de cobre (NPs_{Cu}) poseen reconocida actividad bactericida frente a ciertos organismos patógenos tales como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* y otros (Cooner, 1995; Kamyshny *et al.*, 2011). Las NPs_{Cu} poseen además actividad catalizadora de reducción en el electro-remediación de aguas contaminadas y catalizadores de desintoxicación de gas (Barrabés *et al.*, 2006) y actividad

conductora térmica y microelectrónica (Jeong *et al.*, 2008; Rengifo, 2016).

La obtención de nanopartículas puede darse por diferentes métodos, pero son los métodos físicos los que están resultando más amigables al medio ambiente por la ausencia de sustancias no deseadas y por la alta pureza de la síntesis. Métodos como la irradiación de protones, ablación láser, deposición de vapor a vacío y métodos por radiación son capaces de producir una amplia gama de NPs metálicas con poco esfuerzo para modificar el proceso para cada tipo de material (Rengifo, 2016). La ablación láser es un método físico que permite obtener nanopartículas coloidales haciendo uso de una gran variedad de disolventes (Díaz, 2013).

Es importante entonces determinar el efecto de las diferentes nanopartículas metálicas sobre la capacidad regenerativa en sistemas biológicos; por lo que en la presente investigación se buscó determinar el efecto de diferentes concentraciones de NPs_{Cu} sobre la capacidad de regeneración de *Girardia* sp.

MATERIAL Y MÉTODO

Los ejemplares de *Girardia* sp. fueron colectados en la Zona de Conache, en el distrito Laredo, Provincia Trujillo, con coordenadas 08°06.477" S 078°56.3339" W. en las riveras de un cuerpo de agua evaluado previamente como fuente de población de planarias de agua dulce. La determinación taxonómica del género *Girardia* sp. se llevó a cabo en el Laboratorio de Zoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

La obtención de las nanopartículas de cobre se realizó mediante un proceso de síntesis verde conocido como ablación láser pulsada en medios líquidos (Ageda & Aldama, 2016; Aldama *et al.*, 2018) donde se irradió con disparos de un láser pulsado Nd:YAG de longitud de onda IR de 1064 nm y 37,5 mJ/pulso a una razón de repetición de 10 Hz sobre una placa de cobre de alta pureza y de dimensiones 15x15x1 mm³ sumergida en 20 ml de agua bidestilada durante 10 minutos, obteniéndose nanopartículas esféricas de cobre con un tamaño promedio de 22 nm a una concentración de 0.900 ng/L obtenida por espectroscopia de absorción atómica (Rivera *et al.*, 2016).

El sistema biológico consistió en evaluar el tiempo de regeneración de individuo completo de cada tipo de fragmento de *Girardia* sp. sometido a diferentes concentraciones de NPs_{Cu}, desarrollando un diseño experimental en bloques completamente aleatorizado. Se realizaron tres tipos de corte transversal, doble transversal y longitudinal obteniéndose siete bloques: fragmento superior (bloque I), inferior (bloque II), cefálico (bloque III), medio (bloque IV), caudal (bloque V), inferior (bloque VI) y derecho (bloque VII). Dentro de cada bloque se analizó el efecto de los cuatro tratamientos (0ppm, 0.225ppm, 0.450ppm, 0.900ppm) contando diez repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos se los organizó en tablas, gráficos y figuras. Se aplicó el respectivo análisis de varianza y comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de determinar el efecto de diferentes concentraciones de NPsCu (0 ppm; 0.225 ppm; 0.45 ppm y 0.9 ppm.) sobre la capacidad de regeneración de *Girardia* sp., se enfrentó los diferentes fragmentos a las diferentes concentraciones de NPsCu evaluando el tiempo de regeneración del individuo completo en horas (Fig. 1). El análisis de varianza mostró diferencias significativas tanto para los tratamientos como para los bloques.

En la Figura 1, los tiempos promedios de regeneración de los diferentes fragmentos de *Girardia* sp. a individuo completo muestran una disminución significativa e importante. A una mayor concentración de NPsCu se observó menor tiempo de regeneración en cada uno de los diferentes tipos de fragmento. Esto se debería a que las NPsCu estarían actuando en el complejo de regeneración de *Girardia* sp. de manera que el proceso de formación de individuo completo se ve acelerado, contando además con la reconocida actividad bactericida que poseen las NPsCu (Kamyshny *et al.*, 2011)

En "planarias" (*Girardia* sp.), luego de la injuria, la primera etapa del proceso de regeneración, se da por contracción muscular de la zona adyacente a la herida reduciendo su superficie, luego es cubierta por una capa protectora de mucopolisacárido. Posteriormente, las células madre, llamadas neoblastos, se activan por mecanismos poco conocidos y se acumulan en la herida donde, luego, su descendencia formará el blastema de regeneración (Eisenhoffer *et al.*, 2008; Wenemoser & Reddien, 2010; Rodríguez, 2015), acción que estaría siendo estimulada por las nanopartículas de cobre.

Si se toma en cuenta solo los promedios globales por tratamientos, se muestran reducidas pero significativas diferencias, donde el tratamiento T4 (0.9ppm NPsCu) obtuvo el menor tiempo de formación de individuo completo, con 235.60

horas en promedio frente a las 238.87 horas obtenidas por el tratamiento control (0ppm NPsCu). Si se tomase en cuenta los datos por los bloques, observamos que el tratamiento 4 (0.9ppm) en el bloque I (fragmento superior) obtuvo el tiempo más corto de formación de individuo completo, siendo este de 215.2 horas en promedio frente al testigo 220.2 horas (0ppm), resultados semejantes fueron obtenidos por Arana (2018) y Ramírez (2018) quienes emplearon nanopartículas de oro y plata respectivamente.

La reducción en el tiempo de regeneración del individuo completo por bloques empleando la mayor concentración de NPsCu (0.9ppm) nos señala que los fragmentos que contienen la parte cefálica (bloque I y III) regeneran en menor tiempo (215.2 y 221.9 horas respectivamente); a diferencia de los fragmentos por corte longitudinal (bloques VI y VII) que obtuvieron los mayores tiempos (253,0 y 256,0 horas respectivamente). Esto se debería a la presencia de los ganglios cerebrales, así como una mayor parte del cordón nervioso en los fragmentos superiores, haciendo que este se vea estimulado más tempranamente a la formación de blastema frente al caso de otro tipo de fragmento.

El control de la polaridad regenerativa y del correcto posicionamiento de la diferenciación de los neoblastos, está asociada a la vía de BMP (Bone Morphogenetic Proteins), cuya función es análoga en la embriogénesis en otros animales (Molina *et al.*, 2007). De igual manera, la vía de señalización Wnt, requerida por todos los metazoos para formar el patrón antero-posterior durante la embriogénesis, juega un papel central tanto durante la regeneración y la identidad posterior (Adell *et al.*, 2009; Oviedo *et al.*, 2010). Por lo tanto, nuestros resultados se muestran interesantes para futuros estudios en otros animales de experimentación o en heridas humanas producto de quemaduras.

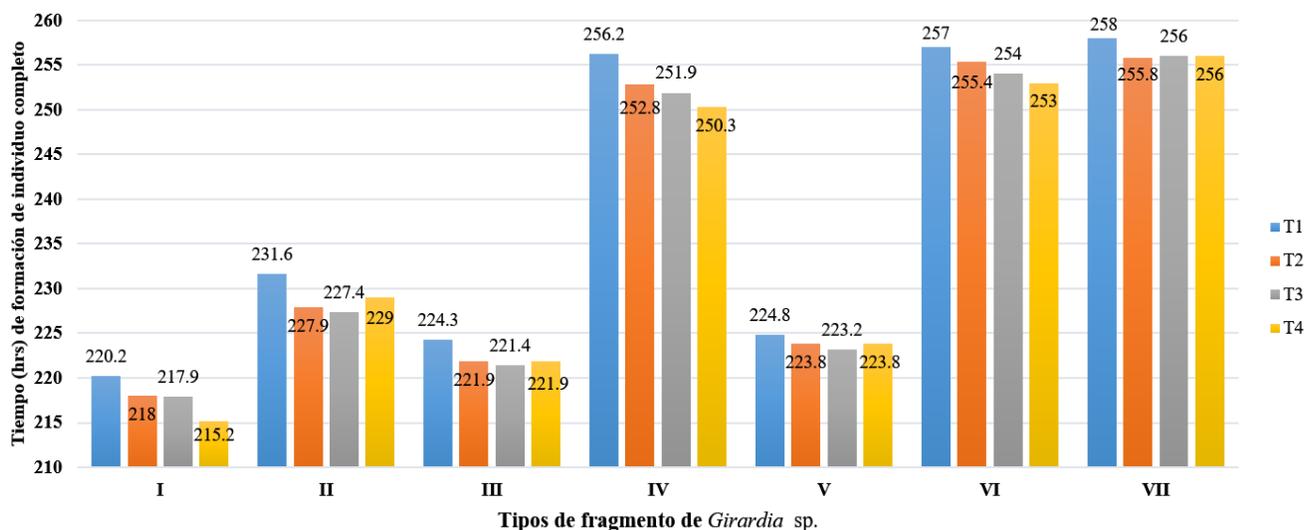


Figura 1. Tiempo en horas de formación del individuo completo a partir de diferentes fragmentos de *Girardia* sp. sometidos a cuatro concentraciones diferentes de nanopartículas de cobre. **Tratamientos**, Concentraciones de nanopartículas de cobre, T1: 0ppm, T2: 0.225ppm, T3: 0.450ppm, T4: 0.9ppm. **Bloques**: I: Fragmento superior, II: Fragmento inferior, III: Fragmento izquierdo, IV: Fragmento derecho, V: Fragmento cefálico, VI: Fragmento medio, VII: Fragmento caudal.

Teniendo en cuenta que existe una similaridad entre los procesos a nivel celular y molecular, que se da tanto en las planarias como en el ser humano, podría deducirse el efecto positivo que sería alcanzado en tejidos *in vivo* aplicando las diferentes concentraciones de NPsCu evaluadas en la presente investigación, pues los resultados obtenidos muestran que las NPsCu influyen de manera positiva en la formación de blastema y regeneración de los tejidos perdidos.

CONCLUSIÓN

Las nanopartículas de cobre, a las concentraciones trabajadas, tienen un efecto positivo en la capacidad de regeneración de la planaria *Girardia* sp. (Dugesidae) a mayor concentración de nanopartículas el tiempo de regeneración disminuye.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y al Banco Mundial por el financiamiento de la presente investigación mediante el Proyecto "Síntesis de nanopartículas metálicas y su efecto sobre la regeneración biológica" con Contrato N° 013-2018-FONDECYT-BM-IADT-SE.

LITERATURA CITADA

- Adell, T.; Cebriá, F. & E. Saló.** 2009. Gradients in planarian regeneration and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(1).
- Agreda, J. & W. Aldama.** 2016. Estudio fotoacústico de los efectos del tiempo de ablación en la síntesis de nanopartículas de plata. *Ciencia y Tecnología*, 12(1): 17-26.
- Aldama, W.; J. Agreda; M. Valverde & L. Angelats.** 2018. Photoacoustic study of Changes in Optical Properties of Colloids with Silver Nanoparticles Produced by Laser Ablation. *International Journal of Applied Engineering Research*, 13(2):1408-1414.
- Arana, M.** 2018. Efecto de nanopartículas de oro sobre la capacidad de regeneración de *Dugesia tigrina*. Tesis para optar por el título de Biólogo, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Asto, S.** 2015. Evaluación de la actividad cicatrizante de extractos de hojas de llantén de páramo (*Plantago australis*) en lesiones inducidas en ratones (*Mus musculus*). Tesis para Título. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Barrabés, N.; J. Just; A. Dafinov; F. Medina; J. Fierro; J. E. Suerias & Y. Cesteros.** 2006. Catalytic Reduction of Nitrate on Pt-Cu and Pd-Cu on Active Carbon using continuous reactor: The effect of Cooper Nanoparticles. *Catalysis B: Environmental*, 62(1): 77-85.
- Bely, A.** 2010. Evolutionary loss of animal regeneration: pattern and process. *Integrative and comparative biology*, 50(4): 515-527
- Cooner, T.** 1995. *Infest Control Hosp. Epidemiol*, 16(1):144.
- Díaz, M.** 2013. Obtención de nanopartículas de plata por ablación láser soportadas en hilo de sutura de seda. Universidad Autónoma del estado de México, México.
- Eisenhoffer, G.; H. Kang & A. Sánchez.** 2008. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell*, 3(3): 327-339.
- Iannacone, J. & M. Tejada.** 2007. Empleo de la regeneración de la planaria de agua dulce *Girardia festae* (Borelli, 1998) (Tricladida: Dugesidae) para evaluar la toxicidad del carbofurano. *Neotropical Helminthology*, 1(1): 7-13.
- Jeong, S.; K. Woo; D. Kim; S. Lim; J. Kim; H. Shin & J. Moon.** 2008. Controlling the Thickness of the Surface Oxide Layer on Cu Nanoparticles for the Fabrication of Conductive structures by ink-jet printing. *Advanced functional materials*, 18(5): 679-686.
- Kamyshny, A.; J. Steinke & S. Magdassi.** 2011. Metal-based inkjet inks for printed electronics. *The Open applied physics journal*, 4(1): 19-36.
- Khan, A.; R. Rashid; G. Murtaza & A. Zahra.** 2014. Gold nanoparticles: synthesis and applications in drug delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13(7):1169-117.
- Khlebtsov, N. & L. Dykman.** 2010. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *JQuantitat Spectroscop Radiat Transf* 111(1): 1-35.
- Logan, C. & R. Nuse.** (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20(1): 781-810.
- Minakshi, D.; H. Kyu; S. Seong & K. Dong.** 2011. Review on gold nanoparticles and their applications. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 3(4):193-205.
- Molina, M.; E. Saló & F. Cebriá.** 2007. The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev Biol*, 311(1): 79-94.
- Myers, P.; R. Espinosa; C. Parr; T. Jones; H. Hammond & T. Dewey.** 2018. The Animal Diversity Web (online). Accessed at <https://animaldiversity.org>
- Oviedo, N.; J. Morokuma; P. Walentek; I. Kema; M. Gu; J. Ahn & M. Levin.** 2010. Long-range neural and gap junction protein-mediated cues control polarity during planarian regeneration. *Dev Biol*, 339(1): 188-199.
- Pechenik, J.** 2016. *Biología dos Invertebrados*. 7a ed. McGraw Hill Brasil.
- Ramírez, O.** 2018. Efecto de nanopartículas de plata sobre la capacidad de regeneración de *Dugesia tigrina*. Tesis para optar por el título profesional de Biólogo, Universidad Nacional de Trujillo.
- Rengifo, J.** 2016. Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre por el proceso poliol asistido vía microondas. Tesis para optar por el título profesional de Químico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Rivera, J.; W. Aldama & E. V. Mejía.** 2016. Amplitud fotoacústica en función de la concentración de coloides con nanopartículas de oro obtenidos por ablación láser. *Ciencia y Tecnología*, 12(2): 77-89.
- Rodríguez, G.** 2015. Caracterización del neoblasto como modelo de célula madre. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona.
- Wenemoser, D. & P. W. Reddien.** 2010. Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev Biol*, 344(2), 979-991.