



Universidad de Oviedo  
Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

*“Estudio de las aplicaciones  
biomédicas de nanopartículas de  
diversa naturaleza”*

Sara González Fernández

Junio 2016

Departamento de Biología Funcional  
(Área de Microbiología)

Trabajo Fin de Máster

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
1.1. NANOMEDICINA .....	9
1.2. BIODISTRIBUCIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS EN EL ORGANISMO .....	10
1.3. FUNCIONES TERAPÉUTICAS .....	11
1.3.1. <i>Cáncer</i> .....	11
1.3.2. <i>Sustitución y regeneración de órganos</i> .....	13
1.3.3. <i>Diabetes</i> .....	14
1.3.4. <i>Enfermedades renales</i> .....	15
1.3.5. <i>Enfermedades cardiovasculares</i> .....	16
1.3.6. <i>Infecciones</i> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. MICROORGANISMOS .....	25
3.1.1. <i>Bacterias</i> .....	25
3.1.2. <i>Levaduras</i> .....	26
3.2. CULTIVOS CELULARES .....	26
3.3. NANOESTRUCTURAS .....	26
3.4. ENSAYO DE INTERACCIÓN .....	27
3.4.1. <i>Solución bacteriana</i> .....	27
3.4.2. <i>Solución fúngica</i> .....	28
3.4.3. <i>Líneas celulares</i> .....	28
3.4.4. <i>Interacción entre nanopartículas y bacterias</i> .....	28
3.4.5. <i>Interacción entre nanopartículas y levaduras</i> .....	28
3.5.6. <i>Interacción entre nanoestructuras y células</i> .....	29
3.5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>

4.1. ACTIVIDAD SOBRE BACTERIAS.....	30
4.1.1. <i>Nanopartículas magnéticas</i> .....	30
4.1.2. <i>Nanopartículas no magnéticas de plata</i> .....	31
4.2. ACTIVIDAD SOBRE LEVADURAS .....	35
4.2.1. <i>Nanohilos magnéticos</i> .....	35
4.2.2. <i>Nanoelementos no magnéticos de plata</i> .....	37
4.3. ACTIVIDAD SOBRE CÉLULAS HUMANAS .....	37
4.3.1. <i>Nanoestructuras magnéticas</i> .....	38
4.3.2. <i>Nanoestructuras no magnéticas de plata</i> .....	40
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>46</b>

## RESUMEN

Las nanopartículas son elementos menores de 100 nanómetros con uso potencial en diversos campos entre el que destaca la biomedicina. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad biocida de nanoelementos de distinta naturaleza frente a varias especies bacterianas, levaduras y células humanas. En estos ensayos se utilizaron cinco bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella* sp., *Serratia* sp. y *Salmonella* sp.), seis bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus globisporus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*), las levaduras *Candida albicans* y *Sacharomyces .cerevisiae*, La línea celular tumoral HeLa y la línea de epitelio de córnea HCE2 para probar dicho efecto. Las nanopartículas magnéticas no mostraron actividad biocida en ningún caso. Las nanopartículas de plata causaron una alta mortalidad, variable en función de su morfología, afectando las nanoesferas más a las bacterias, y los nanoanillos y nanohilos a las levaduras. Los nanoelementos de plata mostraron un efecto diferencial sobre células eucariotas tumorales y no tumorales, no afectando a estas últimas, pero induciendo apoptosis sobre las células tumorales, siendo los nanoanillos los más efectivos en generar daño celular. Estos datos abren la posibilidad de nuevas terapias para enfermedades infecciosas y tumorales.

Nanoparticles are smaller than 100 nanometers elements with potential use in various fields between highlighting biomedicine. The aim of this study was to determine the biocidal capacity of nanoclusters of different nature against various bacterial species, yeasts and eukaryotic cells. In these assays five Gram negative bacteria (*E. coli*, *H. influenzae*, *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., and *Salmonella* sp.), Six Gram positive (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. globisporus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*), *C.albicans*, *S.cerevisiae* and, HeLa cells and corneal epithelial cells to test the effect. The magnetic nanoparticles did not show biocidal activity. Silver nanoparticles produced high mortality, which depend on their morphology; nanospheres affected more bacteria and nanowires and nanorings affected more yeasts. Silver nanoelements showed a differential effect on tumor and normal eukaryotic cells, not affecting the latter, but inducing apoptosis on tumor cells, being

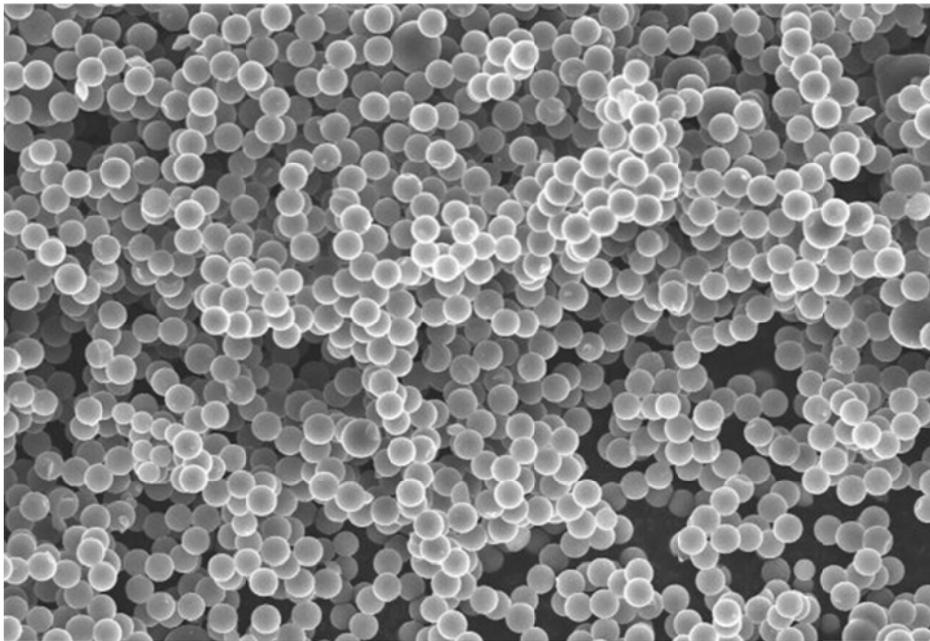
nanorings the fastest in generating cellular damage. These data raise the possibility of new therapies for infectious and tumor diseases.

## ABREVIATURAS

Células de epitelio de córnea .....	<b>HCE</b>
Infusión cerebro-corazón .....	<b>BHI</b>
Matriz extracelular .....	<b>MEC</b>
MicroARN.....	<b>ARNmi</b>
Nanoanillo.....	<b>NR</b>
Nanoanillo de plata .....	<b>AgNR</b>
Nanoesfera de plata .....	<b>AgNE</b>
Nanohilo .....	<b>NW</b>
Nanohilo de cobalto .....	<b>Co-NWs</b>
Nanohilo de hierro.....	<b>Fe-NWs</b>
Nanohilo de níquel .....	<b>Ni-NWs</b>
Nanohilo de plata .....	<b>AgNWs</b>
Nanopartícula .....	<b>NP</b>
Nanopartícula de oro.....	<b>AuNP</b>
Nanopartícula de plata .....	<b>AgNP</b>
Nanopartícula magnética .....	<b>MNP</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El ser humano se encuentra constantemente expuesto al ataque de multitud de patógenos de distinta naturaleza, lo que ha implicado un proceso de co-evolución entre patógenos y humanos a lo largo del tiempo. Durante las últimas décadas se ha incrementado notablemente el problema de la resistencia a antibióticos, por lo que es necesario buscar nuevas terapias que intenten complementar o suplir el tratamiento tradicional. Hoy día, tras muchos estudios, podemos ver una luz en el horizonte, la nanoterapia. La tecnología de la miniaturización abre un inmenso campo de acción para la medicina de hoy. Las nanoestructuras (Figura 1) son elementos menores de 100 nanómetros que, convenientemente manipulados, se pueden utilizar en campos muy diversos tales como la biomedicina, química, electrónica, óptica, cosmética o mecánica (Iravani *et al.* 2013).



**Figura 1:** Nanopartículas de carbono

## 1.1. NANOMEDICINA

La nanotecnología es un campo emergente que promete beneficios significativos para la sociedad en muchas áreas de diferentes ámbitos. La nanotecnología podría ser definida como la ciencia y tecnología del diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades y lesiones traumáticas para aliviar el dolor, además de para preservar y mejorar la salud humana, el uso de herramientas moleculares y el conocimiento molecular del cuerpo humano.

La nanomedicina surge en la década de los 60 cuando en una conferencia, Richard Feynmann dice “A mi modo de ver, los principios de la física no se pronuncian en contra de la posibilidad de maniobrar las cosas átomo por átomo”, pero realmente su desarrollo tecnológico e industrial es mucho más reciente.

No es hasta 1982 cuando aparece el primer artículo científico sobre nanotecnología, “Protein Design as a Pathway to molecular manufacturing” de K.Eric Drexler. En la década de los 2000 se llevaron a cabo varias revisiones de la situación actual de la nanomedicina con el objetivo de evaluar las posibles oportunidades para mejorar el cuidado de la salud, al igual que un análisis riesgo-beneficio de esta tecnología para determinar las prioridades de financiación en el futuro. En el 2004 el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos pone en marcha el Plan de Nanotecnología del Cáncer, una iniciativa que pretendía transformar la oncología clínica y la investigación básica a través de la aplicación de la nanotecnología dirigida.

En 2007 se crea la Fundación Europea de Nanomedicina Clínica debido al gran impacto de la nanociencia en la medicina y su rápido desarrollo. Su objetivo es avanzar en la medicina para el beneficio de los individuos y la sociedad a través de la nanociencia. Esta organización está dirigida a la prevención, diagnóstico y terapia a través de la nanomedicina así como el estudio de sus implicaciones.

Actualmente la nanomedicina es una ciencia en expansión que promete solventar muchos de los problemas que surgen en el diagnóstico, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la medicina regenerativa, implantes y liberación de fármacos en el organismo. Las expectativas que fueron puestas hace años en el campo de la nanomedicina parecen estar cumpliéndose en los últimos tiempos. El número de

artículos y patentes en este campo está sufriendo un incremento exponencial, lo que demuestra los avances conseguidos hasta ahora y las inmensas posibilidades que se nos abren para el futuro. Teniendo en cuenta la creciente cantidad de artículos que se están publicando en este campo, parece que dichas expectativas se están empezando a cumplir (Boisseau & Loubaton 2011).

## **1.2. BIODISTRIBUCIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS EN EL ORGANISMO**

Las nanoestructuras son partículas microscópicas de un tamaño menor de 100 nanómetros capaces de atravesar las membranas biológicas, permitiéndoles de este modo el acceso a órganos, tejidos y células, en los cuales otras partículas de mayor tamaño no pueden penetrar. Para poder llegar a las células y ejercer su función, las nanopartículas (NPs) deben ser introducidas previamente en el organismo. Existen distintos métodos de entrada: por inyección, inhalación, por ingestión o por contacto con la piel (Sundar & Prajapati 2012).

- Cuando la vía de entrada es por inyección, los nanoelementos llegan directamente a la sangre, pudiendo ser distribuidos al resto del cuerpo.
- Si la entrada ocurre por inhalación, la mayoría de nanoelementos son eliminados en los pulmones por la acción fagocítica de los macrófagos alveolares, mientras que los nanoelementos que consiguen permanecer en la zona son transportados a través de la sangre.
- En el caso de la vía ingestiva, las nanoestructuras son capaces de atravesar el estómago y son absorbidos en el intestino. La tasa de absorción depende, entre otros factores, de la tensión sanguínea y edad del paciente, y del tamaño, concentración y funcionalidad de los nanoelementos, aunque no está claro como estos factores pueden afectar a la biodistribución. Una vez que son absorbidas, la mayoría de nanoelementos se depositan principalmente en el hígado, en el riñón y en el bazo, aunque, en menor concentración también pueden ser localizados en el cerebro, testículos, ovarios y placenta.

- Si la entrada de nanoestructuras se produce por penetración a través de la piel, estas moléculas no son capaces de profundizar más allá de las capas superficiales, siendo su uso meramente tópico (Taylor *et al.* 2015).

### **1.3. FUNCIONES TERAPÉUTICAS**

El uso de la nanotecnología para el tratamiento de enfermedades ha supuesto un avance tecnológico espectacular durante los últimos años; gracias a esta tecnología, algunas aplicaciones de tratamientos médicos están cambiando radicalmente. Principalmente destacan las aplicaciones en las terapias médicas que citaremos a continuación.

#### **1.3.1. Cáncer**

Las NPs pueden ser de gran utilidad en distintos niveles de la lucha contra el cáncer. En primer lugar pueden ayudar al diagnóstico temprano de esta enfermedad gracias a las técnicas de nanoimagen, que poseen claras ventajas respecto a los agentes tradicionales como es el caso del incremento de la biocompatibilidad. La nanoimagen se puede aplicar de dos maneras fundamentalmente: las resonancias magnéticas y la imagen de fluorescencia.

- En el caso de las resonancias magnéticas, los puntos cuánticos, es decir, nanocristales coloidales semiconductores, junto con las NPs de oro (AuNPs) son capaces de detectar cientos de biomarcadores cancerígenos en ensayos de sangre o en biopsias.
- Respecto a la imagen de fluorescencia, los puntos cuánticos se utilizan para visualizar tejidos marcados o estudiar el sistema linfático. Esto implica que pueden ser suministrados en animales y después ser excitados *in vivo* con una longitud de onda larga para ser detectados posteriormente con una cámara sensible a la fluorescencia.

Además de su uso a nivel de diagnóstico, la nanoterapia también se puede aplicar a nivel terapéutico contra los tumores. En este ámbito, su utilización se puede

englobar principalmente en tres categorías: transporte de agentes terapéuticos, terapia génica y terapia térmica.

a) En cuanto a las NPs como transportadores de agentes terapéuticos, estas moléculas han resultado ser muy útiles para el tratamiento del cáncer dado que son capaces de transportar de forma específica a células, tejidos y órganos a distintos agentes terapéuticos como moléculas antimicrobianas, genes de factores de crecimiento, proteínas y drogas anticancerígenas. La utilización de estas NPs en la liberación de estas drogas presenta varias ventajas:

- Protección de los agentes terapéuticos frente a la degradación
- La liberación directa de estos agentes en las células tumorales permite utilizar una dosis menor del fármaco.
- Disminución de los efectos secundarios del tratamiento, puesto que al liberar las drogas de forma específica dentro del tumor, se reduce la exposición del tejido sano a las mismas y los posibles efectos adversos se minimizan.

b) La combinación de la terapia génica con la nanoterapia se considera una buena alternativa a las drogas anticancerígenas tradicionales, dado que las NPs permiten marcar las células tumorales y la terapia génica regula la alteración de la expresión de dichas células.

c) Las terapias térmicas contra el cáncer son muy ventajosas al tratarse de una técnica focal, fácilmente reproducible y con una mínima aplicación invasiva. Hay dos grandes tipos de terapia térmica: técnicas basadas en el frío y técnicas basadas en el calor.

- Dentro de las técnicas basadas en la aplicación de frío destaca la criocirugía, que está basada en la aplicación de frío extremo para destruir tumores, como se ha logrado en el caso del cáncer de próstata y pulmón. En los últimos años estas técnicas han desembocado en la nanocirugía, pudiendo operar incluso dentro de cada célula.
- Dentro de las técnicas basadas en la aplicación de calor, las NPs se utilizan para liberar energía térmica en tumores gracias a sus características ópticas,

magnéticas, y su conductividad eléctrica y térmica. El calor es capaz de eliminar las células tumorales que se encuentran en el punto donde se ha aplicado dicha energía. Un ejemplo de su utilidad es el uso de NPs magnéticas (MNPs) en campos magnéticos externos para generar calor en áreas específicas del tumor. La ventaja de esta técnica es que las MNPs pueden ser inyectadas directamente dentro del tumor antes del tratamiento con calor y permanecer concentradas en esa zona, permitiendo todas las sesiones terapéuticas localizadas que el oncólogo estime oportunas (Gobbo *et al.* 2015).

### **1.3.2. Sustitución y regeneración de órganos**

La medicina regenerativa se basa en el cultivo de células madre para regenerar órganos o tejidos dañados. Los primeros estudios, aparecidos en los años 70 versaban acerca de la sustitución de órganos con deficiencias por los primeros materiales implantables en el cuerpo humano. No obstante, sólo se trataba de "piezas de recambio" inertes y no biodegradables, que a menudo se habían desarrollado para otras aplicaciones. A mediados de la década de los ochenta, nació la segunda generación de materiales a base de cerámicas y de vidrio, con capacidad biodegradativa una vez reparada la lesión, o bien, con capacidad de estimular la actividad de autoregeneración, pero jamás las dos actividades a la vez. Hoy en día, se trata de combinar estas dos propiedades (biodegradabilidad y bioactividad) en una sola estructura. A escala nanométrica podemos pensar en combinaciones de cuerpos inertes y de moléculas biológicas hasta ahora inaccesibles para la química clásica.

Una de las aplicaciones más importantes de la nanomedicina se basa en la reconstrucción y reestructuración de huesos y músculos. Sin embargo, las aplicaciones en clínica de esta ciencia se encuentran bastante limitadas debido a la necesidad de utilizar un armazón o *scaffold* compatible con el tejido que imite a la matriz extracelular (MEC), de manera que a partir de ella se pueda generar una matriz natural.

La aparición de la nanotecnología ofrece perspectivas prometedoras para abordar dicho problema debido a sus propiedades ópticas y magnéticas, y a la posibilidad de comparar los tamaños de las NPs con las moléculas biológicas, lo que favorece las interacciones entre ambos y permite controlar más finamente las funciones celulares. Se ha comprobado que las nanofibras pueden imitar a la MEC,

generando *scaffolds* que promueven la adhesión, crecimiento y la diferenciación celular. Además, las MNPs se utilizan de forma habitual en la monitorización de los trasplantes debido a que es una técnica no invasiva, y la estimulación mecánica beneficia la regeneración de tejidos dado que favorece la producción de MEC funcional. La unión de MNPs a la membrana celular permite controlar de forma específica el comportamiento celular en respuesta a un campo magnético y, por tanto, desechar el uso de biorreactores (Gao *et al.* 2015).

### 1.3.3. Diabetes

La diabetes mellitus es una patología metabólica caracterizada por un incremento de los niveles de glucosa en sangre con una disminución de los niveles de insulina o por una insensibilidad de los órganos diana de la insulina. Muchos de los fármacos antidiabéticos utilizados actualmente se asocian con efectos secundarios indeseados, como la disminución exagerada en las respuestas glucémicas. Es por ello que se hace necesario el estudio de nuevos tratamientos aplicables contra una enfermedad con una prevalencia mundial del 9% entre adultos mayores de 18 años.

En la actualidad, se está desarrollando una nueva terapia alternativa consistente en el diseño de NPs basadas en la sibilina, flavonoide procedente de la silimarina, una de las plantas medicinales más antiguas, que posee propiedades hepatoprotectoras, antitumorales y antiinflamatorias. Este compuesto resulta beneficioso en el tratamiento de la diabetes tipo II porque disminuye los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos. En este caso, las NPs son las encargadas de transportar la sibilina a los receptores  $\beta$ -pancreáticos (Das *et al.* 2014).

Otra posible nanoterapia contra la diabetes se basa en el uso de AuNPs junto con extracto de *Cassia fistula*, una planta con propiedades hepatoprotectoras, antiinflamatorias, antitusivas, antifúngicas, antitumorales, antioxidantes y antibacterianas (Daisy & Saipriya 2012). Combinados ambos elementos, el tratamiento es capaz de corregir ciertos parámetros que resultan alterados en personas enfermas de diabetes, como son:

- La pérdida de peso inducida por un incremento en la pérdida de proteínas musculares.

- El incremento de la glucosa en sangre, corregido gracias a la potenciación de la secreción y el transporte a distintos tejidos de insulina pancreática.
- El aumento de los niveles de hemoglobina. Un tratamiento con NPs tiene capacidad antioxidante, por lo que consigue la reducción a niveles normales de hemoglobina mediante la eliminación de radicales libres.
- La elevación en los niveles de transaminasas. La aspartato aminotransferasa y la alanina transaminasa se liberan cuando la lesión implica a orgánulos como las mitocondrias; hay indicios que las AuNPs desempeñan un papel inhibitor sobre la actividad de las transaminasas y por tanto reducen sus niveles de actividad.
- La disminución de los niveles de proteínas totales, especialmente en el caso de las globulinas y la seroalbúmina, debido al aumento del catabolismo proteico. Un tratamiento con AuNPs devuelve a las proteínas a niveles normales.
- Las concentraciones exageradamente altas de lípidos en el suero, es decir, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad y lipoproteínas de muy baja densidad, debido a un aumento en la movilización de ácidos grasos libres en la grasa periférica. La consecuencia de este hecho es el incremento del riesgo de enfermedad cardíaca coronaria y aterosclerosis. Las AuNPs consiguen el retorno a niveles lipídicos normales gracias a una mayor actividad de la lecitina colesterol aciltransferasa que contribuye a la regulación lipídica.
- El incremento de los niveles de urea, creatinina y ácido úrico, lo que puede considerarse como marcadores de disfunción renal. La administración vía oral de AuNPs puede disminuir sus niveles de forma efectiva mediante la capacidad regenerativa de túbulos renales.

#### **1.3.4. Enfermedades renales**

Muchas de las enfermedades renales acaban por desarrollar fibrosis renal. Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación excesiva de componentes de la MEC, como el colágeno, en el espacio intersticial, favoreciendo la cicatrización. Si la zona donde ocurre este fenómeno se extiende, se puede generar insuficiencia renal.

Por tanto, la inhibición de la fibrosis renal es importante para mejorar el pronóstico de pacientes con enfermedades renales crónicas. La dificultad en estos casos es la reducida existencia de tratamientos eficaces.

La terapia génica es un enfoque prometedor en el tratamiento de la fibrosis renal, ya que puede dirigirse a moléculas específicas. Los microARN (ARNmi) son ARNs pequeños no codificantes que inhiben el procesamiento postranscripcional de los ARN mensajeros (ARNm) mediante la unión a secuencias específicas. Parece que varios ARNmi son capaces de inhibir la transcripción de ARNm importantes en el desarrollo de la fibrosis, como el ARNmi-146a que suprime la expresión de Smad4, promotor que desencadena la transcripción de genes pro-fibróticos. La elección de NPs como transportadores de estos ARNmi se debe a la demostración de la eficacia de NPs de polietilenimina como portador de oligonucleótidos a los riñones. Este tipo de NPs se pueden utilizar como transportadores donde cargar el ARNmi-146a para el tratamiento de la fibrosis renal (Morishita *et al.* 2015).

### **1.3.5. Enfermedades cardiovasculares**

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en la población, con un porcentaje de fallecimientos del 55% en las mujeres y un 43% en los hombres. Este tipo de patologías se caracterizan por la acumulación de lípidos en las paredes de los vasos pudiendo llegar a ocluirlos y, de esta manera, producir hipoxia e isquemia. Las lipoproteínas de baja densidad se oxidan en dichas paredes por lo que se estimula la inflamación endotelial y el reclutamiento de macrófagos, los cuales fagocitan la grasa y se transforman en células espumosas que propagan la cascada inflamatoria. Para tratar de remediar este hecho, se ha logrado diseñar NPs que permiten la unión a los macrófagos. De esta manera impiden la unión a la grasa y, por tanto, la propagación de la cascada. Así se reduce el riesgo de ruptura y la formación de coágulos (Lewis *et al.* 2015).

### 1.3.6. Infecciones

Los seres humanos están constantemente expuestos a multitud de patógenos de diversa naturaleza, como son bacterias, levaduras y amebas. Los agentes infecciosos son de pequeño tamaño, del orden de micrómetros o incluso nanómetros, y tanto su tamaño como su forma los hacen compatibles con su transporte a compartimentos biológicos específicos. La nanoterapia pretende utilizar las características fisicoquímicas de los nanomateriales para el tratamiento de enfermedades infecciosas a nivel molecular. Las NPs pueden actuar a distintos niveles en la terapia contra enfermedades infecciosas:

- A nivel preventivo, como en la vacunación, puesto que la nanoingeniería permite la creación de mejores adyuvantes y sistemas de administración de la vacuna. Las NPs adyuvantes tratan de reducir al mínimo los efectos secundarios, prolongar la respuesta inmune y estimular tanto la inmunidad innata como la adaptativa, especialmente el sistema fagocítico y las células presentadoras de antígeno. La administración oral de NPs de forma conjunta con las vacunas hace que estas sean estables en el tracto gastrointestinal. En estudios *in vivo* con ratones se ha demostrado que este mecanismo induce protección contra el virus de la influenza A después de tan solo inmunización intranasal, y además no requiere cadena de frío para su almacenamiento, lo cual abarata los costes.
- A nivel de diagnóstico, las propiedades fisicoquímicas, eléctricas, magnéticas, catalíticas y luminiscentes de las NPs permiten un diagnóstico rápido, sensible y barato, así como determinar de forma rápida la susceptibilidad al tratamiento cuando estos nanoelementos se unen a las biomoléculas.
- A nivel terapéutico, los fármacos unidos a las NPs pueden ayudar al sistema inmune, especialmente a los anticuerpos y citoquinas, luchando simultáneamente con agentes infecciosos a nivel molecular para superar la enfermedad. En este caso se utilizan principalmente las nanoemulsiones, que consisten en emulsiones submicrónicas que pueden transportar fármacos.

### **1.3.6.1. Infecciones bacterianas**

La actividad antibacteriana de las NPs de plata (AgNPs) se debe a su efecto fotocatalítico con especies reactivas de oxígeno que dañan los componentes celulares, desestructurando las paredes bacterianas y membranas, interrumpiendo el flujo de energía e inhibiendo la actividad enzimática y la síntesis del ADN. Estos efectos hacen de la plata un agente esterilizante (Wei *et al.* 2015).

En los últimos años se ha visto un incremento de la resistencia a antibióticos, lo cual representa un problema de envergadura para la salud pública. Por ello recientemente se han desarrollado multitud de proyectos que pretenden ayudar a solventar dicho problema. Una solución puede ser la adicción de AgNPs al tratamiento convencional con antibióticos, porque estas estructuras ayudan a aumentar la capacidad de unión del antibiótico a la bacteria, y por ello disminuye la concentración mínima inhibitoria.

El poder esterilizante de la plata es conocido desde la antigüedad. Este metal siempre se ha utilizado contra diversas enfermedades como antiséptico y antimicrobiano, tanto frente a Gram positivas como a Gram negativas, gracias a su baja toxicidad. A pesar de que se han realizado una gran cantidad de estudios sobre el tema, su mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado completamente. Su actividad antimicrobiana parece estar relacionada con mecanismo multifacético mediante el cual las AgNPs son capaces de interactuar físicamente con la superficie celular bacteriana. Los efectos antimicrobianos son variados y dependen de la especie bacteriana. En la tabla 1 se observan algunos de estos efectos en varias especies bacterianas:

<b>Especie bacteriana</b>	<b>Efecto de las AgNPs</b>
<i>Escherichia coli</i>	Alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática y respiración celular
<i>Enterococcus faecalis</i>	Alteración de la pared celular y citoplasma
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Alteración de la membrana
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática y respiración celular
<i>Staphylococcus aureus</i>	Daño irreversible en las células bacterianas
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Inhibición de la replicación bacteriana del ADN, daño en las membranas bacterianas y modificación de los niveles intracelulares de ATP
<i>Salmonella typhi</i>	Inhibición de la replicación bacteriana del ADN, daño en las membranas bacterianas y modificación de los niveles intracelulares de ATP

**Tabla I:** Efecto de las AgNPs sobre algunas especies bacterianas

Hay varias características de las AgNPs que pueden afectar a su acción bactericida, como son el tamaño, la carga, puesto que aquellas que cuentan con un tamaño menor y un potencial positivo son más eficaces eliminando bacterias, y la morfología, debido a la cantidad de superficie expuesta. Su actividad también depende de su concentración, forma, radiación UV y combinación con antibióticos.

Un tipo de MNPs, con óxido de hierro conjugado con plata, son capaces de eliminar biopelículas sin necesidad de antibióticos, lo cual puede resultar especialmente útil en múltiples infecciones. Los biofilms son de difícil eliminación e incrementan la patogenicidad bacteriana de distintas maneras: se unen a superficies sólidas con alta densidad, incrementan la eficiencia metabólica de la colonia, permiten la evasión del sistema inmune, incrementan la transferencia horizontal de genes, aumentan la resistencia a antibióticos y permiten el desprendimiento de agregados para colonizar otras zonas. Actualmente, las MNPs de plata se utilizan en aparatos médicos para apoyar la actividad antibiofilm como son catéteres, cemento para huesos

modificados, aplicaciones dentales, máscaras quirúrgicas o incluso en vendas. De esta manera se impide el crecimiento bacteriano y se mejora la curación (Franci *et al.* 2015).

### **1.3.6.2. Infecciones víricas**

Otro de los efectos biocidas de las NPs es su capacidad para eliminar virus, como es el caso del herpes virus de tipo 2. La presencia de este virus en el organismo puede aumentar de forma significativa las probabilidades de infección con el virus de la inmunodeficiencia humana, por lo que su control y posterior eliminación son considerados como un grave problema de la sanidad actual. A pesar del uso generalizado de la terapia antiviral en la población en las últimas décadas, la incidencia de infección y complicaciones del herpes virus tipo 2 permanecen casi inalteradas. Esto se debe a que los protocolos de prevención fallan por razones desconocidas y a que el tratamiento no es eficaz.

En los últimos años se ha introducido un nuevo foco de investigación en este ámbito, el uso de AgNPs para eliminar el herpes virus de tipo 2. Parece que siempre y cuando la dosis de AgNPs sea regulada para evitar la muerte por toxicidad de las células Vero, estos nanoelementos son capaces de inhibir la generación de la progenie del virus. Se ha demostrado que las AgNPs se unen con más afinidad a determinadas proteínas víricas, como es el caso de una glicoproteína de membrana que contiene un grupo sulfhidrilo. Esta interacción permite impedir la internalización del virus en las células mediante la inhibición de la interacción entre la glicoproteína y su receptor específico. La captación celular de los nanoelementos, al igual que la internalización del virus, se produce fundamentalmente a través de los procesos de endocitosis y macropinocitosis mediada por clatrin. Una vez ambos elementos se encuentran dentro de la célula se dan interacciones intracelulares que acaban inhibiendo la capacidad de replicación del virus (Hu *et al.* 2014).

El virus respiratorio sincitial es un paramixovirus que causa una infección respiratoria grave en lactantes, niños y ancianos. Aunque actualmente no existe ninguna vacuna o tratamiento que sea capaz de eliminar dicha enfermedad por

completo, se emplea el antiviral ribavirina junto con palivizumab como tratamiento sintomático. Sin embargo, para poder utilizar dicho tratamiento es necesario un mecanismo de detección eficaz. La detección del virus se puede realizar mediante el uso de un anticuerpo de fluorescencia directa, el ELISA o la PCR a tiempo real, técnicas muy sensibles pero con un coste elevado. Los métodos biofísicos como los puntos cuánticos son más baratos, pero se encuentran limitados para su uso en investigación y no en clínica. En cambio la oscilación de AgNPs y AuNPs y cobre debido a un campo electromagnético permite la detección del virus respiratorio sincitial (Valdez *et al.* 2016).

### **1.3.6.3. Infecciones fúngicas**

La nanoterapia se puede utilizar para mejorar los tratamientos contra hongos, tanto en infecciones fúngicas superficiales como subcutáneas o sistémicas. Para ilustrar este hecho hablaremos de cómo la candidiasis, una de las micosis más frecuentes, se puede tratar de forma más eficaz y segura utilizando NPs. La candidiasis es una enfermedad causada por patógenos oportunistas del género *Candida* que pueden afectar tanto a la mucosa como a los tejidos más profundos. Su incidencia ha aumentado mucho en los últimos años, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y en aquellos sometidos a quimioterapia contra el cáncer o a terapias inmunosupresoras tras un trasplante de órganos. Para el tratamiento de esta patología existen varios fármacos antifúngicos que, sin embargo, presentan algunos defectos en la práctica clínica como son la baja eficacia, las resistencias o las reacciones adversas. Por ello, es importante el desarrollo de nuevos métodos que ayuden a la mejora de estos tratamientos.

Las NPs poliméricas biodegradables han demostrado unas características muy deseables como ser estables, poseer una biodistribución adecuada, una farmacocinética bastante razonable y ser capaces de mejorar la solubilidad de algunos antifúngicos como la anfotericina B. Este compuesto es uno de los agentes antifúngicos de amplio espectro más importantes, su conjugación con estas NPs aumenta su efecto,

aunque aún se requieren más estudios para investigar el mecanismo específico y el coste-efectividad de esta terapia antifúngica (Tang *et al.* 2014).

Las NPs de sílice mesopóricas también tienen efecto antimicótico en conjunción con el tebuconazol, antifúngico bastante relevante en el tratamiento de vulvovaginitis, ya sea mediada por el género *Candida* u otro hongo (Mas *et al.* 2014).

Además de su efecto antibacterino, las AgNPs demuestran su toxicidad frente a hongos dermatofitos, principales causantes de infecciones fúngicas superficiales (Kim *et al.* 2008).

#### **1.3.6.4. Infecciones amebianas**

Dentro de las infecciones causadas por procariotas cabe destacar las producidas por las amebas, protistas unicelulares ampliamente distribuidos que pueden ser de vida libre o parásitos. Dentro de esta clase de amebas encontramos tres géneros asociados a enfermedades en humanos *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia*.

El género *Acanthamoeba* se encuentra habitualmente en el suelo y el agua, y posee un ciclo de vida complejo en el que pueden estar en forma de resistencia o quiste, o en forma infectiva o de trofozoito. Algunas especies de este género son oportunistas y pueden causar infecciones en seres humanos y animales. Para controlar la infección por *Acanthamoeba* sp. se utilizan diversos compuestos como el fluconazol, anfotericina B o neomicina. Al igual que en los casos anteriores, estos fármacos plantean problemas acerca de los efectos secundarios, resistencias, absorción insuficiente y niveles de toxicidad. Diversos estudios han demostrado que las NPs tienen la capacidad de matar al género *Acanthamoeba* mediante algún mecanismo de unión o inhibición de biomoléculas importantes en el ciclo de vida del microorganismo. En la actualidad, se ha llegado a la conclusión de que las AgNPs junto con extractos de determinadas plantas con propiedades beneficiosas como es el caso de *Jatropha gossypifolia*, poseen actividad amebicida además de bactericida. Además estos nanoelementos son capaces de prevenir el enquistamiento de los trofozoítos, punto

clave en el desarrollo vital de las amebas que, además, está relacionado con la generación de resistencias, dado que estas se deben a la transformación de trofozoítos en quistes (Borase *et al.* 2013).

El género *Acanthamoeba* es capaz de producir queratitis, una infección ocular grave generalmente relacionada con un mal uso de lentillas o un trauma. La incidencia de esta enfermedad ha aumentado durante los últimos años en relación al incremento de usuarios portadores de lentillas. Las queratitis producidas por amebas son difíciles de diagnosticar en los estadios tempranos, puesto que los síntomas que producen no son específicos y se confunden con los generados por una queratitis bacteriana o vírica. Se conocen varios métodos de diagnóstico, como el empleo de PCR cuantitativa o frotis corneales teñidos con diversos compuestos como naranja de acridina, pero no son muy eficaces. Sin embargo, los ensayos de inmunocromatografía son útiles para la detección de miembros del género *Acanthamoeba* por su rapidez y sencillez. Este método se ha optimizado gracias al uso de NPs de sílice fluorescente con surfactante unidas a anticuerpos anti-*Acanthamoeba* sp. Puesto que la superficie de la partícula está cubierta por grupos hidrofílicos altamente hidrocarbonados, las partículas se dispersan de manera uniforme en la solución de muestra o tampón. Dado que la adsorción no es específica y las interacciones hidrofóbicas son poco frecuentes, se minimiza el ruido fluorescente y se maximiza la sensibilidad (Toriyama *et al.* 2015).

## **2. OBJETIVOS**

1. Efecto de NPs de distintos materiales sobre bacterias de distinta naturaleza Gram
2. Influencia de la morfología de AgNPs sobre su efecto en bacterias de distinta naturaleza Gram
3. Efecto de NPs de distintos materiales sobre levaduras
4. Influencia de la morfología de AgNPs sobre su efecto en levaduras
5. Efecto de NPs de distintos materiales sobre células humanas tumorales y no tumorales
6. Influencia de la morfología de AgNPs sobre su efecto en células humanas tumorales y no tumorales

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MICROORGANISMOS

##### 3.1.1 Bacterias

Las especies bacterianas utilizadas para la realización del presente trabajo aparecen reflejadas en la tabla II. Todas las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias.

<b>Especie</b>	<b>Gram</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positiva
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Positiva
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Positiva
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positiva
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positiva
<i>Bacillus globisporus</i>	Positiva
<i>Escherichia coli</i>	Negativa
<i>Serratia sp.</i>	Negativa
<i>Salmonella sp.</i>	Negativa
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negativa
<i>Klebsiella sp.</i>	Negativa

**Tabla II:** Especies bacterianas utilizadas durante el desarrollo de este estudio y su clasificación Gram

Todas las bacterias fueron cultivadas en caldo Brain-Heart Infusion (BHI) de Becton, Dickinson and Company en agitación a 37°C durante una noche, a excepción de *Klebsiella* sp., *H. influenzae* y *S.pneumoniae*, que se cultivaron de forma estática.

### **3.1.2. Levaduras**

Dos especies de levaduras, fueron también utilizadas durante la realización de este trabajo: *Candida albicans* y *Sacharomyces cerevisiae*. Ambas fueron cultivadas en medio Sabouraud líquido durante dos días a 37°C sin agitación.

## **3.2. CULTIVOS CELULARES**

Durante la realización de este trabajo se utilizaron dos líneas celulares humanas: HCE. línea no tumoral de células de epitelio corneal humano (ATCC CRL11135), y la línea tumoral HeLa (ATCC CCL-2).

Las células Hela fueran cultivadas utilizando en medio DMEM (Dulbeccó's Modified Eagle's essential medium) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y los antibióticos penicilina G y estreptomicina al 1%, todo ello de Gibco. Por otra parte, las células HCE fueron cultivadas en DMEM/f12 (Dulbeccó's Modified Eagle's essential medium: Nutrient Mixture F-12) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (v/v), los antibióticos penicilina/estreptomicina al 1% (v/v), insulina (1,5 unidades/mL) y factor de crecimiento epitelial (10ng/mL), también de Gibco.

Respecto a las condiciones utilizadas para realizar el experimento, la propagación de las líneas celulares se realizó en diferentes placas de cultivo previamente tratadas (Thermo Fisher Scientific) y cultivadas a 37°C de temperatura en un incubador con un 5% de CO<sub>2</sub>.

## **3.3. NANOESTRUCTURAS**

Las diferentes nanoestructuras metálicas empleadas proceden del Instituto Tecnológico de Materiales de Asturias (ITMA). En la tabla III se observan los tipos de nanoestructuras, el material utilizado para su síntesis y su concentración:

Nanoestructuras	Material	Morfología	Concentración (Partículas/ $\mu\text{L}$ )
Magnéticas	Hierro	Hilos	$6,383 \times 10^8$
	Cobalto	Hilos	$2,1 \times 10^3$
	Níquel	Hilos	$1,282 \times 10^7$
No magnéticas	Plata	Hilos	$1,26 \times 10^5$
		Anillos	$1,28 \times 10^5$
		Esferas	$8,85 \times 10^7$

Tabla III: Nanoestructuras empleadas en este estudio. Se indica el material que las compone, su morfología y su concentración.

### 3.4. ENSAYO DE INTERACCIÓN

#### 3.4.1. Solución bacteriana

Se llevaron a cabo los cultivos bacterianos a partir de un preinóculo al 0,4% en las condiciones previamente citadas hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 620 nm.

#### **3.4.2. Solución fúngica**

Se llevaron a cabo los cultivos fúngicos a partir de un preinóculo al 0,2% en las condiciones previamente citadas, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 620 nanómetros.

#### **3.4.3. Líneas celulares**

Se llevaron a cabo en placas de cultivo tratadas de 24 pocillos (2 cm<sup>2</sup>). En cada pocillo se cultivaron las líneas celulares en su medio correspondiente, y el experimento fue realizado en el momento en que las placas presentaban un 80% de confluencia.

#### **3.4.4. Interacción entre nanopartículas y bacterias**

Los microorganismos se pusieron en contacto con las nanoestructuras de distinta naturaleza durante periodos de 5, 10, 15, 20 o 30 minutos en agitación leve. La proporción entre NPs y bacterias fue de 1:100. Una vez concluido el tiempo de incubación, las nanoestructuras se eliminaron mediante centrifugación a 800 rpm durante 2 minutos, y se tomaron 50 µL del sobrenadante para su cultivo en medio sólido. Los cultivos fueron incubados a 37°C durante toda la noche, tras lo cual se procedió al conteo de las colonias formadas.

#### **3.4.5. Interacción entre nanopartículas y levaduras**

Los microorganismos se pusieron en contacto con las nanoestructuras de distinta naturaleza durante periodos de 5, 10, 15, 20 y 30 minutos en agitación leve. La proporción entre NPs y levaduras fue de 1:1. Una vez concluido el tiempo de incubación, las nanoestructuras se eliminaron mediante centrifugación a 800 rpm durante 2 minutos, y se tomaron 50 µL del sobrenadante para su cultivo en medio sólido. Los cultivos fueron incubados a 37°C durante toda la noche, tras lo cual se procedió al conteo de las colonias formadas.

### **3.5.6. Interacción entre nanoestructuras y células**

Para ver el efecto de las diferentes nanoestructuras sobre células humanas, éstas fueron puestas en contacto con células tumorales HeLa y células no tumorales HCE utilizando la proporción 1:100.

Las células eucariotas fueron cultivadas en placas tratadas de 24 pocillos en sus correspondientes medios de cultivo hasta alcanzar un 80% de confluencia, momento en el cual fueron añadidas las cantidades de nanopartículas necesarias para las proporciones antes citadas. Previamente a la puesta en contacto entre nanoelementos y células eucariotas, se sustituyó el H<sub>2</sub>O en la que se encuentran diluidas las NPs por el medio celular eucariota completo correspondiente, para evitar la acción de la presión osmótica del H<sub>2</sub>O sobre las células. Por ello se distribuyeron en eppendorf las cantidades concretas de nanoelementos utilizadas en cada pocillo, se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm, y finalmente el sedimento fue resuspendido en 200 µL de medio DMEM. A continuación, para ver el efecto obtenido se realizaron fotografías en microscopio de contraste de fases Leica DMI6000B a los tiempos 0, 5 y 24 horas con un aumento 10x.

### **3.5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS**

Los datos obtenidos de los viables de bacterias y levaduras se analizaron gracias al programa Statistica 10.0 para el sistema operativo Windows, con el cual se calculan los porcentajes de mortalidad de cada especie microbiana, y tras hacer un test de normalidad se realizan test estadísticos de T de Student para valores independientes enfrentando los resultados obtenidos a distintos tiempos, y aceptando como significativos aquellos para los que  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

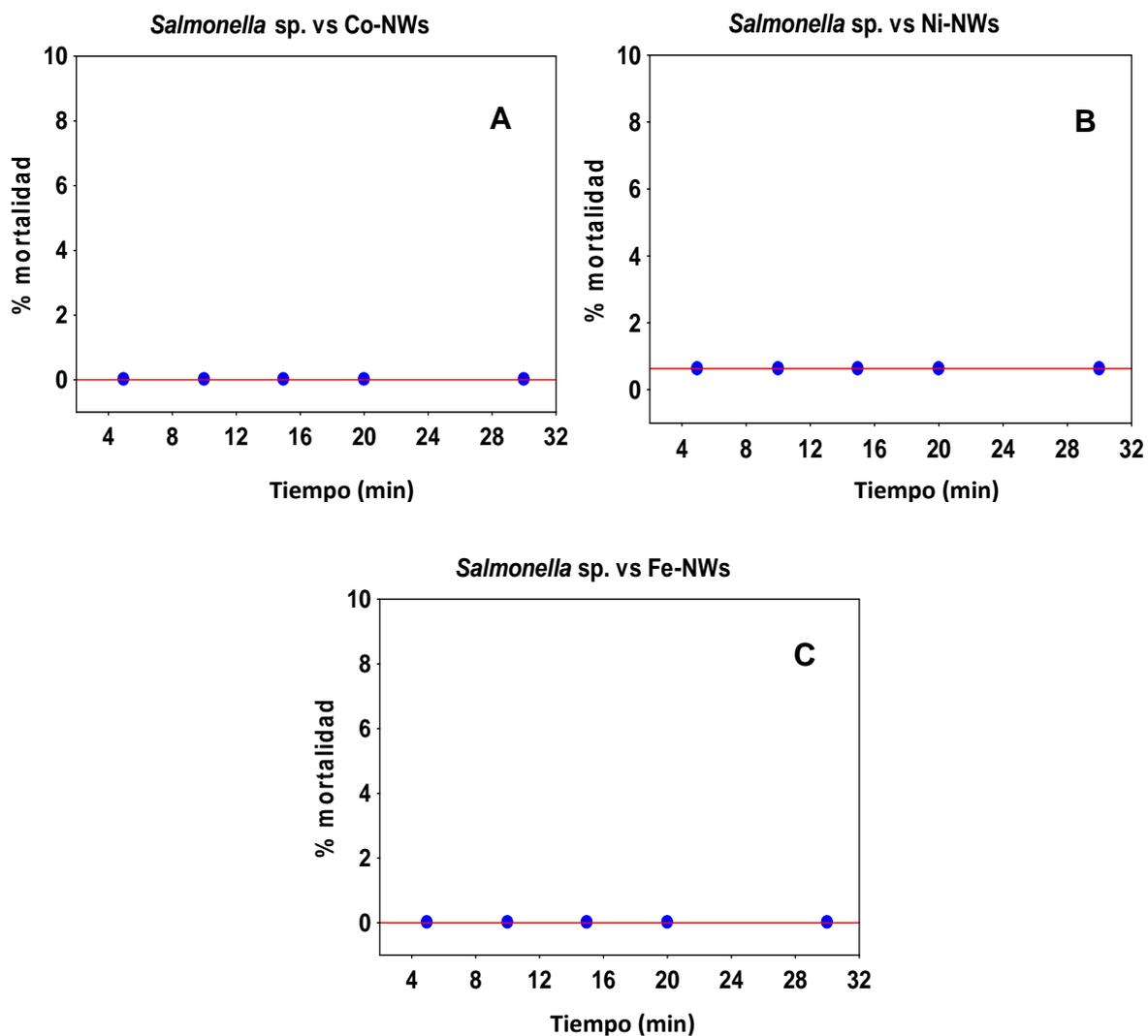
Durante la realización de este trabajo se analizó la capacidad biocida de nanomateriales de distinta naturaleza metálica sobre bacterias, levaduras y células humanas. Se consideraron dos grupos de nanoelementos en función de sus propiedades; nanomateriales magnéticos que incluyen cobalto (Co-NWs), hierro (Fe-NWs) y níquel (Ni-NWs), todas ellos con la misma morfología de nanohilos; y los nanomateriales no magnéticos de plata, de los cuales contamos con tres morfologías distintas: hilos, anillos y esferas.

### 4.1. ACTIVIDAD SOBRE BACTERIAS

Para medir la actividad antibacteriana de las distintas clases de nanoelementos se usaron un conjunto de bacterias clasificadas según su naturaleza Gram. Los resultados indicaron que solamente los nanoelementos de plata presentan actividad antibacteriana.

#### 4.1.1. Nanopartículas magnéticas

La capacidad biocida de Co-NWs, Ni-NWs y Fe-NWs sobre bacterias de distinta naturaleza Gram fue analizada siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.4. de Material y Métodos. Los resultados del experimento mostraron que tanto las bacterias Gram negativas como las Gram positivas no fueron eliminadas tras el contacto con los nanoelementos de Co-NWs, Ni-NWs y Fe-NWs, independientemente del tiempo de incubación. Para ilustrar este hecho se utilizó a *Salmonella* sp. como modelo bacteriano, tal y como se muestra a continuación en la figura 2:



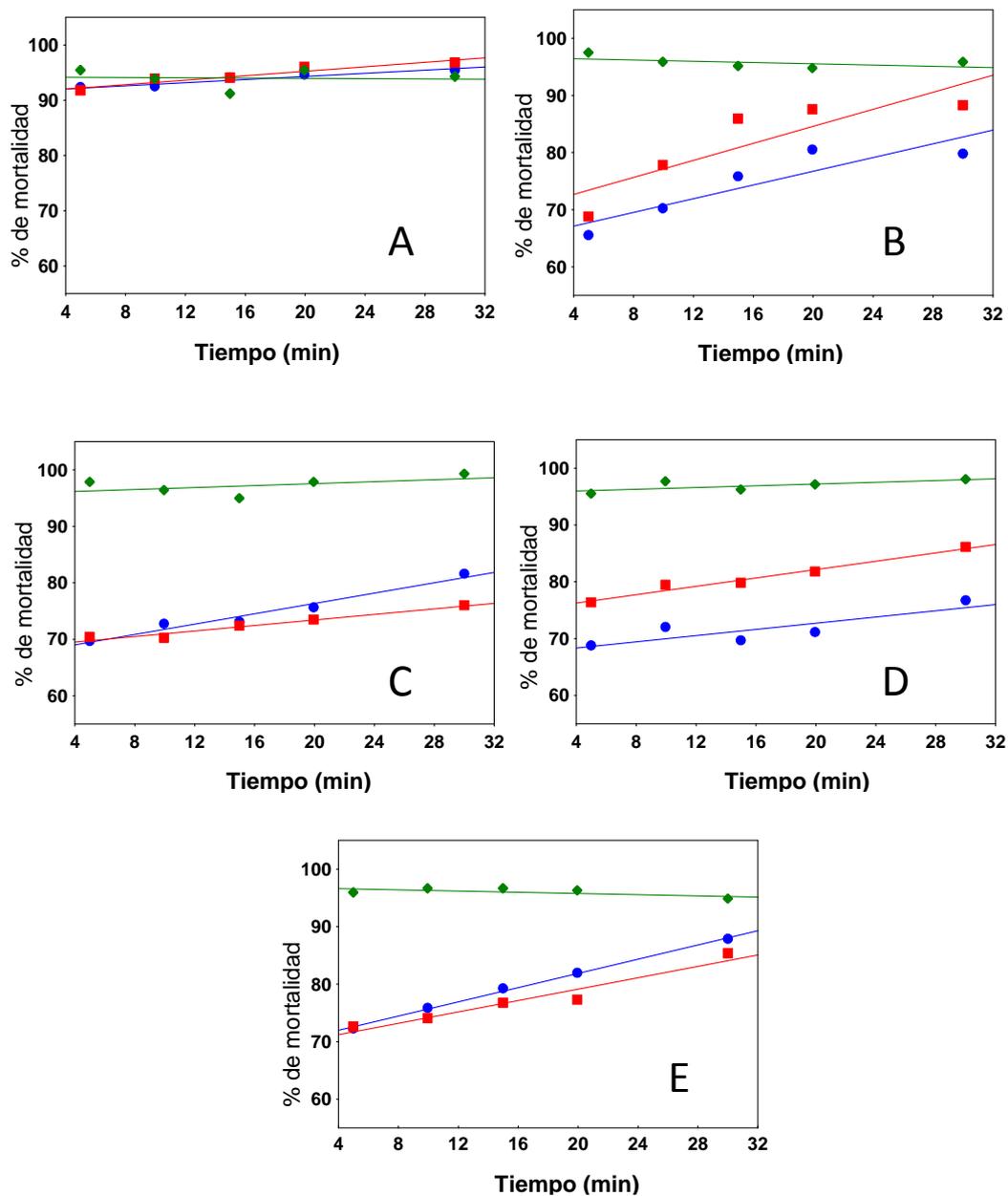
**Figura 2:** Capacidad biocida de nanopartículas magnéticas sobre *Salmonella* sp. A: Efecto del tratamiento con nanohilos de cobalto. B: Efecto del tratamiento con nanohilos de níquel. C: Efecto del tratamiento con nanohilos de hierro.

#### 4.1.2. Nanopartículas no magnéticas de plata

La capacidad biocida de las diversas AgNPs sobre bacterias de distinta naturaleza Gram fue analizada siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.4. de Material y Métodos. Los datos obtenidos mostraron que todas las AgNPs, tanto nanoanillos (AgNRs), como nanohilos (AgNWs) y nanoesferas (AgNEs), causaron alta mortalidad dependiente del tiempo de incubación. El efecto tuvo lugar tanto en bacterias Gram negativas (Figura 3), como en Gram positivas (Figura 4).

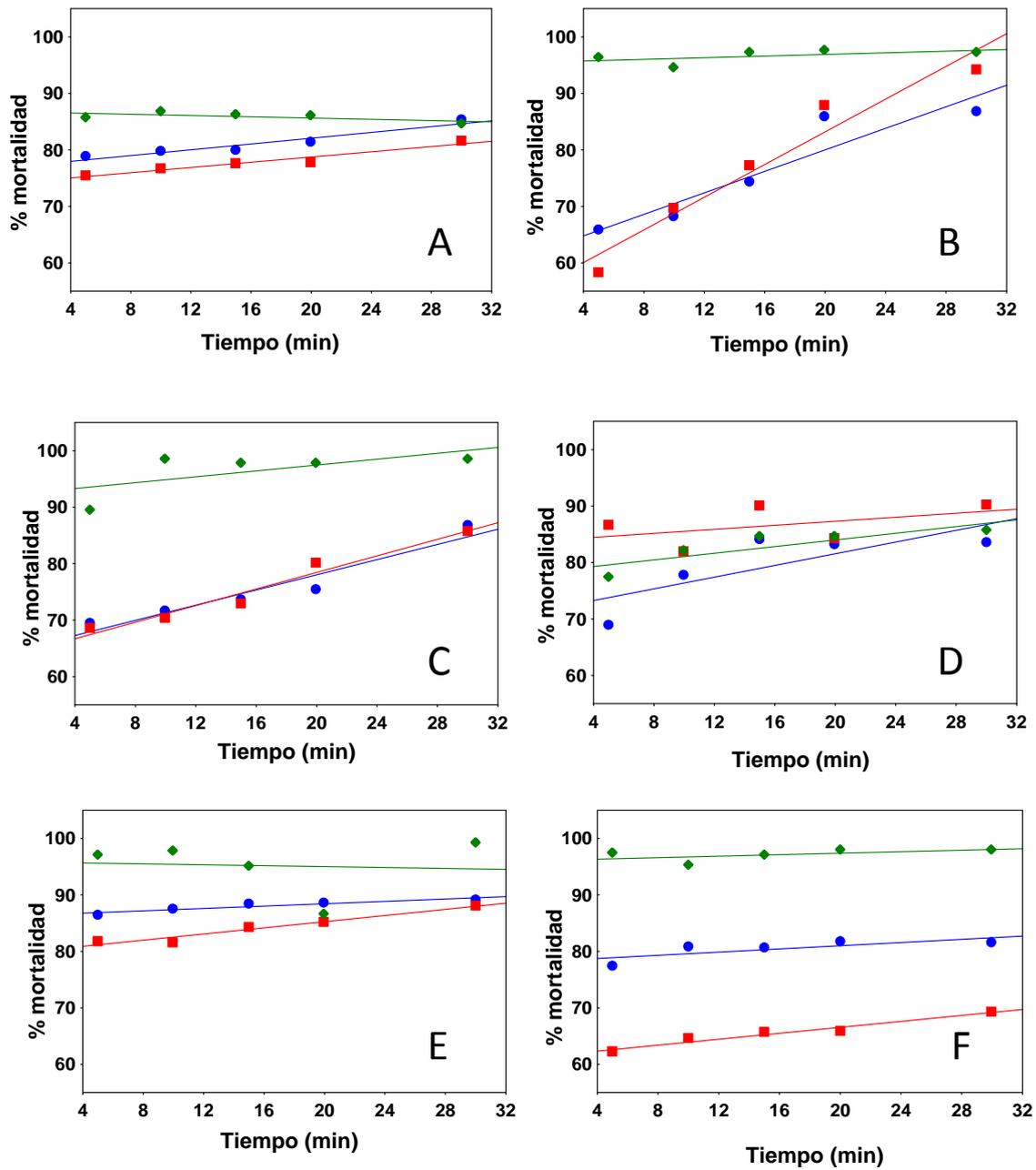
A pesar de que en todos los casos el efecto biocida sobre las bacterias Gram negativas fue elevado, el porcentaje de mortalidad fue variando en función de la

especie bacteriana. Los datos mostraron que *E.coli* poseía una tasa de mortalidad prácticamente idéntica tras el empleo de cualquiera de las tres morfologías, la cual oscilaba entre el 90 y el 100% (Figura 3, A) pero en el resto de los casos, las AgNEs resultaron mucho más eficaces en su actividad antibacteriana. La respuesta frente a AgNRs y AgNWs varía en cada caso, puesto que los AgNWs poseen una capacidad biocida más elevada tras el contacto con *H.influenzae* y *Salmonella* mientras que los AgNRs generan una tasa de mortalidad más alta que los AgNWs tras su adicción a *Klebsiella* sp. y *Serratia* sp. (Figura 3; B, C, D, E).



**Figura 3:** Capacidad biocida de nanopartículas de plata sobre bacterias Gram negativas. Efecto antibacteriano de nanoanillos (en azul), nanohilos (en rojo) y nanoesferas (verde) sobre *E.coli* (A); ;; *H.influenzae*. (B); ::: *Klebsiella* sp. (C); *Salmonella* sp.(D); *Serratia* sp. (E).

La tasa de mortalidad causada por AgNPs en las bacterias Gram positivas fue variando desde aproximadamente un 63% hasta un 97%. Al igual que en el caso anterior, las AgNEs causaron el mayor efecto biocida en la mayoría de los casos, situando la tasa de mortalidad entre el 90 y el 100% en *S.epidermidis*, *B.globisporus*, *E.faecalis* y *S.pyogenes*, y entre el 80 y 90 % en *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Los AgNRs y AgNWs mostraron efectos de mortalidad semejantes situados entre el 70 y 80% en el caso de *S.aureus* y *B.globisporus* (Figura 4; A, C). Aunque tras la interacción de dichos nanoelementos con *E.faecalis* el efecto de ambas morfologías fue semejante, la tasa de mortalidad obtenida fue mayor, entre el 80 y 90% (Figura 4, E). En el caso de *S.epidermidis*, a tiempos cortos los AgNRs son más eficaces pero a partir del minuto 15 los AgNWs poseen una mayor capacidad bactericida (Figura 4, B). En cuanto a *S.pyogenes*, los AgNRs son capaces de eliminar más bacterias que los AgNWs durante todos los estadios de tiempo involucrados en este experimento (Figura 4, F). Por último, *S.pneumoniae* es la excepción mencionada anteriormente respecto a la supremacía de las AgNEs relativas a su capacidad biocida, puesto que son los AgNWs los que consiguen una tasa de mortalidad superior seguidos de las AgNEs y finalmente los AgNRs (Figura 4, D).



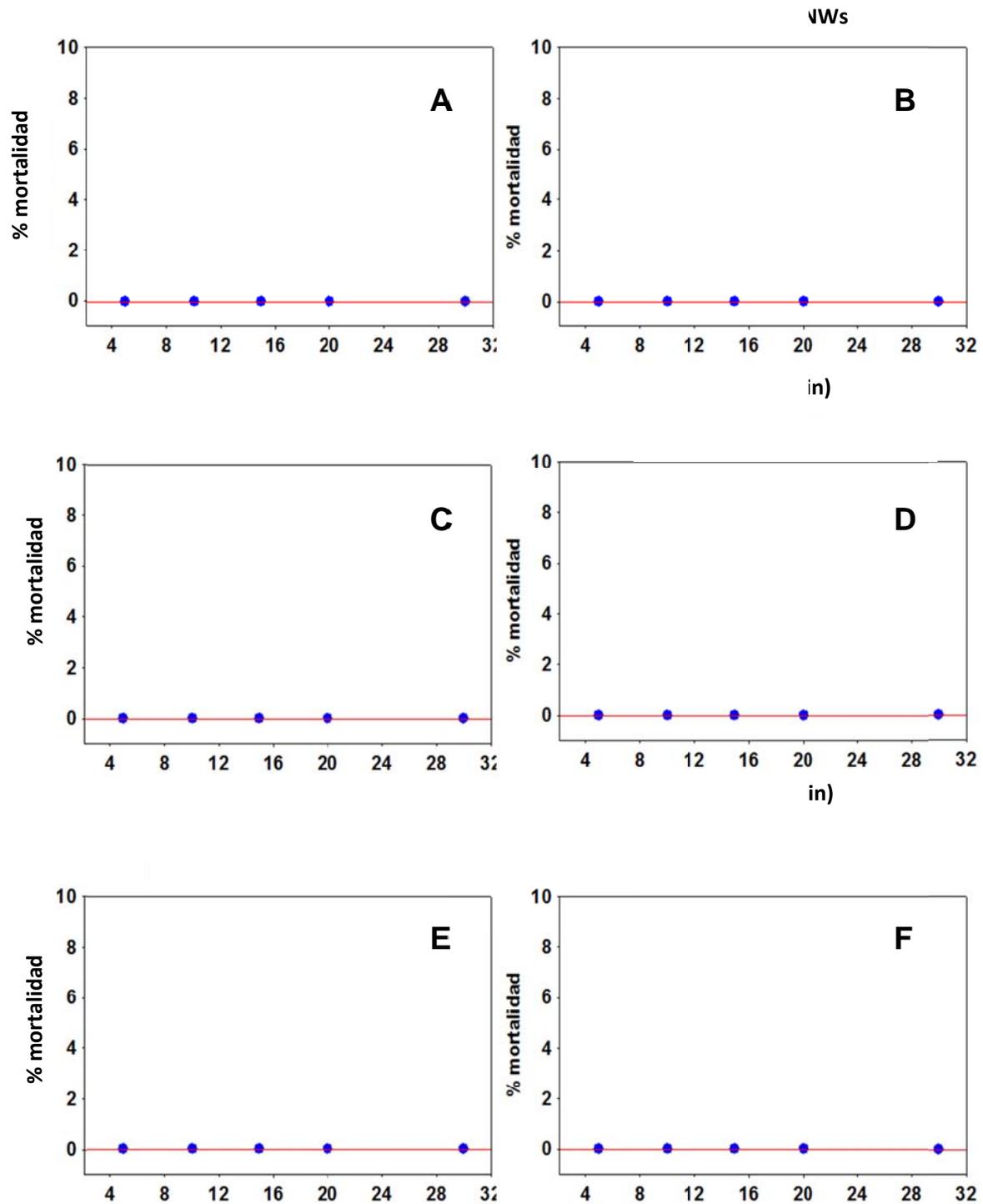
**Figura 4:** Análisis de la capacidad biocida de las nanopartículas de plata sobre bacterias Gram positivas. Efecto antibacteriano de nanoanillos (en azul), nanohilos (en rojo) y nanoesferas (verde) sobre A: *S.aureus*; B: *S.epidermidis*; C: *B.globisporus*; D: *S.pneumoniae*; E: *E.faecalis*; F: *S.pyogenes*

## **4.2. ACTIVIDAD SOBRE LEVADURAS**

La capacidad antimicótica de los diferentes nanoelementos metálicos fue comprobada a distintos tiempos de incubación con *C.albicans* y *S.cerevisiae* de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.4.5. de Material y métodos.

### **4.2.1. Nanohilos magnéticos**

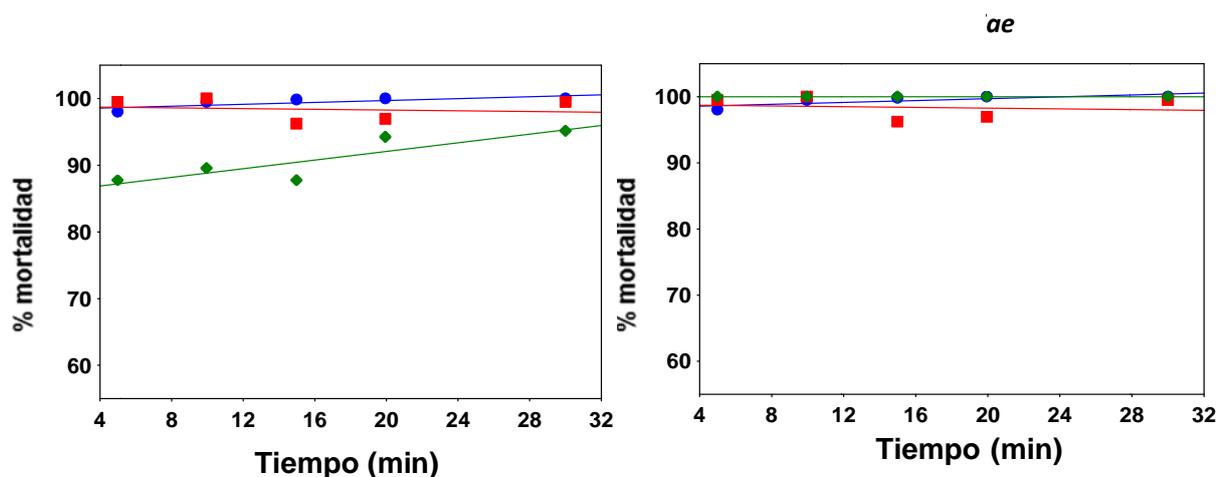
Los distintos nanoelementos, Co-NWs, Ni-NWs, y Fe-NWs no afectaron a la viabilidad de ninguno de estos dos microorganismos independientemente del tiempo de incubación (Figura 5):



**Figura 5.** Capacidad biocida de nanopartículas magnéticas sobre levaduras. Efecto antimicótico sobre *S. cerevisiae* con A: Tratamiento con nanohilos de hierro, C: Tratamiento con nanohilos de níquel, E: Tratamiento con nanohilos de cobalto. Efecto antimicótico sobre *C. albicans* con B: Tratamiento con nanohilos de hierro, D: Tratamiento con nanohilos de níquel, F: Tratamiento con nanohilos de cobalto.

#### 4.2.2. Nanoelementos no magnéticos de plata

Las distintas nanoestructuras de plata causaron una alta tasa de mortalidad en ambas levaduras desde tiempos de incubación muy cortos, tal y como se muestra en la figura 6. En el caso de *C.albicans* la tasa de mortalidad obtenida con AgNRs y AgNWs es siempre del 100 %, mientras que el efecto de AgNEs va aumentando con el tiempo del 85 al 100%. En el caso de *S.cerevisiae* el porcentaje de mortalidad es casi del 100% en todos los casos, aunque se puede observar que el efecto de los AgNWs es ligeramente inferior al de las otras dos morfologías.



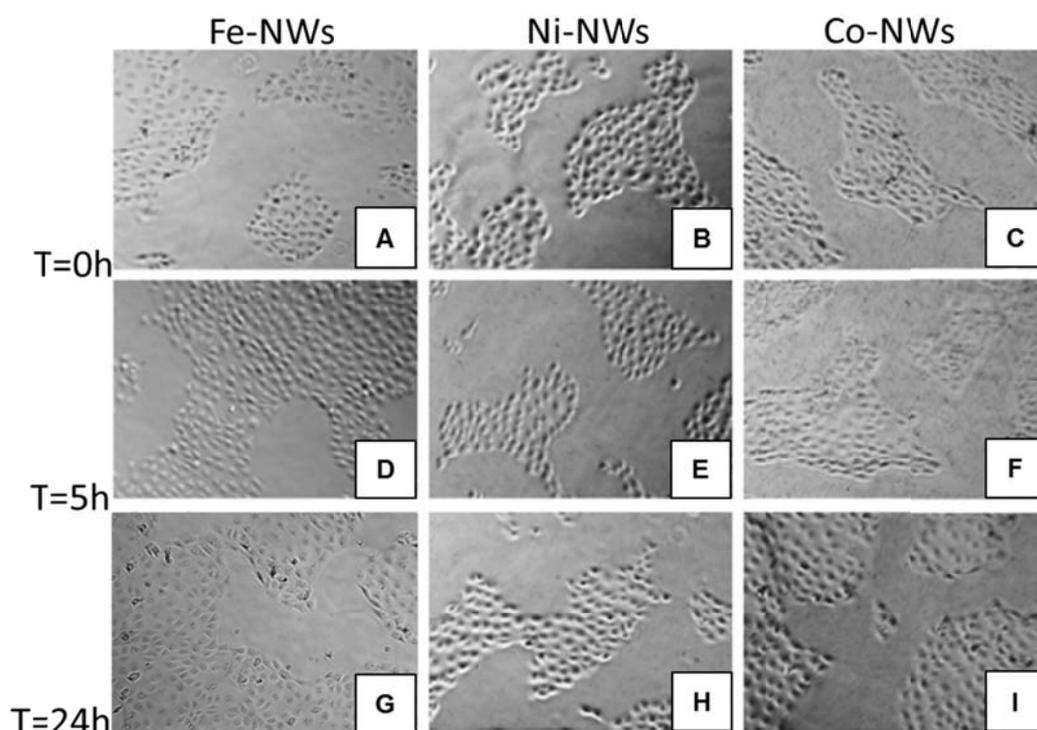
**Figura 6.** Capacidad biocida de las nanopartículas de plata sobre levaduras. Efecto antimicótico de nanoanillos (en azul), nanohilos (en rojo) y nanopartículas (verde) sobre A: *C. albicans*; B: *S.cerevisiae*

#### 4.3. ACTIVIDAD SOBRE CÉLULAS HUMANAS

Para medir la actividad biocida de los nanoestructuras sobre células humanas se realizó un análisis de la actividad pro-apoptótica en células de epitelio de córnea no tumorales (HCE) y sobre células tumorales HeLa siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.5 de Material y Métodos, a lo largo de distintos tiempos de incubación hasta las 24 horas. Se tomaron una serie de fotografías con microscopio de contraste de fases para determinar el efecto de los nanoelementos.

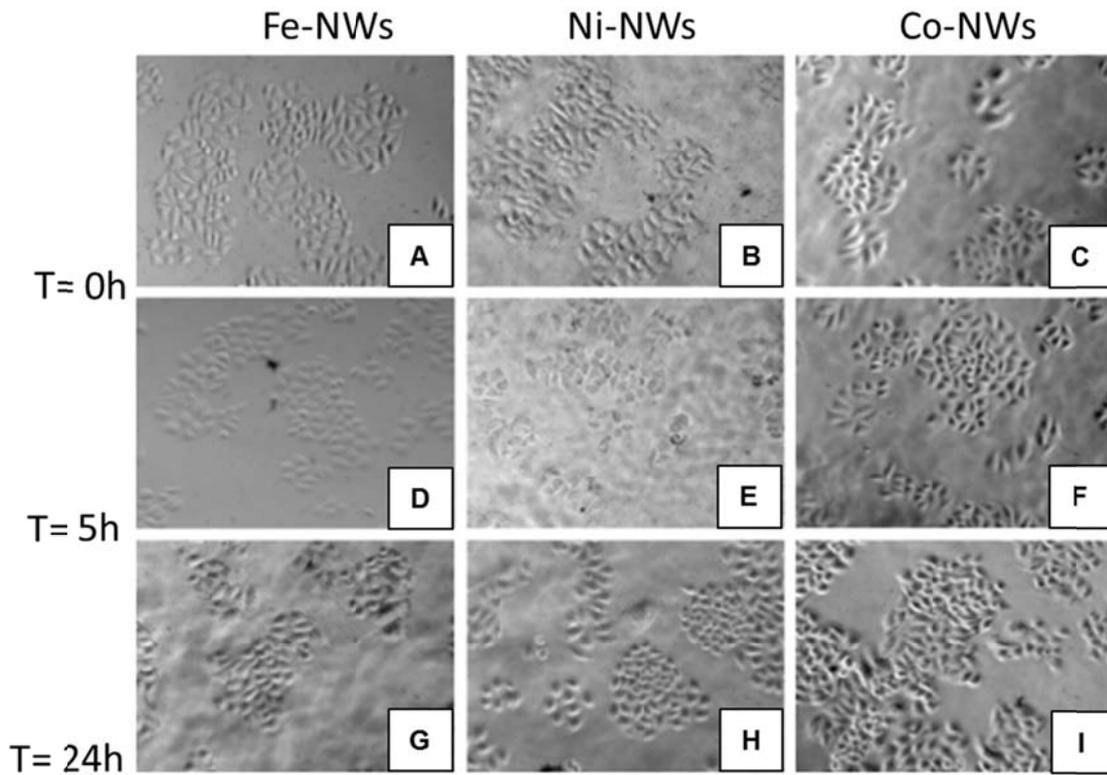
### 4.3.1. Nanoestructuras magnéticas

Los datos obtenidos de las imágenes de las células HCE expuestas tanto a Co-NWs, como a Ni-NWs, y Fe-NWs durante 0, 5 y 24 horas no mostraron alteraciones fenotípicas aparentes en ningún caso (Figura 7).



**Figura 7:** Imágenes de células HCE cultivadas durante distintos tiempos en presencia de nanoestructuras magnéticas. Las fotografías A, B y C indican el estado de las células HCE inmediatamente tras la adición de Fe-NWs, Ni-NWs y Co-NWs en cada caso. Las fotografías D, E y F señalan el estado celular tras la exposición de Fe-NWs, Ni-NWs y Co-NWs durante 5 horas. Las fotografías G, H e I muestran el estado de las células HCE tras la exposición de nanopartículas magnéticas durante 24 horas.

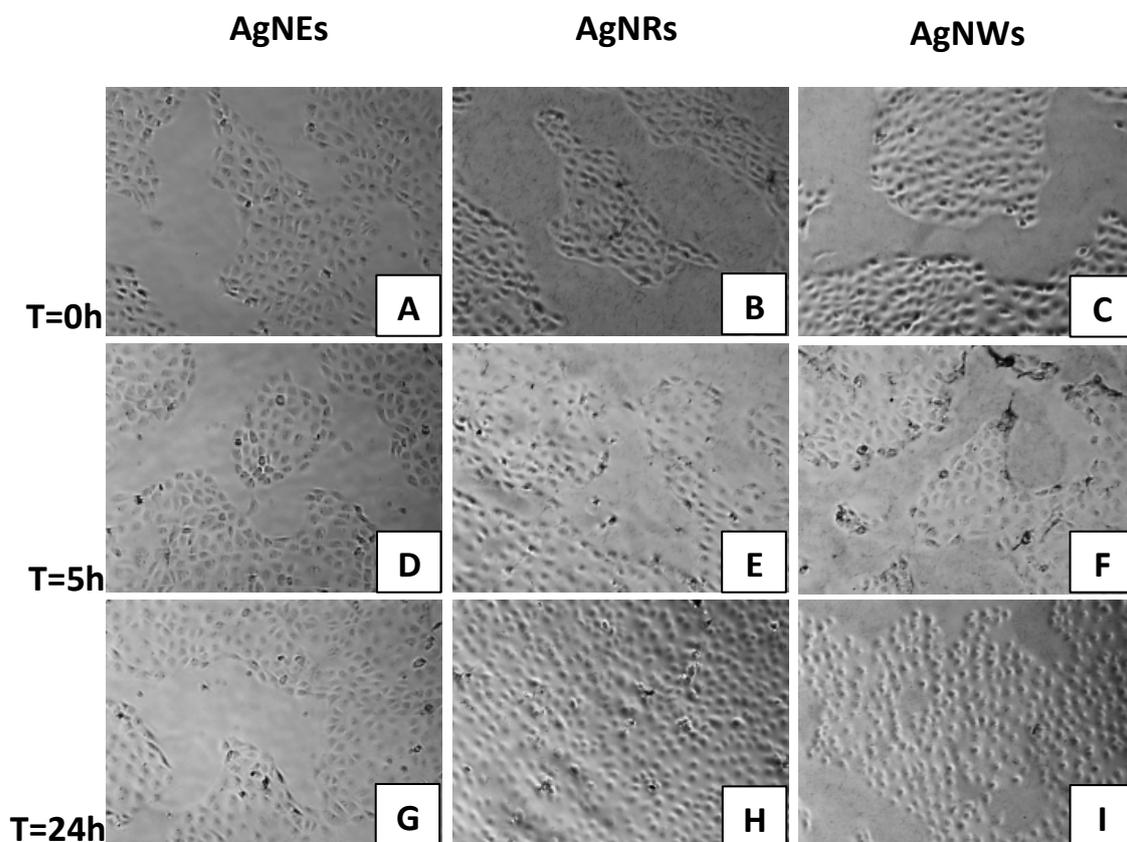
Los nanoelementos magnéticos tampoco causaron alteraciones fenotípicas notables en las células HeLa a ninguno de los tiempos de exposición (Figura 8).



**Figura 8:** Imágenes de células HeLa cultivadas durante distintos tiempos en presencia de nanoestructuras magnéticas. Las fotografías A, B y C indican el estado de las células HeLa inmediatamente tras la adición de Fe-NWs, Ni-NWs y Co-NWs en cada caso. Las fotografías D, E y F señalan el estado celular tras la exposición de Fe-NWs, Ni-NWs y Co-NWs durante 5 horas. Las fotografías G, H e I muestran el estado de las células HeLa tras la exposición de nanopartículas magnéticas durante 24 horas.

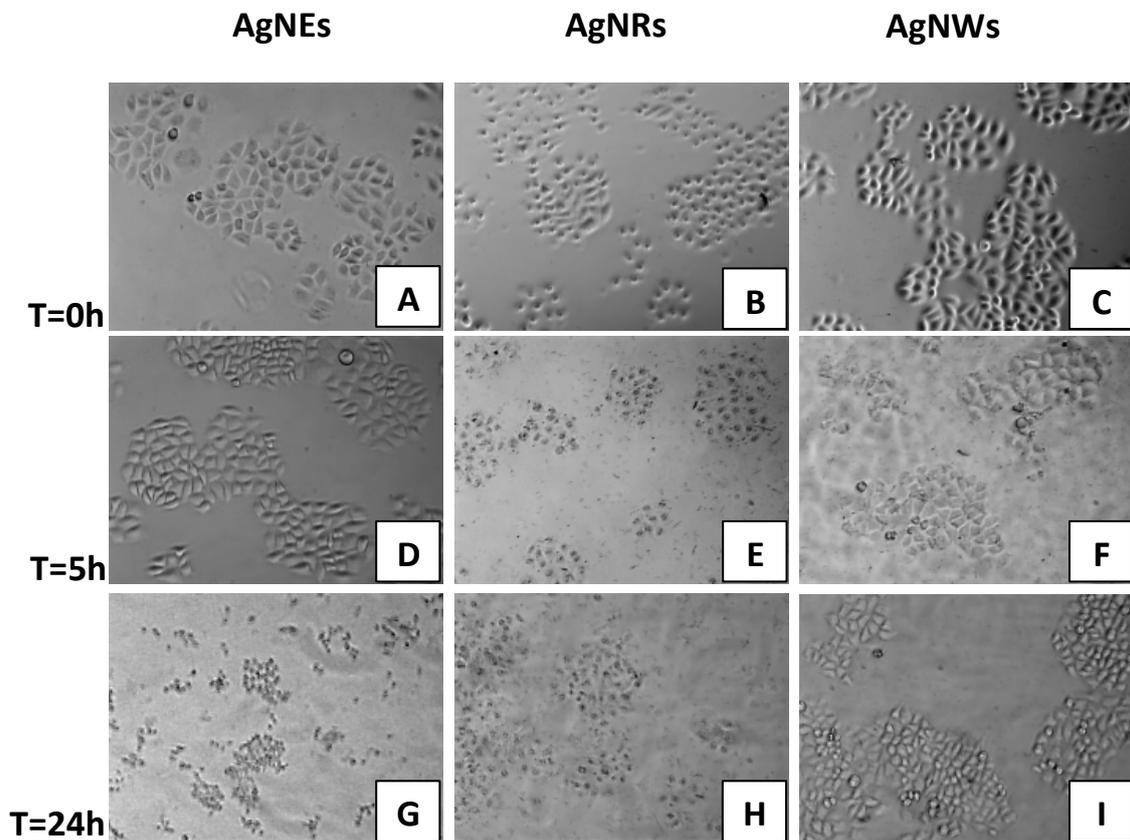
#### 4.3.2. Nanoestructuras no magnéticas de plata

Ninguno de los nanoelementos de plata parecieron afectar fenotípicamente a las células HCE (Figura 9):



**Figura 9.** Imágenes de células HCE cultivadas durante distintos tiempos en presencia de nanoestructuras no magnéticas de plata. Las fotografías A, B y C indican el estado de las células HCE inmediatamente tras la adición de AgNEs, AgNRs y AgNWs en cada caso. Las fotografías D, E y F señalan el estado celular tras la exposición de AgNEs, AgNRs y AgNWs durante 5 horas. Las fotografías G, H e I muestran el estado de las células HCE tras la exposición de nanoelementos de plata durante 24 horas.

Sin embargo, se observó un claro efecto apoptótico en las células HeLa causado por las AgNPs, con el aumento del tiempo de exposición las células varían su morfología y finalmente mueren. El efecto de las AgNEs sobre las células es visible tras 24 horas de exposición, donde se pudo observar una morfología claramente dañada (Figura 10; A, D, G). El efecto causado por los AgNRs fue visible tras 5 horas de incubación donde ya se pudo observar una morfología alterada que se vio incrementada a las 24 horas de exposición (Figura 10; B, E, H). Los AgNWs produjeron cambios en la morfología celular tras 5 horas de interacción, los cuales son más remarcables tras las 24 horas, pero en menor medida que en los casos anteriores (Figura 10; C, F, I).



**Figura 10.** Imágenes de células HeLa cultivadas durante distintos tiempos en presencia de nanoestructuras no magnéticas de plata. Las fotografías A, B y C indican el estado de las células HeLa inmediatamente tras la adición de AgNEs, AgNRs y AgNWs en cada caso. Las fotografías D, E y F señalan el estado celular tras la exposición de AgNEs, AgNRs y AgNWs durante 5 horas. Las fotografías G, H e I muestran el estado de las células HeLa tras la exposición de nanoelementos de plata durante 24 horas.

## 5. DISCUSIÓN

Este estudio se basa en la determinación de la capacidad biocida de nanoelementos magnéticos y no magnéticos sobre bacterias, levaduras y células humanas, por lo que se utilizaron cinco bacterias Gram negativas (*E.coli*, *H.influenzae*, *Klebsiella* sp., *Serratia* sp. y *Salmonella* sp.), seis bacterias Gram positivas (*S.aureus*, *S.epidermidis*, *B.globisporus*, *S.pneumoniae*, *E.faecalis*, *S.pyogenes*), las levaduras *C.albicans* y *S.cerevisiae*, y células HeLa y HCE para probar dicho efecto.

Los Co-NWs, Ni-NWs y Fe-NWs, todos ellos con morfología de hilos, no parecen afectar a la mortalidad de las bacterias en ausencia de un aparato que estimule sus propiedades magnéticas, pero es posible encontrar información relativa al incremento de la capacidad biocida de nanoelementos magnéticos siempre y cuando se les aplique previamente un campo magnético externo, como por ejemplo a partir de una cama magnética sujeta a un rotor (Sirivisoot & Harrison 2015). Además de su capacidad bactericida, ya han sido utilizadas como parte del tratamiento contra el cáncer, tanto en resonancias magnéticas como en terapias térmicas basadas en el calor (Gobbo *et al.* 2015).

Sin embargo, las AgNPs si mostraron un efecto biocida frente a los microorganismos empleados. Existe una abundante bibliografía acerca del efecto biocida de los nanoelementos de plata sobre microorganismos como levaduras, amebas, virus y especialmente bacterias, pero no hay tanta información acerca de su efecto sobre células humanas. Tal y como se relata en la introducción, en los últimos años ha habido un gran incremento respecto a la utilización de AuNPs en la lucha contra el cáncer; en cambio las AgNPs aún se empiezan a utilizar hoy día con este fin. Este tipo de nanoelementos se utiliza por ejemplo para la terapia contra el cáncer de colon entre otras enfermedades. Los ensayos de citotoxicidad han demostrado una excelente biocompatibilidad con las células Vero, además de su capacidad para eliminar a las células Caco-2 (Martins *et al.* 2015). Pero en este trabajo se intentó ir mas allá; se trató de comprobar si la morfología de los nanoelementos influía en este efecto biocida.

Gracias a los datos proporcionados por este estudio se ha observado que las AgNEs son capaces de generar una tasa de mortalidad más alta que en el caso de AgNRs y AGNWs.

Los AgNRs son una nueva morfología creada para poder observar si su efecto mejora el de las AgNEs y los AgNWs. Los NWs creados a partir de diversos materiales ya se están utilizando para el tratamiento de diversas enfermedades, tanto infecciosas como no infecciosas. Por ejemplo, un artículo muy reciente describe un protocolo para crear NWs de oro y telurio con una capacidad antibacteriana muy elevada en menos de 30 minutos (Chou *et al.* 2016). Por otra parte, hoy día se pueden producir NWs de silicio altamente estables y sensibles en solución, que pueden emplear para la medición de los niveles de proteínas, ADN y ARN a largo plazo (Dorvel *et al.* 2013).

Como ya se ha dicho anteriormente, el tamaño, el material y la forma son propiedades de las NPs que pueden afectar a su función. Sin embargo, debido a la compleja relación entre estos parámetros no existe mucha información acerca de la relevancia de la forma en sí misma. Se ha demostrado que tras comparar la morfología de esfera, barra, cubo y disco respecto a la captación celular de las NPs, las esferas poseen una tasa de internalización, y por tanto de absorción, más elevada que el resto de formas, seguido de los cubos, barras y finalmente discos. Esto se debe a la flexión que debe producirse en la membrana durante la endocitosis, que es mínima en el caso de las esferas. Esto puede ofrecer una orientación a la hora de diseñar NPs como vehículo para el transporte de medicamentos (Li *et al.* 2015).

En este estudio se analizaron varias bacterias para tener una representatividad suficiente de Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, se observó que el efecto biocida dependía más de cada bacteria y del tiempo de exposición que de la naturaleza Gram de la misma. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas se diferencian en la estructura de su pared celular. En las bacterias Gram negativas, la pared celular es una estructura compuesta por varias capas y bastante compleja, mientras que en las bacterias Gram positivas es más ancha y está formada en su mayor parte por peptidoglicano. En las bacterias Gram negativas el peptidoglicano representa el 10% de la pared, en cambio, la mayor parte está formada

por la membrana externa, compuesta por fosfolípidos, proteínas y lipopolisacárido (Madigan *et al.* 2009)

La viabilidad de las levaduras ensayadas se vio alterada tras la exposición a AgNPs pero no ante MNPs. En el caso de *S. cerevisiae*, se observó que la levadura poseía una mortalidad casi total tras la interacción con AgNPs de cualquier morfología. Por otra parte, en el caso de *C. albicans*, los efectos más notables son los producidos por AgNWs y AgNRs, algo curiosamente distinto al caso de las especies bacterianas. Esto abre una puerta al tratamiento de la candidiasis, dado que las AgNPs podrían complementar el tratamiento con antifúngicos y de esta manera aumentar su eficacia (Tang *et al.* 2014).

En cuanto a las células humanas utilizadas en este estudio, las células HCE, es decir, células no tumorales, no se vieron fenotípicamente alteradas por ningún tipo de NPs. Sin embargo, las células HeLa resultaron muy dañadas tras la interacción con AgNPs. Dentro de la morfología, cabe mencionar que los AgNRs son capaces de inducir apoptosis en las células HeLa más rápidamente que el resto de las morfologías. En el caso de las AgNEs, a las 5 horas se observa un cambio en la morfología de las células y a las 24 horas ya se encuentran gravemente dañadas; en cuanto a los AgNWs, también se observa una alteración de la morfología a las 5 horas pero a las 24 horas no se observan células apoptóticas si no una morfología un tanto más aberrante. Estos datos corroboran a otros muchos artículos en los que ya se utiliza la nanotecnología para el tratamiento de enfermedades, y además abren una nueva ventana a la investigación contra el cáncer puesto que sólo las células tumorales se ven afectadas por las AgNPs.

En conclusión, en este trabajo se ha descartado el efecto biocida de MNPs frente a bacterias, levaduras y células humanas sin la aplicación de un campo magnético. Sin embargo, las AgNPs afectan de manera muy importante a la viabilidad de bacterias, levaduras y células humanas, observándose también a lo largo de este trabajo diferencias importantes respecto a la morfología de AgNPs, postulándose los AgNRs como una alternativa tan eficaz como los AgNWs e incluso superándolos a ellos y a las AgNEs en algunas ocasiones.

## 6. CONCLUSIONES

Después de los resultados obtenidos, hemos extraído una serie de conclusiones:

1. Los AgNRs, AgNWs y AgNEs alteran la mortalidad de bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativa y levaduras.
2. Las AgNEs poseen una capacidad biocida más eficaz que los AgNRs y AgNWs después del contacto con bacterias
3. Se necesitan más estudios para determinar qué tipo de nanoelemento es más eficaz eliminando levaduras, aunque en todos los casos la tasa de mortalidad obtenida es muy elevada.
4. Las células HCE no parecen sufrir apoptosis tras la interacción con nanoelementos de plata mientras que las células HeLa sí.
5. Los AgNRs causan apoptosis en las células HeLa de forma más temprana que los AGNWs y AgNEs.
6. Los Co-NWs, Fe-NWs y Ni-NWs no causan ningún efecto en la mortalidad de ninguno de los organismos procariotas o eucariotas utilizados para este estudio.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Boisseau, P. & Loubaton, B., 2011. *Nanomedicine, nanotechnology in medicine*. Comptes Rendus Physique.
- Borase, H.P. et al., 2013. *Amoebicidal activity of phytosynthesized silver nanoparticles and their in vitro cytotoxicity to human cells*. FEMS microbiology letters, 345(2), pp.127–31.
- Chou, T.-M. et al., 2016. *Fabrication of Te and Te-Au Nanowires-Based Carbon Fiber Fabrics for Antibacterial Applications*. International journal of environmental research and public health, 13(2), p.202.
- Das, S. et al., 2014. *Engineered silybin nanoparticles educe efficient control in experimental diabetes*. PloS one, 9(7), p.e101818.
- Dorvel, B., Reddy, B. & Bashir, R., 2013. *Effect of biointerfacing linker chemistries on the sensitivity of silicon nanowires for protein detection*. Analytical chemistry, 85(20), pp.9493–500.
- Franci, G. et al., 2015. *Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents*. Molecules, 20(5), pp.8856–8874.
- Gao, Y. et al., 2015. *Emerging translational research on magnetic nanoparticles for regenerative medicine*. Chem. Soc. Rev., 44(17), pp.6306–6329.
- Gobbo, O.L. et al., 2015. *Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics*. Theranostics, 5(11), pp.1249–63.
- Hu, R.L. et al., 2014. *Inhibition effect of silver nanoparticles on herpes simplex virus 2*. Genetics and molecular research : GMR, 13(3), pp.7022–8.

- Iravani, S. et al., *Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods*. Research in pharmaceutical sciences, 9(6), pp.385–406.
- Kim, K.-J. et al., 2008. *Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes*. Journal of microbiology and biotechnology, 18(8), pp.1482–4.
- Lewis, D.R. et al., 2015. *Sugar-based amphiphilic nanoparticles arrest atherosclerosis in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(9), pp.2693–8.
- Li, Y., Kröger, M. & Liu, W.K., 2015. *Shape effect in cellular uptake of PEGylated nanoparticles: comparison between sphere, rod, cube and disk*. Nanoscale, 7(40), pp.16631–46.
- Madigan M.T, Martinko J.M & Clark D.P. 2009. *Brock. Biología de los microorganismos*. 12a edición. Addison-Wesley. Madrid.
- Martins, A.F. et al., 2015. *Polyelectrolyte complex containing silver nanoparticles with antitumor property on Caco-2 colon cancer cells*. International Journal of Biological Macromolecules, 79, pp.748–755.
- Mas, N. et al., 2014. *Enhanced antifungal efficacy of tebuconazole using gated pH-driven mesoporous nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine.
- Morishita, Y. et al., 2015. *Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticles inhibits renal fibrosis in vivo*. International journal of nanomedicine, 10, pp.3475–88.
- Sirivisoot, S. & Harrison, B.S., 2015. *Magnetically stimulated ciprofloxacin release from polymeric microspheres entrapping iron oxide nanoparticles*. International journal of nanomedicine, 10, pp.4447–58.

- Sundar, S. & Prajapati, V.K., 2012. *Drug targeting to infectious diseases by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules*. Current medicinal chemistry, 19(19), pp.3196–202.
- Tang, X. et al., 2014. *Enhanced antifungal effects of amphotericin B-TPGS-b-(PCL-ran-PGA) nanoparticles in vitro and in vivo*. International Journal of Nanomedicine.
- Taylor, U. et al., 2015. *Influence of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles on germ cell function and embryo development*. Beilstein journal of nanotechnology, 6, pp.651–64.
- Toriyama, K. et al., 2015. *Development of an immunochromatographic assay kit using fluorescent silica nanoparticles for rapid diagnosis of Acanthamoeba keratitis*. Journal of clinical microbiology, 53(1), pp.273–7.
- Valdez, J. et al., 2016. *Facile and rapid detection of respiratory syncytial virus using metallic nanoparticles*. Journal of nanobiotechnology, 14(1), p.13.
- Wei, L. et al., 2015. *Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications*. Drug discovery today, 20(5), pp.595–601.